



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0091901  
(43) 공개일자 2020년07월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 16/2803 (2013.01)  
A61P 35/00 (2018.01)  
(21) 출원번호 10-2020-7018697  
(22) 출원일자(국제) 2018년11월29일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2020년06월29일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/062961  
(87) 국제공개번호 WO 2019/108733  
국제공개일자 2019년06월06일  
(30) 우선권주장  
62/593,712 2017년12월01일 미국(US)

(71) 출원인  
시애틀 지네틱스, 인크.  
미국 98021 워싱턴주 보텔 30번 드라이브  
에스.이. 21823  
(72) 발명자  
가르다이, 샤이라  
미국 98021 워싱턴주 보텔 30번 드라이브 사우스  
이스트 21823 시애틀 지네틱스, 인크. 내  
레벤굿, 매튜  
미국 98021 워싱턴주 보텔 30번 드라이브 사우스  
이스트 21823 시애틀 지네틱스, 인크. 내  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 125 항

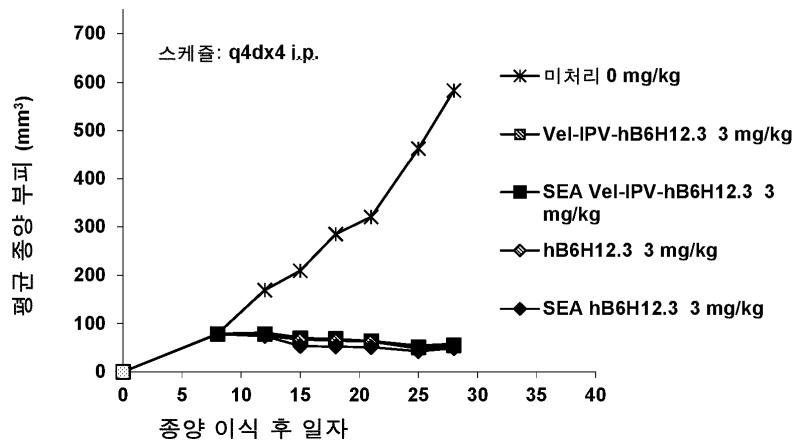
(54) 발명의 명칭 암을 치료하기 위한 CD47 항체 및 이의 용도

(57) 요약

CD47에 특이적으로 결합하는 마스킹된 항체를 포함하는 인간화 항체를 제공한다. CD47-발현 세포의(증식을 억제하는) 활성을 조절할뿐만 아니라 CD47-발현 세포와 연관된 하나 이상의 질환 또는 장애(예컨대, 암)의 치료를 위한, 마스킹된 항체를 포함하는 항-CD47 항체의 사용 방법을 제공한다.

대표도 - 도40a

디트로이트562 모델에서 SEA 표적화된 항-CD47 mAb의 항-종양 활성



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/50 (2013.01)

C07K 2319/73 (2013.01)

(72) 발명자

**트랑, 비비안**

미국 98021 워싱턴주 보텔 30번 드라이브 사우스이스트 21823 시애틀 지네틱스, 인크. 내

**웨스텐도르프, 로리**

미국 98021 워싱턴주 보텔 30번 드라이브 사우스이스트 21823 시애틀 지네틱스, 인크. 내

**카로시노, 크리스토퍼**

미국 98021 워싱턴주 보텔 30번 드라이브 사우스이스트 21823 시애틀 지네틱스, 인크. 내

**펠다우스, 마이클**

미국 98021 워싱턴주 보텔 30번 드라이브 사우스이스트 21823 시애틀 지네틱스, 인크. 내

**로, 체-룽**

미국 98021 워싱턴주 보텔 30번 드라이브 사우스이스트 21823 시애틀 지네틱스, 인크. 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 16, 19, 21 및 23으로부터 선택된 HCDR1; 서열번호 17, 20, 22 및 24로부터 선택된 HCDR2; 및 서열번호 18의 HCDR3을 포함하고;

상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 31 및 34로부터 선택된 LCDR1; 서열번호 32 및 35로부터 선택된 LCDR2; 및 서열번호 33 및 36으로부터 선택된 LCDR3을 포함하고;

상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 그리고

상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 10, 11, 12, 13, 14 및 15로부터 선택된 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

#### 청구항 2

경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 16, 19, 21 및 23으로부터 선택된 HCDR1; 서열번호 17, 20, 22 및 24로부터 선택된 HCDR2; 및 서열번호 18의 HCDR3을 포함하고;

상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 31 및 34로부터 선택된 LCDR1; 서열번호 32 및 35로부터 선택된 LCDR2; 및 서열번호 33 및 36으로부터 선택된 LCDR3을 포함하고;

상기 중쇄 가변 영역이

a) 서열번호 88에 제시된 인간 IGHV3-23/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트(Kabat) 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H44, H49, H82, H89, H91 및 H94는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는

b) 서열번호 89에 제시된 인간 IGHV3-48/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H49는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는

c) 서열번호 90에 제시된 인간 IGHV3-66/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H29, H49 및 H82는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는

d) 서열번호 91에 제시된 인간 IGHV3-74/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H49는 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함하며;

상기 경쇄 가변 영역이

c) 서열번호 92에 제시된 인간 IGKV6-21/KJ2 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 L4, L21, L69 및 L85는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는

d) 서열번호 93에 제시된 인간 IGKV1-27/KJ2 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 L21, L49 및 L69는 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 16, 17 및 18; 서열번호 19, 20 및 18; 서열번호 21, 22 및 18; 서열번호 16,

20 및 18; 및 서열번호 23, 24 및 18로부터 선택된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 31, 32 및 33; 서열번호 31, 32 및 36; 및 서열번호 34, 35 및 33으로부터 선택된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 서열번호 16, 17, 18, 31, 32 및 33; 서열번호 16, 17, 18, 34, 35 및 33; 서열번호 19, 20, 18, 31, 32 및 33; 서열번호 19, 20, 18, 34, 35 및 33; 서열번호 21, 22, 18, 31, 32 및 33; 서열번호 21, 22, 18, 34, 35 및 33; 서열번호 16, 20, 18, 31, 32 및 33; 서열번호 16, 20, 18, 34, 35 및 33; 서열번호 23, 24, 18, 31, 32 및 33; 서열번호 23, 24, 18, 34, 35 및 33; 서열번호 16, 17, 18, 31, 32 및 36; 서열번호 19, 20, 18, 31, 32 및 36; 서열번호 21, 22, 18, 31, 32 및 36; 16, 20, 18, 31, 32 및 36; 및 서열번호 23, 24, 18, 31, 32 및 36으로부터 선택된 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 6**

경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 25, 28 및 29로부터 선택된 HCDR1; 서열번호 26 및 30으로부터 선택된 HCDR2; 및 서열번호 27의 HCDR3을 포함하고;

상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 37 및 40으로부터 선택된 LCDR1; 서열번호 38의 LCDR2; 및 서열번호 39 및 41로부터 선택된 LCDR3을 포함하고;

상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며;

상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 10, 11, 12, 13, 14 및 15로부터 선택된 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 7**

경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 25, 28 및 29로부터 선택된 HCDR1; 서열번호 26 및 30으로부터 선택된 HCDR2; 및 서열번호 27의 HCDR3을 포함하고;

상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 37 및 40으로부터 선택된 LCDR1; 서열번호 38의 LCDR2; 및 서열번호 39 및 41로부터 선택된 LCDR3을 포함하고;

상기 중쇄 가변 영역이

- a) 서열번호 88에 제시된 인간IGHV3-23/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H44, H49, H82, H89, H91 및 H94는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는
- b) 서열번호 89에 제시된 인간IGHV3-48/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H49는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는
- c) 서열번호 90에 제시된 인간IGHV3-66/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H29, H49 및 H82는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는

d) 서열번호 91에 제시된 인간 IGHV3-74/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H49는 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함하고; 그리고

상기 경쇄 가변 영역이

c) 서열번호 92에 제시된 인간 IGKV6-21/KJ2 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 L4, L21, L69 및 L85는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는

d) 서열번호 93에 제시된 인간 IGKV1-27/KJ2 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 L21, L49 및 L69는 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

#### 청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 25, 26 및 27; 서열번호 28, 26 및 27; 서열번호 29, 30 및 27; 및 서열번호 29, 26 및 27로부터 선택된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

#### 청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 37, 38 및 39; 서열번호 40, 38 및 39; 및 서열번호 37, 38 및 41로부터 선택된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

#### 청구항 10

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 서열번호 25, 26, 27, 37, 38 및 39; 서열번호 25, 26, 27, 40, 38 및 39; 서열번호 25, 26, 27, 37, 38 및 41; 서열번호 28, 26, 27, 37, 38 및 39; 서열번호 28, 26, 27, 40, 38 및 39; 서열번호 28, 26, 27, 37, 38 및 41; 서열번호 29, 30, 27, 37, 38 및 39; 서열번호 29, 30, 27, 40, 38 및 39; 서열번호 29, 30, 27, 37, 38 및 41; 서열번호 29, 26, 27, 37, 38 및 39; 서열번호 29, 26, 27, 40, 38 및 39; 및 서열번호 29, 26, 27, 37, 38 및 41로부터 선택된 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

#### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

#### 청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 10, 11, 12, 13, 14 및 15로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

#### 청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역이 서열번호 2 및 10; 서열번호 3 및 11; 서열번호 3 및 12; 서열번호 3 및 13; 서열번호 3 및 14; 서열번호 4 및 11; 서열번호 4 및 12; 서열번호 4 및 13; 서열번호 4 및 14; 서열번호 5 및 11; 서열번호 5 및 12; 서열번호 5 및 13; 서열번호 5 및 14; 서열번호 6 및 11; 서열번호 6 및 12; 서열번호 6 및 13; 서열번호 6 및 14; 서열번호 7 및 11; 서열번호 7 및 12; 서열번호 7 및 13; 서열번호 7 및 14; 서열번호 8 및 11; 서열번호 8 및 12; 서열번호 8 및 13; 서열번호 8 및 14; 서열번호 3 및 15를 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 14**

경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 16의 HCDR1, 서열번호 17의 HCDR2 및 서열번호 18의 HCDR3을 포함하고;

상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 31의 LCDR1, 서열번호 32의 LCDR2 및 서열번호 33의 LCDR3을 포함하고;

상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 3과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 13과 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며;

상기 항체가 Ab47과 비교하여 적혈구의 감소된 혈구응집반응을 갖는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 15**

제14항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 16**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역이

a) 서열번호 88에 제시된 인간 IGHV3-23/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H44, H49, H82, H89, H91 및 H94는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는

b) 서열번호 89에 제시된 인간 IGHV3-48/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H49는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는

c) 서열번호 90에 제시된 인간 IGHV3-66/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H29, H49 및 H82는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는

d) 서열번호 91에 제시된 인간 IGHV3-74/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H49는 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 17**

제16항에 있어서,

카바트 넘버링에 따른, H29가 F이고, H44가 R 또는 G이고, H49가 A이고, H82가 M 또는 I이고, H89가 I 또는 V이고, H91이 F 또는 Y이고, H94가 R인, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 18**

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 경쇄 가변 영역이

a) 서열번호 92에 제시된 인간 IGKV6-21/KJ2 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 L4, L21, L69 및 L85는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는

b) 서열번호 93에 제시된 인간 IGKV1-27/KJ2 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 L21, L49 및 L69는 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 19**

제18항에 있어서,

카바트 넘버링에 따른, L4가 M이고, L21이 L이고, L49가 K이고, L69가 T 또는 S이고, L85가 V 또는 T인, 인간화

항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 20**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 IgG1 이소타입인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 21**

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 이의 모(parental) 항체와 비교하여 향상된 항체 의존성 세포성 세포독성(ADCC)을 갖는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 22**

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 이의 모 항체와 비교하여 향상된 항체 의존성 세포성 식세포작용(ADCP)을 갖는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 23**

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 이의 모 항체와 비교하여 향상된 보체-의존성 세포독성(CDC)을 갖는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 24**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv 단편, 디아바디(diabody), 단일-쇄 항체, scFv 단편 또는 scFv-Fc인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 25**

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 생체 외 및/또는 생체 내에서 CD47-발현 세포의 아포토시스(apoptosis)를 유도하는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 26**

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

모 항체와 비교하여 감소된 코어 푸코실화(core fucosylation)를 갖는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 27**

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

어푸코실화된(afucosylated), 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

**청구항 28**

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 항원-결합 단편이 CD47과 SIRP $\alpha$  사이의 상호작용을 차단하는 것인, 항체 또는 항원-결합 단편.

**청구항 29**

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 항원-결합 단편이 Ab47과 비교하여 적혈구의 감소된 혈구응집반응을 갖는 것인, 항체 또는 항원-결합 단편.

**청구항 30**

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 서열.

**청구항 31**

제29항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

**청구항 32**

제30항의 핵산 또는 제28항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

**청구항 33**

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편을 발현하는 숙주 세포.

**청구항 34**

제32항 또는 제33항의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편의 제조 방법.

**청구항 35**

제34항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 분리하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

**청구항 36**

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 항-CD47 항체 또는 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법.

**청구항 37**

대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법으로서,

- a) 대상체를 CD47-발현 암을 갖는 것으로서 식별하는 단계; 및
- b) 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 38**

제37항에 있어서,

단계 a)가

- i) 암 조직을 분리하는 단계; 및
- ii) 분리된 암 조직에서 CD47을 검출하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

**청구항 39**

대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법으로서,

- a) 대상체를 비-암 조직에 비해 암 조직에서 대식세포 침윤의 상승된 수준을 갖는 것으로서 식별하는 단계; 및
- b) 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 40**

제39항에 있어서,

단계 a)가

- i) 대상체로부터 암 조직 및 주변 비-암 조직을 분리하는 단계;
- ii) 분리된 암 조직 및 비-암 조직에서 대식세포를 검출하는 단계; 및
- iii) 비-암 조직에 대한 암 조직의 염색 양을 비교하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

**청구항 41**

제40항에 있어서,

상기 대식세포 염색이 항-CD163 항체로 수행되는 것인, 방법.

**청구항 42**

제36항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CD47-발현 암이 혈액암 또는 고형암인 것인, 방법.

**청구항 43**

제36항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CD47-발현 암이 비-호지킨 림프종, B-림프모구성 림프종; B 세포 만성 림프구성 백혈병/소 림프구성 림프종, 리히터 증후군(Richter's syndrome), 여포성 림프종, 다발성 골수종, 골수섬유증, 진성 다혈구증, 피부 T 세포 림프종, 의미 불명 단클론성 감마글로불린병증(monoclonal gammopathy of unknown significance(MGUS)), 골수이형성 증후군(MDS), 면역모구성 대세포 림프종, 전구 B 림프모구성 림프종, 급성 골수성 백혈병(AML) 및 역형성 대세포 림프종으로부터 선택되는 것인, 방법.

**청구항 44**

제36항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CD47-발현 암이 폐암, 췌장암, 유방암, 간암, 난소암, 고환암, 신장암, 방광암, 척수암, 뇌암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 결장 직장암, 항문암, 자궁 내막암, 식도암, 담낭암, 위장관암, 위암(gastric cancer), 암종, 두경부암, 피부암, 흑색종, 전립선암, 뇌하수체암, 위암(stomach cancer), 자궁암, 질암 및 갑상선암으로부터 선택되는 것인, 방법.

**청구항 45**

제36항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CD47-발현 암이 폐암, 육종, 결장 직장암, 두경부암, 난소암, 췌장암, 위암, 흑색종 및 유방암으로부터 선택되는 것인, 방법.

**청구항 46**

제36항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 하나 이상의 프로그램된 세포 사멸 단백질 1(PD-1), 프로그램된 사멸-리간드 1(PD-L1), PD-L2, 세포독성 T 림프구-연관 단백질 4(CTLA-4), T 세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인 함유 3(TIM-3), 림프구 활성화 유전자 3(LAG-3), 암배아성 항원 관련 세포 부착 분자 1(CEACAM-1), CEACAM-5, T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제자(VISTA), B 및 T 림프구 약화인자(BTLA), Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT), 백혈구-연관 면역글로불린-유사 수용체 1(LAIR1), CD160, 2B4 또는 TGFR로부터 선택된 면역 체크포인트(checkpoint) 분자의 억제제와 병용하여 투여되는 것인, 방법.

**청구항 47**

제36항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 작용성(agonistic) 항-CD40 항체와 조합하여 투여되는 것인, 방법.

**청구항 48**

제47항에 있어서,

상기 작용성 항-CD40 항체가 낮은 푸코실화 수준을 갖거나 어푸코실화된 것인, 방법.

**청구항 49**

제36항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 항체 약물 접합체(ADC)와 병용하여 투여되고, 여기서 ADC의 항체가 암 세포의 세포 외 표면에서 발견되는 단백질에 특이적으로 결합하고, 항체가 세포독성제를 포함하는 약물-링커에 접합된 것인, 방법.

**청구항 50**

제49항에 있어서,

상기 세포독성제가 아우리스타틴인 것인, 방법.

**청구항 51**

제50항에 있어서,

상기 ADC의 항체가 vcMMAE 및 mcMMAF로 이루어진 군으로부터 선택된 약물-링커에 접합된 것인, 방법.

**청구항 52**

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 CD47-발현 세포의 아포토시스 유도 방법.

**청구항 53**

제52항에 있어서,

상기 세포가 생체 외에 있는 것인, 방법.

**청구항 54**

제52항에 있어서,

상기 세포가 생체 내에 있는 것인, 방법.

**청구항 55**

인간 CD47 단백질 및 하나 이상의 마스킹(masking) 도메인에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 마스킹된(masked) 항체로서,

하나 이상의 마스킹 도메인이 서열번호 44-55, 75-86, 94 및 95로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 마스킹된 항체.

**청구항 56**

제55항에 있어서,

상기 하나 이상의 마스킹 도메인이, 하나 이상의 마스킹 도메인이 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 인간 CD47 단백질에 대한 항체 또는 항원-결합 단편의 결합 친화도를 감소시키는, 마스킹된 항체.

**청구항 57**

제56항에 있어서,

상기 결합 친화도가, 하나 이상의 마스킹 도메인이 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 약 100-배 이상 감소된, 마스킹된 항체.

**청구항 58**

제56항에 있어서,

상기 결합 친화도가, 하나 이상의 마스킹 도메인이 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 약 200-배 내지 약 1500-배 감소된, 마스킹된 항체.

**청구항 59**

제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하되,

여기서, 상기 중쇄가 제1 마스킹 도메인에 연결되거나; 또는

상기 경쇄가 제2 마스킹 도메인에 연결되거나; 또는

상기 중쇄가 제1 마스킹 도메인에 연결되고 경쇄가 제2 마스킹 도메인에 연결되는, 마스킹된 항체.

**청구항 60**

제59항에 있어서,

상기 제1 마스킹 도메인이 서열번호 44, 46, 48, 50, 52, 54, 75, 77, 79, 81, 83, 85 및 94로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고; 제2 마스킹 도메인이 서열번호 45, 47, 49, 51, 53, 55, 76, 78, 80, 82, 84, 86 및 95로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 마스킹된 항체.

**청구항 61**

제60항에 있어서,

상기 제1 마스킹 도메인 및 제2 마스킹 도메인이 서열번호 44 및 45; 서열번호 46 및 47; 서열번호 48 및 49; 서열번호 50 및 51; 서열번호 52 및 53; 서열번호 54 및 55; 서열번호 75 및 76; 서열번호 77 및 78; 서열번호 79 및 80; 서열번호 81 및 82; 서열번호 83 및 84; 서열번호 85 및 86; 및 서열번호 94 및 95로부터 선택된 한 쌍의 마스킹 도메인인, 마스킹된 항체.

**청구항 62**

제59항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 마스킹 도메인이 중쇄의 N-말단에 연결되고 제2 마스킹 도메인이 경쇄의 N-말단에 연결되는, 마스킹된 항체.

**청구항 63**

제59항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서,

각각의 마스킹 도메인이 프로테아제-절단가능한 링커를 포함하고 프로테아제-절단가능한 링커를 통해 중쇄 또는 경쇄에 연결되는, 마스킹된 항체.

**청구항 64**

제63항에 있어서,

상기 프로테아제-절단가능한 링커가 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP) 절단 부위를 포함하는, 마스킹된 항체.

**청구항 65**

제64항에 있어서,

상기 MMP 절단 부위가 MMP2 절단 부위, MMP7 절단 부위, MMP9 절단 부위 및 MMP13 절단 부위로부터 선택되는, 마스크된 항체.

**청구항 66**

제64항 또는 제65항에 있어서,

MMP에 의한 절단 후, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 중쇄 및/또는 경쇄가 MMP 절단 부위의 스템브(stub) 아미노산 렘넌트(remnant)를 포함하는, 마스크된 항체.

**청구항 67**

제66항에 있어서,

상기 스템브 아미노산 렘넌트가 항체의 N 말단에서 서열 LRSG, SG 또는 VR을 포함하는, 마스크된 항체.

**청구항 68**

제55항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 마스크된 항체.

**청구항 69**

제55항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 마스크 도메인에 연결되고 서열번호 42의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 제2 마스크 도메인에 연결되고 서열번호 43의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는, 마스크된 항체.

**청구항 70**

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 하나 이상의 마스크 도메인을 포함하는 마스크된 항체.

**청구항 71**

제70항에 있어서,

하나 이상의 마스크 도메인이 서열번호 44-55, 75-86, 94 및 95로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 마스크된 항체.

**청구항 72**

제70항에 있어서,

각각의 마스크 도메인이 서열 44-55, 75-86, 94 및 95로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 마스크된 항체.

**청구항 73**

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 마스크 도메인이, 하나 이상의 마스크 도메인이 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 인간 CD47 단백질에 대한 항체 또는 항원-결합 단편의 결합 친화도를 감소시키는, 마스크된 항체.

**청구항 74**

제73항에 있어서,

상기 결합 친화도가, 하나 이상의 마스크 도메인이 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 약 100-배

이상 감소된, 마스킹된 항체.

**청구항 75**

제73항에 있어서,

상기 결합 친화도가, 하나 이상의 마스킹 도메인이 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 약 200-배 내지 약 1500-배 감소된, 마스킹된 항체.

**청구항 76**

제70항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 중쇄 및 경쇄를 포함하되,

여기서, 상기 중쇄가 제1 마스킹 도메인에 연결되거나; 또는

상기 경쇄가 제2 마스킹 도메인에 연결되거나; 또는

상기 중쇄가 제1 마스킹 도메인에 연결되고 경쇄가 제2 마스킹 도메인에 연결되는, 마스킹된 항체.

**청구항 77**

제76항에 있어서,

상기 제1 마스킹 도메인이 서열번호 44, 46, 48, 50, 52, 54, 75, 77, 79, 81, 83, 85 및 94로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

상기 제2 마스킹 도메인이 서열번호 45, 47, 49, 51, 53, 55, 76, 78, 80, 82, 84, 86 및 95로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 마스킹된 항체.

**청구항 78**

제77항에 있어서,

상기 제1 마스킹 도메인 및 제2 마스킹 도메인이 서열번호 44 및 45; 서열번호 46 및 47; 서열번호 48 및 49; 서열번호 50 및 51; 서열번호 52 및 53; 서열번호 54 및 55; 서열번호 75 및 76; 서열번호 77 및 78; 서열번호 79 및 80; 서열번호 81 및 82; 서열번호 83 및 84; 서열번호 85 및 86; 및 서열번호 94 및 95로부터 선택된 한 쌍의 마스킹 도메인인, 마스킹된 항체.

**청구항 79**

제76항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 마스킹 도메인이 중쇄의 N-말단에 연결되고 제2 마스킹 도메인이 경쇄의 N-말단에 연결되는, 마스킹된 항체.

**청구항 80**

제76항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서,

각각의 마스킹 도메인이 프로테아제-절단가능한 링커를 포함하고 프로테아제-절단가능한 링커를 통해 중쇄 또는 경쇄에 연결되는, 마스킹된 항체.

**청구항 81**

제80항에 있어서,

상기 프로테아제-절단가능한 링커가 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP) 절단 부위를 포함하는, 마스킹된 항체.

**청구항 82**

제81항에 있어서,

상기 MMP 절단 부위가 MMP2 절단 부위, MMP7 절단 부위, MMP9 절단 부위 및 MMP13 절단 부위로부터 선택되는,

마스킹된 항체.

**청구항 83**

제81항 또는 제82항에 있어서,

MMP에 의한 절단 후, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 중쇄 및/또는 경쇄가 MMP 절단 부위의 스테브 아미노산 램넨트를 포함하는, 마스킹된 항체.

**청구항 84**

제83항에 있어서,

상기 스테브 아미노산 램넨트가 항체의 N 말단에서 서열 LRSG, SG 또는 VR을 포함하는, 마스킹된 항체.

**청구항 85**

제55항 내지 제84항 중 어느 한 항의 마스킹된 항체를 코딩하는 핵산 서열.

**청구항 86**

제85항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

**청구항 87**

제86항의 핵산 또는 제78항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

**청구항 88**

제55항 내지 제84항 중 어느 한 항의 마스킹된 항체를 발현하는 숙주 세포.

**청구항 89**

제87항 또는 제88항의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 제49항 내지 제76항 중 어느 한 항의 마스킹된 항체의 제조 방법.

**청구항 90**

제89항에 있어서,

상기 마스킹된 항체를 단리하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

**청구항 91**

제55항 내지 제84항 중 어느 한 항의 마스킹된 항체의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법.

**청구항 92**

대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법으로서,

- a) 대상체를 주변 비-암 조직에 비해 암에서 MMP의 상승된 수준을 갖는 것으로서 식별하는 단계; 및
- b) 제55항 내지 제84항 중 어느 하나의 마스킹된 항체의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계이되, 여기서 마스킹된 항체의 각각의 마스킹 도메인이 프로테아제-절단가능한 링커를 포함하고 프로테아제-절단가능한 링커가 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP) 절단 부위를 포함하는, 단계를 포함하는 방법.

**청구항 93**

제92항에 있어서,

상기 MMP 절단 부위가 MMP2 절단 부위, MMP7 절단 부위, MMP9 절단 부위 및 MMP13 절단 부위로부터 선택되는 것

인, 방법.

**청구항 94**

제92항 또는 제93항에 있어서,

상기 MMP가 MMP2, MMP7, MMP9 및 MMP13으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

**청구항 95**

제92항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 a)가

- i) 대상체로부터 암 조직 및 비-암 조직을 분리하는 단계;
- ii) 분리된 암 조직 및 비-암 조직에서 MMP를 검출하는 단계; 및
- iii) 비-암 조직에 대한 암 조직의 염색 양을 비교하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

**청구항 96**

대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법으로서,

- a) 대상체를 CD47-발현 암을 갖는 것으로서 식별하는 단계; 및
- b) 제55항 내지 제84항 중 어느 한 항의 마스킹된 항체의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 97**

제96항에 있어서,

단계 a)가

- i) 암 조직 분리하는 단계; 및
- ii) 분리된 암 조직에서 CD47을 검출하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

**청구항 98**

대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법으로서,

- a) 대상체를 비-암 조직에 비해 암 조직에서 대식세포 침윤의 상승된 수준을 갖는 것으로서 식별하는 단계; 및
- b) 제55항 내지 제84항 중 어느 한 항의 마스킹된 항체의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 99**

제98항에 있어서,

단계 a)가

- i) 대상체로부터 암 조직 및 주변 비-암 조직을 분리하는 단계;
- ii) 분리된 암 조직 및 비-암 조직에서 대식세포를 검출하는 단계; 및
- iii) 비-암 조직에 대한 암 조직의 염색 양을 비교하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

**청구항 100**

제99항에 있어서,  
상기 대식세포 염색이 항-CD163 항체로 수행되는 것인, 방법.

**청구항 101**

제91항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 CD47-발현 암이 혈액암 또는 고형암인 것인, 방법.

**청구항 102**

제91항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 CD47-발현 암이 비-호지킨 림프종, B 림프모구성 림프종; B 세포 만성 림프구성 백혈병/소 림프구성 림프종, 리히터 증후군, 여포성 림프종, 다발성 골수종, 골수섬유증, 진성 다혈구증, 피부 T 세포 림프종, 의미 불명 단클론성 감마글로불린병증(MGUS), 골수이형성 증후군(MDS), 면역모구성 대세포 림프종, 전구 B 림프모구성 림프종, 급성 골수성 백혈병(AML) 및 역형성 대세포 림프종으로부터 선택되는 것인, 방법.

**청구항 103**

제91항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 CD47-발현 암이 폐암, 췌장암, 유방암, 간암, 난소암, 고환암, 신장암, 방광암, 척수암, 뇌암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 결장 직장암, 항문암, 자궁 내막암, 식도암, 담낭암, 위장관암, 위암(gastric cancer), 육종, 두경부암, 흑색종, 피부암, 전립선암, 뇌하수체암, 위암(stomach cancer), 자궁암, 질암 및 갑상선암으로부터 선택되는 것인, 방법.

**청구항 104**

제91항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 CD47-발현 암이 폐암, 육종, 결장 직장암, 두경부암, 난소암, 췌장암, 위암, 흑색종 및 유방암으로부터 선택되는 것인, 방법.

**청구항 105**

제91항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 항-CD47 항체가 하나 이상의 프로그램된 세포 사멸 단백질 1(PD-1), 프로그램된 사멸-리간드 1(PD-L1), PD-L2, 세포독성 T 림프구-연관 단백질 4(CTLA-4), T 세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인 함유 3(TIM-3), 림프구 활성화 유전자 3(LAG-3), 암배아성 항원 관련 세포 부착 분자 1(CEACAM-1), CEACAM-5, T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제자(VISTA), B 및 T 림프구 약화인자(BTLA), Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체(TIGIT), 백혈구-연관 면역글로불린-유사 수용체 1(LAIR1), CD160, 2B4 또는 TIGR로부터 선택된 면역 체크포인트 분자의 억제제와 병용하여 투여되는 것인, 방법.

**청구항 106**

제91항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 작용성 항-CD40 항체와 병용하여 투여되는 것인, 방법.

**청구항 107**

제106항에 있어서,  
상기 작용성 항-CD40 항체가 낮은 푸코실화 수준을 갖거나 어푸코실화된 것인, 방법.

**청구항 108**

제91항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 항체 약물 접합체(ADC)와 병용하여 투여되고, 여기서 ADC의 항체가 암 세포의 세포 외 표면에서 발현된 단백질에 특이적으로 결합하고 항체가 세포독성제를 포함하는 약물-링커에 접합되는 것인, 방법.

**청구항 109**

제108항에 있어서,

상기 세포독성제가 아우리스타틴인 것인, 방법.

**청구항 110**

제109항에 있어서,

상기 ADC의 항체가 vcMMAE 및 mcMMAF로 이루어진 군으로부터 선택된 약물-링커에 접합된 것인, 방법.

**청구항 111**

제91항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 마스킹된 항체가 프로테아제-절단가능한 링커를 포함하는 하나 이상의 마스킹 도메인을 포함하고, 프로테아제-절단가능한 링커가 종양 미세환경에서 절단되는 것인, 방법.

**청구항 112**

제111항에 있어서,

상기 종양 미세환경에서 프로테아제-절단가능한 링커의 절단 후, 상기 마스킹 도메인이 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 방출되는 것인, 방법.

**청구항 113**

제111항 또는 제112항에 있어서,

상기 프로테아제-절단가능한 링커가 아미노산 서열 IPVSLRSG(서열번호 73) 또는 GPLGVR(서열번호 57)을 포함하는 것인, 방법.

**청구항 114**

제111항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 프로테아제-절단가능한 링커가 MMP 절단 부위를 포함하는 것인, 방법.

**청구항 115**

제114항에 있어서,

상기 MMP 절단 부위가 MMP2 절단 부위, MMP7 절단 부위, MMP9 절단 부위 및 MMP13 절단 부위로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

**청구항 116**

제111항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 방출 후, 상기 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 프로테아제-절단가능한 링커의 스테브 아미노산 램넨트를 갖는 것인, 방법.

**청구항 117**

제116항에 있어서,

상기 스테브 아미노산 램넨트가 항체의 N 말단에서 LRSG, SG 또는 VR의 서열을 포함하는 것인, 방법.

**청구항 118**

제111항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 종양 미세환경에서의 절단 후, 상기 방출된 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 CD47에 대한 마스킹된 항체의 친화도보다 약 100-배 이상 강한 친화도로 CD47에 결합하는 것인, 방법.

**청구항 119**

제111항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 종양 미세 환경에서의 절단 후, 상기 방출된 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 CD47에 대한 마스킹된 항체의 친화도보다 200-배 내지 1500-배 강한 친화도로 CD47에 결합하는 것인, 방법.

**청구항 120**

제36항 내지 제51항 및 제91항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 상기 마스킹된 항체의 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 이의 모 항-CD47 항체와 비교하여 생체 외에서 감소된 혈구응집반응을 나타내는 것인, 방법.

**청구항 121**

제120항에 있어서,

상기 모 항체가 Ab47인 것인, 방법.

**청구항 122**

제36항 내지 제51항 및 제91항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체의 투여가 대상체에서 혈구응집반응을 유도하지 않는 것인, 방법.

**청구항 123**

제36항 내지 제51항 및 제91항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체가 생체 외 및/또는 생체 내에서 CD47-발현 세포의 아포토시스를 유도하는 것인, 방법.

**청구항 124**

제123항에 있어서,

상기 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체가 생체 내에서 CD47-발현 세포의 아포토시스를 유도하는 것인, 방법.

**청구항 125**

제124항에 있어서,

상기 CD47-발현 세포가 암 세포인 것인, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **관련 출원에 대한 교차-참조**

[0002] 본 출원은 2017년 12월 1일자로 출원된 미국 가출원 제62/593,712호의 우선권의 이익을 주장하며, 이는 임의의 목적을 위해 그 전체가 본원에 참고로서 인용된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 발명은 항체-기반 암 치료제의 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 임의로 제거가능한 마스킹제와 연관될

수 있는 신규한 인간화 항-CD47 항체 및 이의 항원-결합 단편 또는 접합체, 및 CD47-발현 암의 치료에서의 이들의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0005] 인테그린 연관 단백질(IAP)로서 또한 알려진 분화 클러스터 47(CD47)은 단백질의 면역글로불린 슈퍼패밀리(superfamily)에 속하는 막관통 수용체이다. CD47은 세포에서 어디에서나 발현되며 자기-인식을 위한 마커로서 역할을 하여, "나를 먹지 마라" 신호로서 작용함으로써 식세포작용을 예방한다. CD47은 트롬보스폰딘(TSP) 및 신호 조절성 단백질-알파(SIRP α)를 비롯한 여러 다른 단백질과의 상호작용을 통해 그 효과를 매개한다. 식세포성 세포 상의 SIRP α와 표적 세포 상의 CD47 간의 상호작용은 표적 세포가 포식되지(engulfed) 않도록 보장한다.

[0006] 특정 암은 암 세포의 세포 표면에서 CD47의 발현을 증가시켜 면역계에 의한 클리어런스(clearance)를 피함으로써 세포의 CD47-기반 면역 회피 메커니즘을 공동-채택한다. 그러나, 대상체에서 CD47-발현 세포를 표적화하는 당업계에 알려진 요법은 암성 및 비-암성 세포 둘 다를 표적화하고, 이는 말초 적혈구 및 혈소판 고갈과 같은 대상체에서의 독성을 초래한다. 따라서, 비-암성 세포를 표적화하지 않고 암 세포에서 CD47을 선택적으로 표적화하는 조성물 및 방법이 필요하다.

**발명의 내용**

[0007] 본 개시내용은 신규한 인간화 항-CD47 항체 및 이의 항원-결합 단편의 발견에 기초한다. 본 발명의 특정 양태에서, CD47 단백질에 대한 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 결합을 예방하는 제거가능한 마스킹제(예컨대, 코일형 코일 마스킹제)를 포함하는 인간화 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 제공된다. 특정 실시양태에서, 마스킹제는 암 세포 환경에 존재하는 하나 이상의 분자(예컨대, 프로테아제)에 의해 제거(예컨대, 절단)될 수 있다. 마스킹제의 제거는 CD47에 결합하는 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 능력을 복원시킬 수 있어, 암 세포의 맥락에서 CD47 단백질에 대한 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 특이적 표적화를 가능하게 한다.

[0008] 일부 실시양태에서, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하되, 항체 또는 항원-결합 단편은 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 16, 19, 21 및 23으로부터 선택된 HCDR1; 서열번호 17, 20, 22 및 24로부터 선택된 HCDR2; 및 서열번호 18의 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 31 및 34로부터 선택된 LCDR1; 서열번호 32 및 35로부터 선택된 LCDR2; 및 서열번호 33 및 36으로부터 선택된 LCDR3을 포함하고; 중쇄 가변 영역은 서열번호 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 경쇄 가변 영역은 서열번호 10, 11, 12, 13, 14 및 15로부터 선택된 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0009] 일부 실시양태에서, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하되, 항체 또는 항원-결합 단편은 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 16, 19, 21 및 23으로부터 선택된 HCDR1; 서열번호 17, 20, 22 및 24로부터 선택된 HCDR2; 및 서열번호 18의 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 31 및 34로부터 선택된 LCDR1; 서열번호 32 및 35로부터 선택된 LCDR2; 및 서열번호 33 및 36으로부터 선택된 LCDR3을 포함하고; 중쇄 가변 영역은

[0010] a) 서열번호 88에 제시된 인간IGHV3-23/HJ4 프레임워크이되, 카바트(Kabat) 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H44, H49, H82, H89, H91 및 H94는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는

[0011] b) 서열번호 89에 제시된 인간IGHV3-48/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H49는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는

[0012] c) 서열번호 90에 제시된 인간IGHV3-66/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H29, H49 및 H82는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는

[0013] d) 서열번호 91에 제시된 인간IGHV3-74/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H49는 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함하며;

[0014] 상기 경쇄 가변 영역은

- [0015] a) 서열번호 92에 제시된 인간 IGKV6-21/KJ2 프레임워크이되, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 L4, L21, L69 및 L85는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는
- [0016] b) 서열번호 93에 제시된 인간 IGKV1-27/KJ2 프레임워크이되, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 L21, L49 및 L69는 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0017] 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 16, 17 및 18; 서열번호 19, 20 및 18; 서열번호 21, 22 및 18; 서열번호 16, 20 및 18; 및 서열번호 23, 24 및 18로부터 선택된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 31, 32 및 33; 서열번호 31, 32 및 36; 및 서열번호 34, 35 및 33으로부터 선택된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 16, 17, 18, 31, 32 및 33; 서열번호 16, 17, 18, 34, 35 및 33; 서열번호 19, 20, 18, 31, 32 및 33; 서열번호 19, 20, 18, 34, 35 및 33; 서열번호 21, 22, 18, 31, 32 및 33; 서열번호 21, 22, 18, 34, 35 및 33; 서열번호 16, 20, 18, 31, 32 및 33; 서열번호 16, 20, 18, 34, 35 및 33; 서열번호 23, 24, 18, 31, 32 및 33; 서열번호 23, 24, 18, 34, 35 및 33; 서열번호 16, 17, 18, 31, 32 및 36; 서열번호 19, 20, 18, 31, 32 및 36; 서열번호 21, 22, 18, 31, 32 및 36; 16, 20, 18, 31, 32 및 36; 및 서열번호 23, 24, 18, 31, 32 및 36으로부터 선택된 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.
- [0018] 일부 실시양태에서, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하되, 항체 또는 항원-결합 단편은 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 25, 28 및 29로부터 선택된 HCDR1; 서열번호 26 및 30으로부터 선택된 HCDR2; 및 서열번호 27의 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 37 및 40으로부터 선택된 LCDR1; 서열번호 38의 LCDR2; 및 서열번호 39 및 41로부터 선택된 LCDR3을 포함하고; 중쇄 가변 영역은 서열번호 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 경쇄 가변 영역은 서열번호 10, 11, 12, 13, 14 및 15로부터 선택된 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0019] 일부 실시양태에서, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하되, 항체 또는 항원-결합 단편은 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 25, 28 및 29로부터 선택된 HCDR1; 서열번호 26 및 30으로부터 선택된 HCDR2; 및 서열번호 27의 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 37 및 40으로부터 선택된 LCDR1; 서열번호 38의 LCDR2; 및 서열번호 39 및 41로부터 선택된 LCDR3을 포함하고; 중쇄 가변 영역은
- [0020] a) 서열번호 88에 제시된 인간 IGHV3-23/HJ4 프레임워크이되, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H44, H49, H82, H89, H91 및 H94는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는
- [0021] b) 서열번호 89에 제시된 인간 IGHV3-48/HJ4 프레임워크이되, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H49는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는
- [0022] c) 서열번호 90에 제시된 인간 IGHV3-66/HJ4 프레임워크이되, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H29, H49 및 H82는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는
- [0023] d) 서열번호 91에 제시된 인간 IGHV3-74/HJ4 프레임워크이되, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H49는 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함하며;
- [0024] 경쇄 가변 영역은
- [0025] a) 서열번호 92에 제시된 인간 IGKV6-21/KJ2 프레임워크이되, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 L4, L21, L69 및 L85는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는
- [0026] b) 서열번호 93에 제시된 인간 IGKV1-27/KJ2 프레임워크이되, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 L21, L49 및 L69는 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 25, 26 및 27; 서열번호 28, 26 및 27; 서열번호 29, 30 및 27; 및 서열번호 29, 26 및 27로부터 선택된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 37, 38 및 39; 서열번호 40, 38 및 39; 및 서열번호 37, 38 및 41로부터 선택된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 25, 26, 27, 37, 38 및 39; 서열번호 25, 26, 27, 40, 38 및 39; 서열번호 25, 26, 27, 37, 38 및 41; 서열번호 28, 26, 27, 37, 38

및 39; 서열번호 28, 26, 27, 40, 38 및 39; 서열번호 28, 26, 27, 37, 38 및 41; 서열번호 29, 30, 27, 37, 38 및 39; 서열번호 29, 30, 27, 40, 38 및 39; 서열번호 29, 30, 27, 37, 38 및 41; 서열번호 29, 26, 27, 37, 38 및 39; 서열번호 29, 26, 27, 40, 38 및 39; 및 서열번호 29, 26, 27, 37, 38 및 41로부터 선택된 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.

[0028] 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 10, 11, 12, 13, 14 및 15로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 서열번호 2 및 10; 서열번호 3 및 11; 서열번호 3 및 12; 서열번호 3 및 13; 서열번호 3 및 14; 서열번호 4 및 11; 서열번호 4 및 12; 서열번호 4 및 13; 서열번호 4 및 14; 서열번호 5 및 11; 서열번호 5 및 12; 서열번호 5 및 13; 서열번호 5 및 14; 서열번호 6 및 11; 서열번호 6 및 12; 서열번호 6 및 13; 서열번호 6 및 14; 서열번호 7 및 11; 서열번호 7 및 12; 서열번호 7 및 13; 서열번호 7 및 14; 서열번호 8 및 11; 서열번호 8 및 12; 서열번호 8 및 13; 서열번호 8 및 14; 서열번호 3 및 15를 포함한다.

[0029] 일부 실시양태에서, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하되, 항체 또는 항원-결합 단편은 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 16의 HCDR1, 서열번호 17의 HCDR2 및 서열번호 18의 HCDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 31의 LCDR1, 서열번호 32의 LCDR2 및 서열번호 33의 LCDR3을 포함하고; 중쇄 가변 영역은 서열번호 3과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 13과 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 항체는 Ab47과 비교하여 적혈구의 감소된 혈구응집반응을 갖는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함한다.

[0030] 본원에 제공된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은

[0031] a) 서열번호 88에 제시된 인간 IGHV3-23/HJ4 프레임워크이되, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H44, H49, H82, H89, H91 및 H94는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는

[0032] b) 서열번호 89에 제시된 인간 IGHV3-48/HJ4 프레임워크이되, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H49는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는

[0033] c) 서열번호 90에 제시된 인간 IGHV3-66/HJ4 프레임워크이되, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H29, H49 및 H82는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는

[0034] d) 서열번호 91에 제시된 인간 IGHV3-74/HJ4 프레임워크이되, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H49는 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함한다.

[0035] 일부 이러한 실시양태에서, 카바트 넘버링에 따른, H29가 F이고, H44가 R 또는 G이고, H49가 A이고, H82가 M 또는 I이고, H89가 I 또는 V이고, H91이 F 또는 Y이고, H94가 R이다.

[0036] 본원에 제공된 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은

[0037] a) 서열번호 92에 제시된 인간 IGKV6-21/KJ2 프레임워크이되, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 L4, L21, L69 및 L85는 공여자 잔기인, 프레임워크; 또는

[0038] b) 서열번호 93에 제시된 인간 IGKV1-27/KJ2 프레임워크이되, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 L21, L49 및 L69는 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함한다.

[0039] 일부 이러한 실시양태에서, 카바트 넘버링에 따른, L4가 M이고, L21이 L이고, L49가 K이고, L69가 T 또는 S이고, L85가 V 또는 T이다.

[0040] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 IgG1 이소타입이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이의 모(parental) 항체와 비교하여 향상된 항체 의존성 세포성 세포독성(ADCC)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이의 모 항체와 비교하여 향상된 항체 의존성 세포성 식세포작용(ADCP)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이의 모 항체와 비교하여 향상된 보체-의존성 세포독성(CDC)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv 단편, 디아바디(diabody), 단일-쇄 항체, scFv 단편 또는 scFv-Fc이다. 일부 실시양태에서, 항체

또는 이의 항원-결합 단편은 생체 외 및/또는 생체 내에서 CD47-발현 세포의 아포토시스(apoptosis)를 유도한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 모 항체와 비교하여 감소된 코어 푸코실화(core fucosylation)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 어푸코실화된(afucosylated)된다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 CD47과 SIRP $\alpha$  사이의 상호작용을 차단한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 Ab47과 비교하여 적혈구의 감소된 혈구응집반응을 갖는다.

[0041] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 일부 실시양태에서, 핵산 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 항원-결합 단편을 발현하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 항원-결합 단편의 제조 방법은 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 단리하는 단계를 추가로 포함한다.

[0042] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법을 제공한다.

[0043] 일부 실시양태에서, 다음을 포함하는, 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법을 제공한다:

[0044] a) 대상체를 CD47-발현 암을 갖는 것으로서 식별하는 단계; 및

[0045] b) 본원에 제공된 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계.

[0046] 일부 이러한 실시양태에서, 단계 a)가 다음을 포함한다:

[0047] i) 암 조직을 단리하는 단계; 및

[0048] ii) 단리된 암 조직에서 CD47을 검출하는 단계.

[0049] 일부 실시양태에서, 다음을 포함하는, 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법을 제공한다:

[0050] a) 대상체를 비-암 조직에 비해 암 조직에서 대식세포 침윤의 상승된 수준을 갖는 것으로서 식별하는 단계; 및

[0051] b) 본원에 제공된 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계.

[0052] 일부 이러한 실시양태에서, 단계 a)가 다음을 포함한다:

[0053] i) 대상체로부터 암 조직 및 주변 비-암 조직을 단리하는 단계;

[0054] ii) 단리된 암 조직 및 비-암 조직에서 대식세포를 검출하는 단계; 및

[0055] iii) 비-암 조직에 대한 암 조직의 염색 양을 비교하는 단계.

[0056] 일부 실시양태에서, 대식세포 염색이 항-CD163 항체로 수행된다.

[0057] 일부 실시양태에서, 암의 치료 방법은 대상체를 CD47-발현 암 및 비-암 조직에 비해 암 조직에서 대식세포 침윤의 상승된 수준을 갖는 것으로서 식별하는 단계를 포함한다.

[0058] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, CD47-발현 세포의 아포토시스 유도 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포는 생체 외에 있는 것이다. 일부 실시양태에서, 세포는 생체 내에 있는 것이다.

[0059] 일부 실시양태에서, 인간 CD47 단백질 및 하나 이상의 마스킹(masking) 도메인에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 마스킹된(masked) 항체를 제공하되, 하나 이상의 마스킹 도메인이 서열번호 44-55, 75-86, 94 및 95로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 마스킹된 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 하나 이상의 마스킹 도메인을 포함하는 마스킹된 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 마스킹 도메인은 서열번호 44-55, 75-86, 94 및 95로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0060] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 마스킹 도메인이, 하나 이상의 마스킹 도메인이 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 인간 CD47 단백질에 대한 항체 또는 항원-결합 단편의 결합 친화도를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 결합 친화도가, 하나 이상의 마스킹 도메인이 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 약 100-배 이상 감소된다. 일부 실시양태에서, 결합 친화도가, 하나 이상의 마스킹 도메인이 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 약 200-배 내지 약 1500-배 감소된다.

- [0061] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하되, 중쇄는 제1 마스킹 도메인에 연결되거나; 경쇄는 제2 마스킹 도메인에 연결되거나; 중쇄는 제1 마스킹 도메인에 연결되고 경쇄는 제2 마스킹 도메인에 연결된다. 일부 실시양태에서, 제1 마스킹 도메인은 서열번호 44, 46, 48, 50, 52, 54, 75, 77, 79, 81, 83, 85 및 94로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고; 제2 마스킹 도메인은 서열번호 45, 47, 49, 51, 53, 55, 76, 78, 80, 82, 84, 86 및 95로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 마스킹 도메인 및 제2 마스킹 도메인은 서열번호 44 및 45; 서열번호 46 및 47; 서열번호 48 및 49; 서열번호 50 및 51; 서열번호 52 및 53; 서열번호 54 및 55; 서열번호 75 및 76; 서열번호 77 및 78; 서열번호 79 및 80; 서열번호 81 및 82; 서열번호 83 및 84; 서열번호 85 및 86; 및 서열번호 94 및 95로부터 선택된 한 쌍의 마스킹 도메인이다. 일부 실시양태에서, 제1 마스킹 도메인은 중쇄의 N-말단에 연결되고 제2 마스킹 도메인은 경쇄의 N-말단에 연결된다.
- [0062] 일부 실시양태에서, 각각의 마스킹 도메인은 프로테아제-절단가능한 링커를 포함하고 프로테아제-절단가능한 링커를 통해 중쇄 또는 경쇄에 연결된다. 일부 실시양태에서, 프로테아제-절단가능한 링커는 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP) 절단 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, MMP 절단 부위는 MMP2 절단 부위, MMP7 절단 부위, MMP9 절단 부위 및 MMP13 절단 부위로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, MMP에 의한 절단 후, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 중쇄 및/또는 경쇄는 MMP 절단 부위의 스템(stub) 아미노산 렘넌트(remnant)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스템 아미노산 렘넌트는 항체의 N 말단에서 서열 LRSG, SG 또는 VR을 포함한다.
- [0063] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 본원에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 마스킹된 항체는 제1 마스킹 도메인에 연결되고 서열번호 42의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 제2 마스킹 도메인에 연결되고 서열번호 43의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.
- [0064] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 마스킹된 항체를 코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 일부 실시양태에서, 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 마스킹된 항체를 발현하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 마스킹된 항체의 생성 방법은 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 마스킹된 항체를 단리하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0065] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 마스킹된 항체의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법을 제공한다.
- [0066] 일부 실시양태에서, 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법을 제공하되,
- [0067] a) 대상체를 주변 비-암 조직에 비해 암에서 MMP의 상승된 수준을 갖는 것으로서 식별하는 단계; 및
- [0068] b) 본원에 제공된 마스킹된 항체의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계이되, 여기서 마스킹된 항체의 각각의 마스킹 도메인이 프로테아제-절단가능한 링커를 포함하고 프로테아제-절단가능한 링커가 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP) 절단 부위를 포함하는, 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, MMP 절단 부위가 MMP2 절단 부위, MMP7 절단 부위, MMP9 절단 부위 및 MMP13 절단 부위로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, MMP가 MMP2, MMP7, MMP9 및 MMP13으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 단계 a)가 다음을 포함한다:
- [0069] i) 대상체로부터 암 조직 및 비-암 조직을 단리하는 단계;
- [0070] ii) 단리된 암 조직 및 비-암 조직에서 MMP를 검출하는 단계; 및
- [0071] iii) 비-암 조직에 대한 암 조직의 염색 양을 비교하는 단계.
- [0072] 일부 실시양태에서, 다음을 포함하는, 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법을 제공한다:
- [0073] a) 대상체를 CD47-발현 암을 갖는 것으로서 식별하는 단계; 및
- [0074] b) 본원에 제공된 마스킹된 항체의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계.
- [0075] 일부 실시양태에서, 단계 a)가 다음을 포함한다:
- [0076] i) 암 조직 단리하는 단계; 및
- [0077] ii) 단리된 암 조직에서 CD47을 검출하는 단계.
- [0078] 일부 실시양태에서, 다음을 포함하는, 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법을 제공한다:
- [0079] a) 대상체를 비-암 조직에 비해 암 조직에서 대식세포 침윤의 상승된 수준을 갖는 것으로서 식별하는 단계; 및

- [0080] b) 본원에 제공된 마스킹된 항체의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계.
- [0081] 일부 실시양태에서, 단계 a)가 다음을 포함한다:
- [0082] i) 대상체로부터 암 조직 및 주변 비-암 조직을 단리하는 단계;
- [0083] ii) 단리된 암 조직 및 비-암 조직에서 대식세포를 검출하는 단계; 및
- [0084] iii) 비-암 조직에 대한 암 조직의 염색 양을 비교하는 단계.
- [0085] 일부 실시양태에서, 대식세포 염색이 항-CD163 항체로 수행된다.
- [0086] 일부 실시양태에서, 대상체를 (a) 주변 비-암 조직에 비해 암에서 MMP의 상승된 수준 및 (b) CD47-발현 암을 갖는 것으로서 식별하는 단계를 포함하는 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체를 (a) 주변 비-암 조직에 비해 암에서 MMP의 상승된 수준 및 (b) 비-암 조직에 비해 암 조직에서 대식세포 침윤의 상승된 수준을 갖는 것으로서 식별하는 단계를 포함하는 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체를 (a) CD47-발현 암, 및 (b) 비-암 조직에 비해 암 조직에서 대식세포 침윤의 상승된 수준을 갖는 것으로서 식별하는 단계를 포함하는 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체를 (a) 주변 비-암 조직에 비해 암에서 MMP의 상승된 수준, (b) CD47-발현 암 및 (c) 비-암 조직에 비해 암 조직에서 대식세포 침윤의 상승된 수준을 갖는 것으로서 식별하는 단계를 포함하는 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법을 제공한다.
- [0087] 일부 실시양태에서, 마스킹된 항체는 프로테아제-절단가능한 링커를 포함하는 하나 이상의 마스킹 도메인을 포함하고, 프로테아제-절단가능한 링커는 중앙 미세환경에서 절단된다. 일부 실시양태에서, 중앙 미세환경에서 프로테아제-절단가능한 링커의 절단 후, 마스킹 도메인은 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 방출된다. 일부 실시양태에서, 프로테아제-절단가능한 링커는 아미노산 서열 IPVSLRSG(서열번호 73) 또는 GPLGVR(서열번호 57)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로테아제-절단가능한 링커는 MMP 절단 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, MMP 절단 부위는 MMP2 절단 부위, MMP7 절단 부위, MMP9 절단 부위 및 MMP13 절단 부위로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 방출 후, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 프로테아제-절단가능한 링커의 스테르브 아미노산 램넨트를 갖는다. 일부 실시양태에서, 스테르브 아미노산 램넨트는 항체의 N 말단에서 LRSG, SG 또는 VR의 서열을 포함한다.
- [0088] 다양한 실시양태에서, CD47-발현 암은 혈액암 또는 고형암이다. 일부 실시양태에서, CD47-발현 암은 비-호지킨 림프종, B-림프모구성 림프종; B 세포 만성 림프구성 백혈병/소 림프구성 림프종, 리히터 증후군(Richter's syndrome), 여포성 림프종, 다발성 골수종, 골수섬유증, 진성 다혈구증, 피부 T 세포 림프종, 의미 불명 단클론성 감마글로불린병증(monoclonal gammopathy of unknown significance(MGUS)), 골수이형성 증후군(MDS), 면역모구성 대세포 림프종, 전구 B 림프모구성 림프종, 급성 골수성 백혈병(AML) 및 역형성 대세포 림프종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, CD47-발현 암은 폐암, 췌장암, 유방암, 간암, 난소암, 고환암, 신장암, 방광암, 척수암, 뇌암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 결장 직장암, 항문암, 자궁 내막암, 식도암, 담낭암, 위장관암, 위암(gastric cancer), 암종, 두경부암, 피부암, 흑색종, 전립선암, 뇌하수체암, 위암(stomach cancer), 자궁암, 질암 및 갑상선암으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, CD47-발현 암이 폐암, 육종, 결장 직장암, 두경부암, 난소암, 췌장암, 위암, 흑색종 및 유방암으로부터 선택된다.
- [0089] 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 마스킹된 항체는 하나 이상의 프로그램된 세포 사멸 단백질 1(PD-1), 프로그램된 사멸-리간드 1(PD-L1), PD-L2, 세포독성 T 림프구-연관 단백질 4(CTLA-4), T 세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인 함유 3(TIM-3), 림프구 활성화 유전자 3(LAG-3), 암배아성 항원 관련 세포 부착 분자 1(CEACAM-1), CEACAM-5, T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제자(VISTA), B 및 T 림프구 약화인자(BTLA), Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체(TIGIT), 백혈구-연관 면역글로불린-유사 수용체 1(LAIR1), CD160, 2B4 또는 TGFR로부터 선택된 면역 체크포인트(checkpoint) 분자의 억제제와 병용하여 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 마스킹된 항체는 작용성(agonistic) 항-CD40 항체와 조합하여 투여된다. 일부 실시양태에서, 작용성 항-CD40 항체는 낮은 푸코실화 수준을 갖거나 어푸코실화된다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 마스킹된 항체는 항체 약물 접합체(ADC)와 병용하여 투여되고, 여기서 ADC의 항체는 암 세포의 세포 외 표면에서 발현되는 단백질에 특이적으로 결합하고, 항체는 세포독성제를 포함하는 약물-링커에 접합된다. 일부 실시양태에서, 세포독성제는 아우리스 타틴이다. 일부 실시양태에서, ADC의 항체는 vcMMAE 및 mcMMAF로부터 선택된 약물-링커에 접합된다.

- [0090] 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 마스킹된 항체의 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이의 모 항-CD47 항체와 비교하여 생체 외에서 감소된 혈구응집반응을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 모 항체는 Ab47이다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체의 투여는 대상체에서 혈구응집반응을 유도하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체는 생체 외 및/또는 생체 내에서 CD47-발현 세포의 아포토시스를 유도한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체는 생체 내에서 CD47-발현 세포의 아포토시스를 유도한다. 일부 실시양태에서, CD47-발현 세포는 암 세포이다.
- [0091] 일 양태에서, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하되, 항체 또는 항원-결합 단편이 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역이 서열번호 16(GYGMs), 17(TITSGGTYTYYPDSVKG) 및 18(SLAGNAMDY)로서 제시된 CDR, 및 서열번호 88에 제시된 인간 IGHV3-23/HJ4 프레임워크[도 1a]를 포함하며, 여기서 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H44, H49, H82, H89, H91 및 H94는 공여자 잔기인, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0092] 다른 양태에서, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하되, 항체 또는 항원-결합 단편이 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역이 서열번호 16(GYGMs), 17(TITSGGTYTYYPDSVKG) 및 18(SLAGNAMDY)로서 제시된 CDR, 및 서열번호 89에 제시된 인간 IGHV3-48/HJ4 프레임워크[도 1b]를 포함하며, 여기서 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H49는 공여자 잔기인, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0093] 또 다른 양태에서, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하되, 항체 또는 항원-결합 단편이 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역이 서열번호 16(GYGMs), 17(TITSGGTYTYYPDSVKG) 및 18(SLAGNAMDY)로서 제시된 CDR, 및 서열번호 90에 제시된 인간 IGHV3-66/HJ4 프레임워크[도 1c]를 포함하며, 여기서 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H29, H49 및 H82는 공여자 잔기인, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0094] 또 다른 양태에서, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하되, 항체 또는 항원-결합 단편이 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역이 서열번호 16(GYGMs), 17(TITSGGTYTYYPDSVKG) 및 18(SLAGNAMDY)로서 제시된 CDR, 및 서열번호 91에 제시된 인간 IGHV3-74/HJ4 프레임워크[도 1d]를 포함하며, 여기서 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H49는 공여자 잔기인, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0095] 또 다른 양태에서, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하되, 항체 또는 항원-결합 단편이 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역이 서열번호 31(RASQTISDYLH), 32(FASQsIS) 및 33(QNGHGFPRt)으로서 제시된 CDR; 및 서열번호 92에 제시된 인간 IGKV6-21/KJ2 프레임워크[도 1g]를 포함하며, 여기서 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 L4, L21, L69 및 L85는 공여자 잔기인, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0096] 또 다른 양태에서, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하되, 항체 또는 항원-결합 단편이 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역이 서열번호 31(RASQTISDYLH), 32(FASQsIS) 및 33(QNGHGFPRt)으로서 제시된 CDR; 및 서열번호 93에 제시된 인간 IGKV1-27/KJ2 프레임워크[도 1h]를 포함하며, 여기서 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 L21, L49 및 L69는 공여자 잔기인, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0097] 실시양태에서, 카바트 넘버링에 따른, 프레임워크 위치 L4는 M에 의해 점유되고, L21은 L에 의해 점유되고, L49는 K에 의해 점유되고, L69는 T 또는 S에 의해 점유되고, L85는 V 또는 T에 의해 점유된다.
- [0098] 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8 중 어느 하나에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(HCVR), 및 서열번호 10, 11, 12, 13, 14 및 15 중 어느 하나에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함한다.
- [0099] 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 카바트 넘버링에 따른 LCDR3에서 G91A 돌연변이를 추가로 포함한다.
- [0100] 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 IgG1 이소타입이다.
- [0101] 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 이의 모 항체와 비교하여 향상된 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 갖는다.
- [0102] 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 이의 모 항체와 비교하여 향상된 항체 의존성 세포성 식세포작용

(ADCP)을 갖는다.

- [0103] 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 이의 모 항체와 비교하여 감소된 코어 푸코실화를 갖는다.
- [0104] 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 CD47과 SIRP $\alpha$  사이의 상호작용을 차단한다.
- [0105] 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 이의 모 항체와 비교하여 적혈구의 감소된 혈구응집반응을 갖는다.
- [0106] 일 양태에서, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 서열을 제공한다.
- [0107] 실시양태에서, 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv 단편, 디아바디, 단일-쇄 항체, scFv 단편 또는 scFv-Fc를 포함한다.
- [0108] 일 양태에서, 마스킹제(또한, "마스킹 도메인"으로서 지칭됨)를 포함하는 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법을 제공하되, 마스킹제는 마스킹제가 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 인간 CD47에 대한 항체 또는 항원-결합 단편의 결합 친화도를 감소시키는 하나 이상의 코일형 코일 펩티드를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0109] 실시양태에서, 프로테아제-절단가능한 링커는 마스킹제를 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 부착시킨다.
- [0110] 실시양태에서, 프로테아제-절단가능한 링커는 IPVSLRSG(서열번호 73) 또는 GPLGVR(서열번호 57)을 포함하는 아미노산 서열을 갖는다.
- [0111] 실시양태에서, 프로테아제-절단가능한 링커는 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP) 절단 부위를 포함한다.
- [0112] 실시양태에서, MMP 절단 부위는 MMP2 절단 부위, MMP7 절단 부위, MMP9 절단 부위 및 MMP13 절단 부위로부터 선택된다.
- [0113] 실시양태에서, 마스킹제는 MMP에 의한 종양 미세환경에서 MMP 절단 부위의 절단 후에 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 방출된다.
- [0114] 실시양태에서, 절단된 항-CD47 항체는 MMP 절단 부위의 스테브 아미노산 램넛트를 갖는다.
- [0115] 실시양태에서, 스테브 아미노산 램넛트는 항체의 N 말단에서 LRSG, SG 또는 VR의 서열을 포함한다.
- [0116] 실시양태에서, 하나 이상의 코일형 코일 펩티드는 서열번호 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 및 55로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함한다. 실시양태에서, 하나 이상의 코일형 코일 펩티드는 서열번호 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 및 86으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함한다. 실시양태에서, 하나 이상의 코일형 코일 펩티드는 서열번호 94 및 95로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함한다.
- [0117] 실시양태에서, CD47에 대한 항체 또는 항원-결합 단편 결합은 마스킹제가 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 약 100-배 이상 감소된다.
- [0118] 실시양태에서, CD47에 대한 항체 또는 항원-결합 단편 결합은 마스킹제가 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 약 200-배 내지 약 1500-배 감소된다.
- [0119] 실시양태에서, CD47-발현 암은 고형암을 유발하는 혈액암이다.
- [0120] 실시양태에서, 혈액암은 비-호지킨 림프종, B 림프모구성 림프종; B 세포 만성 림프구성 백혈병/소 림프구성 림프종, 리히터 증후군, 여포성 림프종, 다발성 골수종, 골수섬유증, 진성 다혈구증, 피부 T 세포 림프종, 의미 불명 단클론성 감마글로불린병증(MGUS), 골수이형성 증후군(MDS), 면역모구성 대세포 림프종, 전구 B 림프모구성 림프종, 급성 골수성 백혈병(AML) 및 역형성 대세포 림프종으로부터 선택된다.
- [0121] 실시양태에서, CD47-발현 암은 고형 종양이다.
- [0122] 실시양태에서, 고형 종양은 폐암, 췌장암, 유방암, 간암, 난소암, 고환암, 신장암, 방광암, 척수암, 뇌암, 자궁경부암, 자궁 내막암, 결장 직장암, 항문암, 자궁 내막암, 식도암, 담낭암, 위장관암, 위암(gastric cancer), 육종, 두경부암, 흑색종, 피부암, 전립선암, 뇌하수체암, 위암(stomach cancer), 자궁암, 질암 및 갑상선암으로부터 선택된다.
- [0123] 실시양태에서, 고형 종양은 폐암, 육종, 난소암, 췌장암, 위암, 흑색종, 결장 직장암, 두경부암 및 유방암으로

부터 선택된다.

- [0124] 실시양태에서, 대상체는 고행암을 겪는 인간이다.
- [0125] 실시양태에서, 항-CD47 항체는 하나 이상의 프로그램된 세포 사멸 단백질 1(PD-1), 프로그램된 사멸-리간드 1(PD-L1), PD-L2, 세포독성 T 림프구-연관 단백질 4(CTLA-4), T 세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인 함유 3(TIM-3), 림프구 활성화 유전자 3(LAG-3), 암배아성 항원 관련 세포 부착 분자 1(CEACAM-1), CEACAM-5, T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제자(VISTA), B 및 T 림프구 약화인자(BTLA), Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체(TIGIT), 백혈구-연관 면역글로불린-유사 수용체 1(LAIR1), CD160, 2B4 또는 TGFR로부터 선택된 면역체크포인트 분자의 억제제와 병용하여 투여된다.
- [0126] 일 양태에서, 마스킹제를 포함하는 인간 CD47 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하되, 마스킹제는 서열번호 95(QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLGS) 및/또는 서열번호 94(QGASTSVDELQAEVDQLEEDENYALKTKVAQLRKKVEKLG)의 서열을 포함하는 하나 이상의 코일형 코일 펩티드를 포함하고, 하나 이상의 코일형 코일 펩티드는 마스킹제가 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 인간 CD47 단백질에 대한 항체 또는 항원-결합 단편의 결합 친화도가 감소된, 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0127] 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8 중 어느 하나에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및 서열번호 10, 11, 12, 13, 14 및 15 중 어느 하나에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함한다.
- [0128] 실시양태에서, 마스킹제는 프로테아제-절단가능한 링커를 통해 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 부착된다.
- [0129] 실시양태에서, 프로테아제-절단가능한 링커는 IPVSLRSG(서열번호 73) 또는 GPLGVR(서열번호 57)을 포함하는 아미노산 서열을 갖는다.
- [0130] 실시양태에서, 프로테아제-절단가능한 링커는 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP) 절단 부위를 포함한다.
- [0131] 실시양태에서, MMP 절단 부위는 MMP2 절단 부위, MMP7 절단 부위, MMP9 절단 부위 및 MMP13 절단 부위로부터 선택된다.
- [0132] 실시양태에서, 마스킹제는 MMP에 의한 MMP 절단 부위의 절단 후에 항-CD47 항체로부터 제거된다.
- [0133] 실시양태에서, 항-CD47 항체는 MMP에 의한 MMP 절단 부위의 절단 후에 MMP 절단 부위의 스테브 아미노산 레몬트를 갖는다.
- [0134] 실시양태에서, 스테브 아미노산 레몬트는 항체의 N 말단에서 LRSG, SG 또는 VR의 서열을 포함한다.
- [0135] 실시양태에서, 결합은 마스킹제가 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 약 100-배 이상 감소된다.
- [0136] 실시양태에서, 결합은 마스킹제가 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 약 200-배 내지 약 1500-배 감소된다.
- [0137] 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호 42의 중쇄 서열 및 서열번호 43의 경쇄 서열을 포함한다.
- [0138] 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 ADCC 및/또는 CDC 활성으로부터 선택된 향상된 효과기(effector) 기능을 부여하는 변이체 Fc 영역을 포함한다.
- [0139] 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 어푸코실화된다.
- [0140] 일 양태에서, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하되, 항체가 IgG1 이소타입인, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0141] 실시양태에서, 항체는 향상된 ADCC, 향상된 ADCP 및/또는 향상된 CDC 활성을 포함한다.
- [0142] 일 양태에서, 다음의 단계를 포함하는, 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법을 제공한다:
- [0143] a) 대상체를 주변 비-암 조직에 비해 암에서 MMP의 상승된 수준을 갖는 것으로서 식별하는 단계; 및
- [0144] b) 마스킹제를 포함하는 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계이 되, 여기서, 마스킹제는, 대상체가 주변 비-암 조직에 비해 암에서 MMP의 상승된 수준을 갖는 경우 마스킹제가 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 인간 CD47에 대한 항체 또는 항원-결합 단편의 결합 친화도를 감소시키는 코일형 코일 펩티드를 포함하는, 단계.

- [0145] 실시양태에서, MMP는 MMP2, MMP7, MMP9 및 MMP13으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0146] 실시양태에서, 단계 a)는 다음을 포함한다:
- [0147] i) 대상체로부터 암 조직 및 비-암 조직을 단리하는 단계;
- [0148] ii) 단리된 암 조직 및 비-암 조직에서 MMP를 검출하는 단계; 및
- [0149] iii) 비-암 조직에 대한 암 조직의 염색 양을 비교하는 단계.
- [0150] 일 양태에서, 다음의 단계를 포함하는, 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법을 제공한다:
- [0151] a) 대상체를 주변 비-암 조직에 비해 암에서 CD47의 상승된 수준을 갖는 것으로서 식별하는 단계; 및
- [0152] b) 마스킹제를 포함하는 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계이 되, 여기서, 마스킹제는, 대상체가 주변 비-암 조직에 비해 암에서 CD47의 상승된 수준을 갖는 경우 마스킹제가 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 인간 CD47에 대한 항체 또는 항원-결합 단편의 결합 친화도를 감소시키는 코일형 코일 펩티드를 포함하는, 단계.
- [0153] 실시양태에서, 단계 a)는 다음을 포함한다:
- [0154] i) 대상체로부터 암 조직 및 주변 비-암 조직을 단리하는 단계;
- [0155] ii) 단리된 암 조직 및 주변 비-암 조직에서 CD47을 검출하는 단계; 및
- [0156] iii) CD47 염색 비-암 조직에 비해 암 조직에서 CD47 염색의 양을 비교하는 단계.
- [0157] 일 양태에서, 다음의 단계를 포함하는, 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법을 제공한다:
- [0158] a) 대상체를 비-암 조직에 비해 암 조직에서 대식세포 침윤의 상승된 수준을 갖는 것으로서 식별하는 단계; 및
- [0159] b) 마스킹제를 포함하는 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계이 되, 여기서, 마스킹제는, 대상체가 비-암 조직에 비해 암에서 대식세포 침윤의 상승된 수준을 갖는 경우 마스킹제가 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 인간 CD47에 대한 항체 또는 항원-결합 단편의 결합 친화도를 감소시키는 하나 이상의 코일형 코일 펩티드를 포함하는, 단계.
- [0160] 실시양태에서, 단계 a)는 다음을 포함한다:
- [0161] i) 대상체로부터 암 조직 및 주변 비-암 조직을 단리하는 단계;
- [0162] ii) 단리된 암 조직 및 비-암 조직에서 대식세포를 검출하는 단계; 및
- [0163] iii) 비-암 조직에 대한 암 조직의 염색 양을 비교하는 단계.
- [0164] 실시양태에서, 대식세포 염색은 항-CD163 항체로 수행된다.
- [0165] 일 양태에서, 서열번호 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8 중 어느 하나에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(HCVR) 및 서열번호 10, 11, 12, 13, 14 및 15 중 어느 하나에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함하는, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0166] 일 양태에서, 본 발명의 마스킹된 CD47 항체와 작용성 CD40 항체의 조합을 투여함으로써 암을 치료하는 방법.
- [0167] 실시양태에서, 작용성 CD40 항체, 예컨대, SEA-CD40 항체는 낮은 푸코실화 수준을 갖는다.
- [0168] 일 양태에서, 제37항의 마스킹된 CD47 항체와 항체 약물 접합체(ADC)의 조합을 투여함으로써 암을 치료하는 방법을 제공한다. ADC의 항체가 암 세포의 세포 외 표면에서 발현된 단백질에 특이적으로 결합하고 항체가 세포독성제를 포함하는 약물-링커에 접합되는 방법을 제공한다.
- [0169] 실시양태에서, 세포독성제는 아우리스타틴이다.
- [0170] 실시양태에서, ADC의 항체는 vcMMAE 및 mcMMAF로부터 선택된 약물 링커에 접합된다.
- [0171] 상기 기술된 개시내용의 요약은 비-제한적이며, 개시된 항체의 다른 특징 및 이점 및 이들의 제조 및 사용 방법

은 하기 도면, 상세한 설명, 실시예 및 청구범위로부터 명백할 것이다.

**도면의 간단한 설명**

[0172]

**도 1a-도 1j**는 항체 서열 정렬을 도시한다. 도 1a는 hB6H12 중쇄 변이체와 인간 VH 공여자 서열 HV3-23/HJ4의 서열 정렬을 보여준다. 도 1b는 hB6H12 중쇄 변이체와 인간 VH 공여자 서열 HV3-48/HJ4의 서열 정렬을 보여준다. 도 1c는 hB6H12 중쇄 변이체와 인간 VH 공여자 서열 HV3-66/HJ4의 서열 정렬을 보여준다. 도 1d는 hB6H12 중쇄 변이체와 인간 VH 공여자 서열 HV3-74/HJ4의 서열 정렬을 보여준다. 도 1e는 hB6H12 중쇄 변이체의 서열 정렬을 보여준다. 도 1f는 mB6H12 및 Ab47과 비교하여 hB6H12.3 중쇄(hvH1)의 서열 정렬을 보여준다. 도 1g는 hB6H12 경쇄 변이체와 인간 VH 공여자 서열 KV1-3/KJ2의 서열 정렬을 보여준다. 도 1h는 hB6H12 경쇄 변이체와 인간 VH 공여자 서열 KV1-27/KJ2의 서열 정렬을 보여준다. 도 1i는 hB6H12 경쇄 변이체의 서열 정렬을 보여준다. 도 1j는 mB6H12 및 Ab47과 비교하여 hB6H12.3 경쇄(hvK3)의 서열 정렬을 보여준다.

**도 2a-2c**는 항체 결합 친화도 및 동역학을 도시한다. 도 2a는 예시적인 항-CD47 항체를 이용한 CD47 포화 세포성 FACS를 보여준다. 도 2b는 예시적인 항-CD47 항체를 이용한 CD47 포화 ELISA를 보여준다. 도 2c는 예시적인 항-CD47 항체를 이용한 CD47 결합 동역학을 보여준다.

**도 3a-도 3b**는 항체-매개 식세포작용을 도시한다. 도 3a 및 도 3b는 예시적인 항-CD47 항체를 이용한 CD47+ 인간 적혈구(RBC)의 항체-매개 식세포작용을 보여준다.

**도 4a-도 4b**는 항체-매개 혈구응집반응을 도시한다. 도 4a는 분산된 비-침강 RBC 형성의 이미지 캡처를 보여준다. 도 4b는 항-CD47 항체 Ab47 및 hB6H12.3를 이용한 RBC의 혈구응집반응 백분율을 보여준다.

**도 5a-도 5b**는 Fc $\gamma$  수용체의 항체-매개 활성화를 도시한다. NFAT 루시퍼라제 리포터 활성은 Fc $\gamma$ RI(도 5a) 또는 고 친화도 Fc $\gamma$ RIIIa-H(도 5b)로 형질주입되고 마우스 B6H12, Ab47 또는 hB6H12.3으로 증가된 농도로 코팅된 WIL2S 세포에 노출된 Jurkat 세포로부터 측정되었다.

**도 6a-도 6b**는 NK 세포-매개 ADCC 및 Fc $\gamma$ RIIIa의 활성화를 도시한다. mB6H12, Ab47 또는 hB6H12.3으로 코팅된 크롬-로딩된 WIL2S 세포를 Fc $\gamma$ RIIIa의 고 친화도 V/V 변이체를 안정적으로 발현하는 Jurkat 세포에 노출시키고 수용체 활성화는 NFAT-유도 루시퍼라제 활성으로서 평가하였다. ADCC(도 6a) 및 Fc $\gamma$ RIIIa 활성화(도 6b)를 mB6H12, Ab47 및 hB6H12.3 간에 비교하였다.

**도 7a-도 7d**는 항-CD47 항체의 억제자 기능을 도시한다. 중앙 연관된 대식세포(TAM) 표현형을 갖는 분화된 단핵구는 항-CD47 항체에 노출되는 경우 대식세포 활성화 마커 CD86(도 7a) 및 MHCII(도 7b)의 증가된 수준을 보여준다. TCR-매개 T 세포 활성화는 T 세포에서 MHCII(도 7c) 및 IFN $\gamma$  분비(도 7d)의 상향 조절을 검출함으로써 평가하였다.

**도 8a-도 8d**는 hB6H12.3과 항-CD47 항체 5F9 간의 비교를 도시한다. Fc $\gamma$ RI 활성화는 NFAT 루시퍼라제 리포터 Jurkat 세포에서 평가하였다(도 8a). Fc $\gamma$ RII 활성화는 NFAT 루시퍼라제 리포터 Jurkat 세포에서 평가하였다(도 8b). NK-매개 ADCC 활성을 측정하였다(도 8c). T 세포 IFN $\gamma$  분비를 평가하였다(도 8d).

**도 9a-도 9b**는 MMP2 재-활성화된 마스킹된 항체에 대한 질량 분석 데이터를 도시한다. 제조한 인간 MMP2를 이용한 절단 전(도 9a) 및 이후(도 9b)의 Ve1-IPV-hB6H12.3에 대한 디콘볼루션된(deconvoluted) 경쇄 질량. 온전한 경쇄에 대한 예상 m/z는 28681(관측치: 28680.8)이다. MMP2-절단 항체(LRSG-hB6H12.3)에 대한 예상 m/z는 23969(관측치: 23968.4)이다.

**도 10**은 SW780 인간 방광암 세포에 대한 항-CD47 항체의 포화 결합을 도시한다. Ve1-IPV-마스킹된 hB6H12 항체를 MMP2 사전-활성화된 비교자(comparator)와 함께 테스트하였다. 절단된 Ve1-IPV-항체는 항체 N-말단에서 램넨트 LRSG 서열을 보유하였다.

**도 11**은 SW780 인간 방광암 세포에 대한 항-CD47 항체의 포화 결합을 도시한다. Ve1-IPV-마스킹된 hB6H12 항체를 MMP2 사전-활성화된 비교자와 함께 테스트하였다. 절단된 Ve1-IPV 및 스테브-IPV 항체는 항체 N-말단에서 램넨트 LRSG 서열을 보유하였다. 스테브-IPV 항체는 제조합적으로 생성된 반면, 절단된 항체는 MMP2에 의한 절단을 통해 생성하였다.

**도 12**는 인간 적혈구에 대한 항-CD47 항체의 포화 결합을 도시한다. Ve1-IPV 마스킹된 hB6H12 항체를 재-활성화된 비교자(스테브 IPV-hB6H12.3 또는 MMP2-절단된 Ve1-IPV-hB6H12.3)와 함께 테스트하였다. 절단된 Ve1-IPV 및 스테브-IPV 항체는 항체 N-말단에서 램넨트 LRSG 서열을 보유하였다. 스테브-IPV 항체는 제조합적으로 생성

된 반면, 절단된 항체는 MMP2에 의한 절단을 통해 생성하였다.

**도 13**은 검출된 ELISA에 의한 rhCD47에 대한 항-CD47 항체의 포화 결합을 도시한다. Ve1-IPV-hB6H12.3은 유하게 손상된 결합을 나타냈다. 결합은 rhMMP2에 의한 절단시 회복될 수 있다.

**도 14**는 ELISA에 의해 검출된 바와 같이 rhCD47에 대한 항-CD47 항체의 포화 결합을 도시한다. hB6H12.3 및 hB6H12.3 G91A 둘 다는 Ab47보다 높은 B<sub>max</sub>를 나타낸다.

**도 15**는 SW780 인간 방광암 세포에 대한 항-CD47 항체의 포화 결합을 도시한다. Ab47 및 hB6H12.3의 결합을 CDR-L3에서 G91A 돌연변이를 갖는 변이체와 비교하였다.

**도 16**은 인간 적혈구에 대한 항-CD47 항체의 포화 결합을 도시한다. Ab47 및 hB6H12.3의 결합을 CDR-L3에서 G91A 돌연변이를 갖는 변이체와 비교하였다.

**도 17a-도 17b**는 NSG 마우스에서 L428 이종이식편 종양 모델에서 항-CD47 항체의 활성을 도시한다. 항체를 1 또는 10 mg/kg으로 4 회 용량 동안 매 4 일 마다(every four days for four doses(q4dx4)) 복강내(i.p.) 투여하였다(도 17a). 항-F4/80 대식세포 마커를 사용한 종양 조직의 분석은 L428 이종이식편 종양 모델에서 무린 대식세포의 존재를 보여준다(도 17b).

**도 18a-도 18d**는 NSG 마우스에서 L428 이종이식편 종양 모델에서 항-CD47 항체의 활성을 도시한다. 항체를 1 또는 10 mg/kg으로 q4dx4 i.p. 투여하였다(도 18a). 항-F4/80 대식세포 마커를 사용한 종양 조직의 분석은 디트로이트(Detroit) 562 이종이식편 종양 모델에서 무린 대식세포의 존재를 나타내었다(도 18b). NSG 마우스에서 SUDHL8 이종이식편 종양 모델에서 항-CD47 항체의 활성을 또한 분석하였다(도 18c). 항체를 1 또는 10 mg/kg으로 q4dx4 i.p. 투여하였다. 항-F4/80 대식세포 마커를 사용한 종양 조직의 분석은 SUDHL8 이종이식편 종양 모델에서 무린 대식세포의 존재를 보여준다(도 18d).

**도 19a-도 19d**는 내재성(intrinsic) 대식세포 저 함량을 갖는 종양 모델에서 항-CD47 항체의 활성을 도시한다. HT1080 섬유육종 암 모델(도 19a & 도 19b) 및 HepG2 간세포 암 모델(도 19c & 도 19d)이 도시된다. 항체를 10 mg/kg으로 q4dx4 i.p. 투여하였다. 항-F4/80 대식세포 마커를 사용한 종양 조직의 분석은 HT1080 섬유육종 암 모델(도 19b) 및 HepG2 간세포 암 모델(도 19d)에서 무린 대식세포의 존재를 보여준다.

**도 20**은 내재성 대식세포 저 함량을 갖는 종양 모델에서 항-CD47 항체의 활성을 도시하며, 이는 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE) 항체-약물 접합체(ADC)(대식세포 침윤을 유도하는 것으로 알려져 있음)와 조합되는 경우 증폭될 수 있다. 항-CD47 항체를 MMAE ADC와 함께 1 mg/kg으로 1 회 제공되는 동안 5 mg/kg으로 q4dx4 i.p. 투여하였다.

**도 21a-도 21b**는 마우스 반응성 항-CD47 항체, mIAP301이 인간 hB6H12.3 항체에 사용된 것과 동일한 VE1 및 IPV 서열을 사용하여 마스킹될 수 있음을 도시한다(도 21a). 이들 물을 이용한 마스킹은 무린 CD47-양성 종양에 대한 항체 결합을 차단하였고(도 21b), RBC 식세포작용에 의해 측정된 바와 같이 기능성(functionality)을 예방하였다. 내재성 대식세포 저 함량을 갖는 종양 모델에서, 항-CD47 항체를 MMAE ADC와 함께 1 mg/kg으로 1 회 제공하는 동안 5 mg/kg으로 q4dx4 i.p. 투여하였다.

**도 22a-도 22b**는 BALB/c 마우스에 투여된 <sup>3</sup>H-표지된 모 및 마스킹된 항체를 도시한다. 항체를 섬광 계수(scintillation counting)에 의해 모니터링하였다. 마우스 혈소판 계수(도 22a) 및 무린 항체 약동학(도 22b)을 도시한다. 도 22b에서, mIAP301 항체의 분석 시점은 항체의 최종 투여 24 시간 후이었다.

**도 23a-도 23d**. 항-마우스 CD47 항체 mIAP301은 A20 림프종 모델에서 항종양 활성을 유도하였으나, 동시에 RBC 고갈을 유발하였다(도 23a). 마스킹된 Ve1-IPV-mIAP301 항체는 유사한 활성을 부여하였으나, RBC 고갈에 대한 영향을 제거하였다(도 23b). Ve1-IPV-mIAP301은 RBC 항원 싱크를 피했지만, 종양 결합을 유지하였다(도 23c & 도 23d).

**도 24**는 항-마우스 CD47 항체 mIAP301이 MC38 결장암 모델에서 항종양 활성을 유도하며, 이는 면역 종양학(I/O) 작용제에 대해 반응성인 것으로 알려져 있음을 도시한다. 이 모델에서 마스킹된 mIAP301 항체의 활성은 완전한 반응을 보이는 동물이 나타내는 바와 같이 우수한 효능을 나타냈다. 이 동물의 제-도전은 장기 기억 T 세포 반응의 유도를 나타내는 종양의 완전한 거부를 초래하였다.

**도 25a-도 25b**. 모 항체 및 마스킹된 항-무린 CD47 항체 mIAP301은 항-PD-1 대응 항체와 함께 증가된 항-종양 활성을 유도하였으며, 이는 완전한 반응(CR)을 나타내는 4/6 동물을 유발하였다(도 25a). 모 항체 및 마스킹된

항-뮤린 CD47 항체 mIAP301은 대식세포 활성화 CD40 표적화된 SEA-항상된 대용 항체 1C10과 함께 증가된 항-종양 활성을 유도하였다(도 25b).

**도 26**은 투여 3일 후에 BALB/c 마우스에서 다양한 코일형 코일, 인간화 B6H12 변이체의 안정성을 도시한다. 안정성은 감소된 SDS-PAGE에 의해 마스킹된 및 마스킹되지 않은 중쇄의 분리 후 웨스턴 블롯 밀도 측정법에 의해 평가하였다.

**도 27a-도 27b.** 인간화 IgG1 hB6H12 "Ab47"의 0.1, 1, 10 또는 30 mg/kg의 단일 IV 볼루스 용량에 따른 적혈구 수준을 검출하였다(도 27a). 1 mg/kg 초과 용량은 용인되지 않았으며, 모든 용량 수준에서 동물은 용혈 및 테스트 물품을 이용한 치료로 인한 임상적 징후를 나타냈다. Vel-IPV 마스킹된 대안적인 인간화 IgG1 hB6H12 "Ab47"의 0.1, 1 또는 10 mg/kg의 단일 IV 볼루스 용량에 따른 적혈구 수준을 도시하며, 이는 테스트된 최대 용량 수준에서 대략 10-배 증가된 내약성을 나타낸다(도 27b). Vel-IPV-Ab47의 모든 용량은 용인되며, 임상적 징후는 임의의 용량 수준에서 검출되지 않았다.

**도 28**은 Ab47 및 Vel-IPV-Ab47의 1 mg/kg의 단일 IV 볼루스 용량에 따른 순환 항체 수준을 도시한다. Ab47의 1 mg/kg 용량은 연구 3 일에 제네릭 TAB(총 항체) 검정에 대한 검출 한계 미만인 반면, 1 mg/kg의 Vel-IPV-Ab47은 연구 15일로 종료되는 연구의 전체 과정을 통해 검출가능하였다.

**도 29**는 Ab47, hB6H12.3 또는 대조군의 1 mg/kg의 단일 IV 볼루스 용량에 따른 적혈구 수준을 도시한다. Ab47 및 hB6H12.3 둘 다는 적혈구의 고갈을 입증하였다.

**도 30**은 Ab47, hB6H12.3 또는 대조군의 1 mg/kg의 단일 IV 볼루스 용량에 따른 혈소판 수준을 도시한다. Ab47은 투여-전 혈소판 수준의 60% 감소를 나타낸 반면, hB6H12.3은 20% 초과 혈소판 감소를 보이지 않았으며, 이는 대조군의 경우에도 또한 관찰되었다. Ab47 및 hB6H12.3 둘 다는 7 일차부터 연구 종료인 15 일차까지 상승된 혈소판을 유발하였다.

**도 31**은 Vel-IPV-hB6H12.3의 10 또는 20 mg/kg의 단일 IV 볼루스 용량에 따른 적혈구 수준을 도시하며, 이는 1 mg/kg으로 마스킹되지 않은 hB6H12.3에 비해 대략 20-배 증가된 내약성을 나타냈다. 혈액학적 파라미터에 의한 향상된 내약성뿐만 아니라, 임상적 징후가 마스킹된 항체 처리 군에서 관찰되지 않았지만, 마스킹되지 않은 hB6H12.3의 경우 1 mg/kg에서 관찰되었다.

**도 32**는 Vel-IPV-hB6H12.3의 20 mg/kg, SEA-Vel-IPV-hB6H12.3의 20 mg/kg, hB6H12.3의 1 mg/kg, 및 기준을 위한 대조군의 단일 IV 볼루스 용량에 따른 적혈구 수준을 도시한 것이다. SEA 및 비-SEA 마스킹된 hB6H12.3 항체 둘 다는 항체 공학을 통한 효과기 기능성 향상에도 불구하고 유사하게 용인되었다.

**도 33**은 유방암 및 정상 유방 조직 샘플에서 항-CD163 항체를 사용한 면역조직화학을 통한 대식세포 검출을 도시한다.

**도 34**는 M11, M15 및 Vel 코일형 코일 서열을 도시한다. 또한 MMP2 절단 서열을 도시한다.

**도 35a-도 35b** 세포 배양 시스템 내에 존재하는 것과 비교하여 선별된 뮤린 및 인간 암에서의 종양 MMP 수준.

**도 36a-도 36b**는 Liv1A ADC에 대한 유방암 이중이식편 모델 MCSF7 및 CD30 ADC에 대한 L428 림프종 모델에서 항-CD47 항체와 함께 선별된 MMAE 함유 아우리스타틴(LIV1A 및 CD30)을 도시한다.

**도 37a-도 37f**는 혈장(도 37a 및 도 37b), 비장(도 37c 및 도 37d), 및 종양(도 37e 및 도 37f)에서 mIAP301 및 마스킹된 Vel-IPV-mIAP301 및 Vel-M2-mIAP301의 농도를 도시한다.

**도 38a-도 38b**는 혈장, 간 및 종양에서 절단된 항체의 백분율을 도시한다(도 38a). 4 일 또는 7 일 동안 Ab47 또는 Vel-IPV-Ab47로 처리된 마우스로부터 수확된 HT1080 종양은 유세포 분석을 실시하여 종양 발현된 CD47에 결합하고 포화시킬 수 있는 항체의 정도를 측정하였다(도 38b).

**도 39a-도 39c** 마스킹된 Ab47(도 39a) 또는 마스킹된 hB6H12.3(도 39b)의 내약성을 순환 혈장 사이토카인 단핵구 화학유인 단백질-1(monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1))을 측정함으로써 결정하였다. 제네릭 TAB ELISA를 사용한 약동학 분석을 마스킹된 및 비-마스킹된 hB6H12.3에서 수행하였다(도 39c).

**도 40a-도 40b**는 고(디트로이트562)(도 40a) 및 저(HT1080)(도 40b) 대식세포 모델에서 Vel-IPV-hB6H12.3 및 SEA-Vel-IPV-hB6H12.3뿐만 아니라 푸코실화된 및 비-푸코실화된 SEA hB6H12.3의 이중이식편 모델의 평균 종양 부피를 측정함으로써 상대적 항종양 활성을 도시한다.

도 41a-도 41b는 Vel-IPV-hB6H12.3 및 SEA-Vel-IPV-hB6H12.3 항체를 이용한 순환 MCP-1 사이토카인 수준의 측정을 도시한다(도 41a). 제네릭 Tab ELISA를 사용한 약동학적 분석을 SEA 및 비-SEA Vel-IPV-hB6H12.3 항체 간에 수행하였다(도 41b).

도 42는 hB6H12.3("항-CD47"), Vel-IPV-hB6H12.3("마스킹된 항-CD47"), MMP 절단된 Vel-IPV-hB6H12.3("MMP 활성화된 마스킹된 항-CD47"), 또는 항체 없음("미처리")을 이용한 항온처리에 따른 CD47 양성 인간 적혈구의 식세포작용의 측정을 도시한다..

도 43은 Vel-IPV-Ab47("마스킹된 Ab47"), MMP 절단된 Vel-IPV-Ab47("MMP 절단된 마스킹된 Ab47"), 또는 항체 없음("미처리")을 이용한 항온처리 후 원형 바닥 플레이트에서의 인간 적혈구를 도시한다.

도 44는 hB6H12.3, 5F9 또는 IgG1 이소타입 대조군과 함께 항온처리 후 아넥신(annexin) V 양성 세포의 측정을 도시한다.

도 45a-도 45c는 17 개의 환자 샘플 중 16 개(도 45a) 또는 하나의 아웃라이어(outlier) 샘플(도 45b)을 나타내는 전혈 샘플에 대한 Vel-IPV-hB6H12.3-FITC 및 hB6H12.3-FITC의 결합 측정; 및 재조합 CD47 및 hB6H12.3("공여자 1-hB6H12.3 스파이크된") 또는 Vel-IPV-hB6H12.3(육종 Pt1-10)을 이용한 혈장의 항온처리 후 ELISA를 사용하여 획득한 EC<sub>50</sub> 값(도 45c)을 도시한다.

도 46a-도 46b는 37C에서 20 시간 동안 hB6H12.3 또는 Vel-IPV-hB6H12.3과 함께 항온처리된 암 환자 전혈 샘플의 항온처리에 의해 유도된 대표적인 사이토카인 생성을 도시한다. 도 46a는 IP-10의 생성을 보여주고 도 46b는 IL-1RA의 생성을 보여준다.

도 47은 hB6H12.3, Vel-IPV-hB6H12.3 또는 hIgG1 이소타입 대조군("h00 이소타입")을 투여한 HT1080 이중이식편 모델 마우스로부터의 HT1080 종양 세포에서 아넥신 V 염색을 보여준다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0173] 출원시 당업계에 알려진 항-CD47 IgG3 항체는 독성, 예컨대, 말초 적혈구 고갈 및 혈소판 고갈을 나타내며, 이는 CD47-연관 장애, 예컨대, CD47 발현 암에 대한 효과적인 치료제로서 이들의 유용성을 감소시킨다. 출원인은 놀랍게도, 본 발명의 항체 및 이의 항원-결합 단편을 특이적으로 CD47-발현 고형 종양에 효과적으로 표적화하기 위해 종양 미세환경의 맥락에서 비마스킹에 의해 활성화될 수 있는 신규한 항-CD47 IgG1 항체 및 이의 항원-결합 단편을 발견하였다. 본원에 기술된(마스킹되거나 마스킹되지 않은) 인간화 항-CD47 항체 및 이의 항원-결합 단편은 CD47-관련 장애, 예컨대, CD47-발현 암의 치료에 유용하다.

[0174] 특정 예시적인 실시양태에서, 항원성 표적에 대한 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 결합을 차단하는 제거가능한 마스크(mask)(예컨대, 코일형 코일 마스크)를 포함하는 항체 및 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 특정 실시양태에서, 제거가능한 마스크는 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)-절단가능한 링커 서열을 통해 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄의 N-말단에 부착된다.

[0175] 종양 미세환경에서, 변경된 단백질분해는 조절되지 않은 종양 성장, 조직 리모델링, 염증, 조직 침습 및 전이를 초래한다(Kessenbrock(2011) Cell 141:52). MMP는 종양형성과 연관된 프로테이나제의 가장 현저한 패밀리를 나타내고, MMP는 종양 진행 동안 미세환경의 많은 변화를 매개한다. 위와 동일. 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 MMP에 노출 시, MMP 링커 서열이 절단되어, 코일형 코일 마스크의 제거를 허용하고 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 종양 미세환경-특이적 방식으로 이의 표적 항원에 결합할 수 있도록 한다.

[0176] 본 발명의(마스킹 및 마스킹되지 않은) 신규한 항-CD47 IgG1 항체 및 이의 항원-결합 단편은 출원시 당업계에 알려진 항-CD47 IgG3 항체와 비교하여 증가된 약동학 및 감소된 비표적 효과(off target effect)를 유리하게 입증하였다. 본원에 기술된 신규한 인간화 항-CD47 항체는 다음 중 하나 이상을 유리하게 나타낸다: 1) 기준 항체(예컨대, 뮤린 모 항체)에 비해 향상된 항원 결합; 2) 기준 항체(예컨대, 뮤린 모 항체)에 비해 향상된 항체의 존성 세포성 세포독성(ADCC); 3) 기준 항체(예컨대, 뮤린 모 항체)에 비해 향상된 식세포작용(예컨대, 향상된 항체 의존성 세포성 식세포작용(ADCP)); 4) 기준 항체(예컨대, 뮤린 모 항체)에 비해 감소된 적혈구 혈구응집반응(HA); 5) 3-차원(즉, 비-선형) CD47 에피토프에 대한 결합

[0177] 본 발명이 보다 용이하게 이해될 수 있도록, 특정 기술 및 과학 용어가 아래에 구체적으로 정의된다. 본 문서의 다른 곳에서 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 다른 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다.

[0178] I. 정의

[0179] 첨부된 청구범위를 포함하여 본원에 사용된, "a", "an" 및 "the"와 같은 단수 형태의 단어는 문맥 상 명백하게 달리 지시되지 않는 한, 이들의 대응하는 복수의 참조를 포함한다.

[0180] "항체-약물 접합체"는 세포독성제 또는 세포정지제에 접합된 항체를 지칭한다. 전형적으로, 항체-약물 접합체는 세포 표면 상의 표적 항원(예컨대, CD47)에 결합한 후, 항체-약물 접합체를 세포 내로 내재화하고 이어서 약물을 세포 내로 방출시킨다.

[0181] "폴리펩티드" 또는 "폴리펩티드 쇠"는 자연적으로 또는 합성적으로 생성되는 것에 관계없이 펩티드 결합에 의해 연결된 아미노산 잔기의 중합체이다. 약 10 개 미만의 아미노산 잔기의 폴리펩티드는 일반적으로 "펩티드"로서 지칭된다.

[0182] "단백질"은 하나 이상의 폴리펩티드 쇠를 포함하는 거대분자이다. 단백질은 또한 비-펩티드 구성요소, 예컨대, 탄수화물 기를 포함할 수 있다. 탄수화물 및 다른 비-펩티드 치환기는 단백질이 생성되는 세포에 의해 단백질에 첨가될 수 있으며, 세포의 유형에 따라 다양할 것이다. 단백질은 아미노산 백본(backbone) 구조에 관해서 본원에 정의된다. 탄수화물 기와 같은 치환기는 일반적으로 명시되지 않지만 그럼에도 불구하고 존재할 수 있다.

[0183] 용어 "아미노-말단" 및 "카복시-말단"은 폴리펩티드 내의 위치를 나타낸다. 문맥 상 허용되는 경우, 이들 용어는 근접성 또는 상대적 위치를 나타내기 위해 폴리펩티드의 특정 서열 또는 부분과 관련하여 사용된다. 예를 들어, 폴리펩티드 내의 기준 서열의 카복시-말단에 위치한 특정 서열은 기준 서열의 카복시 말단에 근접하여 위치하지만, 반드시 완전한 폴리펩티드의 카복시 말단에 있는 것은 아니다.

[0184] 아미노산 치환을 보존적 또는 비보존적으로 분류하기 위해, 다음 아미노산 치환은 보존적 치환으로 간주된다: 트레오닌, 알라닌 또는 아스파라긴으로 치환된 세린; 프롤린 또는 세린으로 치환된 트레오닌; 아스파르트산, 히스티딘 또는 세린으로 치환된 아스파라긴; 글루탐산 또는 아스파라긴으로 치환된 아스파르트산; 글루타민, 리신 또는 아스파르트산으로 치환된 글루탐산; 아르기닌, 리신 또는 글루탐산으로 치환된 글루타민; 티로신 또는 아스파라긴으로 치환된 히스티딘; 리신 또는 글루타민으로 치환된 아르기닌; 이소류신, 류신 또는 발린으로 치환된 메티오닌; 류신, 발린 또는 메티오닌으로 치환된 이소류신; 발린, 이소류신 또는 메티오닌으로 치환된 류신; 티로신 또는 트립토판으로 치환된 페닐알라닌; 트립토판, 히스티딘 또는 페닐알라닌으로 치환된 티로신; 트레오닌으로 치환된 프롤린; 세린으로 치환된 알라닌; 글루탐산, 글루타민 또는 아르기닌으로 치환된 리신; 메티오닌, 이소류신 또는 류신으로 치환된 발린; 및 페닐알라닌 또는 티로신으로 치환된 트립토판. 보존적 치환은 또한 동일한 클래스의 아미노산 사이의 치환을 의미할 수 있다. 클래스는 다음과 같다: 그룹 I(소수성 측쇄): met, ala, val, leu, ile; 그룹 II(중성 친수성 측쇄): cys, ser, thr; 그룹 III(산성 측쇄): asp, glu; 그룹 IV(염기성 측쇄): asn, gin, his, lys, arg; 그룹 V(쇄 배향에 영향을 미치는 잔기): gly, pro; 및 그룹 VI(방향족 측쇄): trp, tyr, phe.

[0185] 최대 대응(correspondence)을 위해 정렬될 때 2 개의 아미노산 서열의 아미노산 잔기가 동일한 경우, 2 개의 아미노산 서열은 "100%의 아미노산 서열 동일성"을 갖는다. 서열 비교는 DNASTAR(Madison, Wisconsin)에 의해 생산되는 LASERGENE 생물정보학 컴퓨팅 스위트(suite)에 포함된 것과 같은 표준 소프트웨어 프로그램을 사용하여 수행할 수 있다. 최적의 정렬을 결정함으로써 2 개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열을 비교하는 다른 방법은 당업자에게 널리 알려져 있다.(예컨대, Peruski and Peruski, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research*(ASM Press, Inc. 1997); Wu 등(eds.), *Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins*, in *Methods in Gene Biotechnology* 123-151(CRC Press, Inc. 1997); Bishop(ed.), *Guide to Human Genome Computing*(2nd ed., Academic Press, Inc. 1998). 참고) 2 개의 아미노산 서열은, 2 개의 서열이 서로에 대해 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상 또는 약 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 경우 "실질적인 서열 동일성"을 갖는 것으로 간주된다.

[0186] 서열 동일성 백분율은 카바트 넘버링 관례에 의해 최대로 정렬된 항체 서열로 결정된다. 정렬 후, 대상체 항체 영역(예컨대, 중쇄 또는 경쇄의 전체 가변 도메인)을 기준 항체의 동일한 영역과 비교하는 경우, 대상체와 기준 항체 영역 사이의 서열 동일성 백분율은, 갭(gap)을 계수하지 않고, 두 영역의 정렬된 위치의 총 수로 나눈 대상체 및 기준 항체 영역 둘 다에서 동일한 아미노산에 의해 점유된 위치의 수이며, 백분율로 전환하기 위해 100을 곱하였다.

[0187] 하나 이상의 언급된 요소를 "포함하는" 조성물 또는 방법은 구체적으로 언급되지 않은 다른 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체를 포함하는 조성물은 항체를 단독으로 또는 다른 성분과 조합하여 함유할 수 있다.

- [0188] 값의 범위의 지정은 범위 내의 또는 범위를 정의하는 모든 정수를 포함한다.
- [0189] 본원에 기술된 항체 또는 다른 단백질에서, 서열번호에 의해 명시된 것에 상응하는 아미노산 잔기에 대한 언급은 이러한 잔기의 번역 후 변형을 포함한다.
- [0190] 용어 "항체"는 항원의 존재에 반응하여 신체에 의해 생성되고 항원에 결합하는 면역글로불린 단백질뿐만 아니라 항원-결합 단편 및 이의 조작된 변이체를 나타낸다. 따라서, 용어 "항체"는 예를 들어, 온전한 모노클로날 항체 (예컨대, 하이브리도마 기술을 사용하여 생성된 항체) 및 항원-결합 항체 단편, 예컨대, F(ab')<sub>2</sub>, Fv 단편, 디아바디, 단일-쇄 항체, scFv 단편 또는 scFv-Fc를 포함한다. 유전적으로, 조작된 온전한 항체 및 단편, 예컨대, 키메라 항체, 인간화 항체, 단일-쇄 Fv 단편, 단일-쇄 항체, 디아바디, 미니바디, 선형 항체, 다가 또는 다중-특이적(예컨대, 이중특이적) 하이브리드 항체 등이 또한 포함된다. 따라서, 용어 "항체"는 항체의 항원-결합 부위를 포함하고 이의 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 단백질을 포함하도록 광범위하게 사용된다.
- [0191] 용어 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 본 발명의 마스킹 화합물에 결합(즉, 공유적으로 또는 비-공유적으로 결합)되지 않는 "네이키드(naked)" 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 용어 항체는 또한 본원에 추가로 기술된 바와 같이 하나 이상의 마스킹 화합물, 예컨대, 코일형 코일 펩티드에 공유적으로 또는 비-공유적으로 결합된 "마스킹된" 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 용어 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 "접합된" 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 약제, 예컨대, 세포정지 약물 또는 세포독성 약물에 공유적으로 또는 비-공유적으로 결합하는 "항체-약물 접합체(ADC)"를 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 약제, 예컨대, 세포정지 약물 또는 세포독성 약물에 임의로 접합된 네이키드 항체 또는 항원-결합 단편이다. 다른 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 약제, 예컨대, 세포정지 약물 또는 세포독성 약물에 임의로 접합된 마스킹된 항체 또는 항원-결합 단편이다.
- [0192] 용어 "유전적으로 조작된 항체"는 아미노산 서열이 천연(native) 또는 모 항체의 것과 다른 항체를 지칭한다. 가능한 변이는 많으며, 단지 하나 또는 몇 개의 아미노산의 변화로부터 예를 들어, 가변 또는 불변 영역의 완전한 재설계에 이르기까지 다양하다. 불변 영역의 변화는 일반적으로, 특성, 예컨대, 보체 결합 및 다른 효과기 기능을 개선 또는 변경하기 위해 이루어진다. 전형적으로, 가변 영역의 변화는 항원-결합 특성을 개선시키고/시키거나, 가변 영역 안정성을 개선시키고/시키거나 면역원성의 위험을 감소시키기 위해 이루어진다.
- [0193] 용어 "키메라 항체"는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종(예컨대, 인간)으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동인 반면, 쇠(들)의 나머지는 이들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 다른 종(예컨대, 마우스)으로부터 유래되거나 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체뿐만 아니라 이러한 항체의 단편의 상응하는 서열과 동일하거나 상동인 항체를 지칭한다.
- [0194] "항체의 항원-결합 부위"는 이의 항원에 결합하기에 충분한 항체의 부분이다. 이러한 최소 영역은 전형적으로 가변 도메인 또는 이의 유전적으로 조작된 변이체이다. 단일 도메인 결합 부위는 낙타과(camelid) 항체 (Muylldermans and Lauwereys, Mol. Recog. 12: 131-140, 1999; Nguyen 등, EMBO J. 19:921-930, 2000 참고) 또는 단일-도메인 항체를 생산하기 위해 다른 종의 VH 도메인("dAbs," Ward 등, Nature 341 :544-546, 1989; Winter 등의 미국 특허 번호 6,248,516 참고)으로부터 생성될 수 있다. 일반적으로, 항체의 항원-결합 부위는 공통 에피토프에 결합하는 중쇄 가변(VH) 도메인 및 경쇄 가변(VL) 도메인 둘 다를 포함한다. 본 발명의 맥락 내에서, 항체는 항원-결합 부위, 예컨대, 항체의 제2 항원-결합 부위(이는 동일 또는 상이한 에피토프 또는 동일 또는 상이한 항원에 결합할 수 있음), 펩티드 링커, 면역글로불린 불변 영역, 면역글로불린 힌지(hinge), 양친매성 헬릭스(Pack and Pluckthun, Biochem. 31: 1579- 1584, 1992 참고), 비-펩티드 링커, 올리고뉴클레오티드(Chaudri et al, FEBS Letters 450:23-26, 1999 참고), 및 세포정지 또는 세포독성 약물 등 이외에 하나 이상의 구성요소를 포함할 수 있으며, 단량체 또는 다량체 단백질일 수 있다. 항체의 항원-결합 부위를 포함하는 분자의 예는 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어, Fv, 단일-쇄 Fv(scFv), Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)c, 디아바디, 미니바디, 나노바디, Fab-scFv 융합체, 이중특이적(scFv)<sub>4</sub>-IgG 및 이중특이적(scFv)<sub>2</sub>-Fab를 포함한다. (예컨대, Hu et al, Cancer Res. 56:3055-3061, 1996; Atwell 등, Molecular Immunology 33: 1301-1312, 1996; Carter and Merchant, Curr. Op. Biotechnol. 8:449-454, 1997; Zuo 등, Protein Engineering 13:361-367, 2000; 및 Lu 등, J. Immunol. Methods 267:213-226, 2002 참고)
- [0195] 용어 "면역글로불린"은 면역글로불린 유전자(들)에 의해 실질적으로 코딩된 하나 이상의 폴리펩티드로 이루어진 단백질을 지칭한다. 면역글로불린의 일 형태는 척추동물에서 천연(즉, 자연적 또는 모) 항체의 기본 구조 유닛(unit)을 구성한다. 이 형태는 사량체이며 면역글로불린 쇠의 2 개의 동일한 쌍으로 이루어지며, 각각의 쌍은

하나의 경쇄 및 하나의 중쇄를 갖는다. 각각의 쌍에서, 경쇄 및 중쇄 가변 영역(VL 및 VH)은 함께 주로 항원에 대한 결합을 담당하고, 불변 영역은 주로 항체 효과기 기능을 담당한다. 면역글로불린 단백질의 5 개의 클래스(IgG, IgA, IgM, IgD 및 IgE)가 고등 척추동물에서 식별되었다. IgG는 주요 클래스를 포함하며, 보통 혈장에서 발견되는 두 번째로 가장 풍부한 단백질로서 존재하다. 인간에서, IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 지정된 4 개의 서브클래스로 이루어진다. 각각의 면역글로불린 중쇄는 종에서 주어진 서브클래스에 대해 본질적으로 불변하는(invariant) 불변 영역 단백질 도메인(CH1, 힌지, CH2 및 CH3; IgG3은 또한 CH4 도메인을 함유함)으로 이루어진 불변 영역을 보유한다.

[0196] 인간 및 비-인간 면역글로불린쇄를 코딩하는 DNA 서열은 당업계에 알려져 있다.(예컨대, Ellison et al, DNA 1: 11-18, 1981; Ellison et al, Nucleic Acids Res. 10:4071-4079, 1982; Kenten 등, Proc. Natl. Acad. Set USA 79:6661-6665, 1982; Seno 등, Nucl. Acids Res. 11 :719-726, 1983; Riechmann 등, Nature 332:323-327, 1988; Amster 등, Nucl. Acids Res. 8:2055-2065, 1980; Rusconi and Kohler, Nature 314:330-334, 1985; Boss 등, Nucl. Acids Res. 12:3791-3806, 1984; Bothwell 등, Nature 298:380-382, 1982; van der Loo 등, Immunogenetics 42:333-341, 1995; Karlin 등, J. Mol. Evol. 22: 195-208, 1985; Kindsvogel 등, DNA 1 :335-343, 1982; Breiner 등, Gene 18: 165-174, 1982; Kondo 등, Eur. J. Immunol. 23:245-249, 1993; 및 GenBank Accession No. J00228 참고) 면역글로불린 구조 및 기능의 검토의 경우 Putnam, The Plasma Proteins, Vol V, Academic Press, Inc., 49-140, 1987; 및 Padlan, Mol. Immunol. 31: 169-217, 1994 참고. 용어 "면역글로불린"은 문맥에 따라 온전한 항체, 이의 구성요소쇄 또는 쇠의 단편을 나타내는 공통의 의미로 본원에 사용된다.

[0197] 전장 면역글로불린 "경쇄"(약 25 kDa 또는 214 개의 아미노산)는 아미노-말단에서 가변 영역 유전자(약 110 개의 아미노산을 코딩함)에 의해 및 카복시-말단에서 카파 또는 람다 불변 영역 유전자에 의해 코딩된다. 전장 면역글로불린 "중쇄"(약 50 kDa 또는 446 개의 아미노산)는 가변 영역 유전자(약 116 개의 아미노산을 코딩함) 및 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 입실론 불변 영역 유전자(약 330 개의 아미노산을 코딩함)에 의해 코딩되며, 후자는 항체의 이소타입을 각각 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE로서 정의한다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 가변 및 불변 영역은 약 12 개 이상의 아미노산의 "J" 영역에 의해 연결되고, 중쇄는 또한 약 10 개 이상의 아미노산의 "D" 영역을 포함한다.(일반적으로 Fundamental Immunology(Paul, ed., Raven Press, N.Y., 2nd ed. 1989), Ch. 7 참고).

[0198] 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄 가변 영역(또한 본원에서 각각 "경쇄 가변 도메인"("VL 도메인") 또는 "중쇄 가변 도메인"("VH 도메인")으로서 지칭됨)은 3 개의 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"에 의해 비연속된 "프레임워크" 영역으로 이루어진다. 프레임워크 영역은 항원의 에피토프에 대한 특이적 결합을 위해 CDR을 정렬시키는 역할을 한다. 따라서, 용어 "CDR"은 주로 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 아미노-말단에서 카복실-말단에 이르기까지, VL 및 VH 도메인 둘 다는 다음 프레임워크(FR) 및 CDR 영역을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4를 포함한다.

[0199] 각각의 가변 영역 도메인에 대한 아미노산의 할당(assignment)은 카바트, 면역학적 관심 단백질의 서열(National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991)의 정의에 따른다. 카바트는 또한 상이한 중쇄 가변 영역 사이 또는 상이한 경쇄 가변 영역 사이의 상응하는 잔기가 동일한 수로 할당되는 널리 사용되는 넘버링 규칙(카바트 넘버링)을 제공한다. VL 도메인의 CDR 1, 2 및 3은 각각 본원에서 각각 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3으로서 지칭된다. VH 도메인의 CDR 1, 2 및 3은 각각 본원에서 각각 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3으로서 지칭된다. 그렇게 언급된 경우, CDR의 할당은 카바트 대신에 IMGT®(Lefranc 등, Developmental & Comparative Immunology 27:55-77; 2003)에 따를 수 있다.

[0200] 중쇄 불변 영역의 넘버링은 카바트(Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 및 1991)에 제시된 바와 같이 EU 지수를 통해 이루어진다.

[0201] 문맥이 달리 지시하지 않는 한, 용어 "모노클로날 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생성된 항체로 제한되지 않는다. 용어 "모노클로날 항체"는 임의의 진핵 생물, 원핵 생물 또는 파지 클론을 포함하는 단일 클론으로부터 유래된 항체를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 항체는 모노클로날 항체이다.

[0202] 용어 "인간화 VH 도메인" 또는 "인간화 VL 도메인"은 비-인간 공여자(예컨대, 마우스 또는 랫트) 면역글로불린으로부터 전체적으로 또는 실질적으로 유래된 CDR 및 인간 면역글로불린 서열로부터 전체적으로 또는 실질적으로 유래된 가변 도메인 프레임워크 서열의 일부 또는 모두를 포함하는 면역글로불린 VH 또는 VL 도메인을 지칭한다. CDR을 제공하는 비-인간 면역글로불린은 "공여자"로서 지칭하고, 프레임워크를 제공하는 인간 면역글로불

린은 "수용기"로서 지칭한다. 일부 경우에, 인간화 항체는 적절한 결합 특성을 향상시키기 위해 인간 가변 도메인 프레임워크 영역 내에서 일부 비-인간 잔기를 유지할 수 있다(예컨대, 프레임워크에서의 돌연변이는 항체가 인간화되는 경우 결합 친화도를 보존하기 위해 필요할 수 있다).

[0203] "인간화 항체"는 인간화 VH 도메인 및 인간화 VL 도메인 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 항체이다. 번역글로불린 불변 영역(들)은 존재할 필요는 없지만, 존재한다면, 인간 번역글로불린 불변 영역으로부터 전체적으로 또는 실질적으로 유래한다.

[0204] 인간화 항체는 비-인간 "공여자" 항체로부터의 CDR이 인간 "수용기" 항체 서열 내로 그래프팅된(grafted) 유전적으로 조작된 항체이다(예컨대, Queen, US 5,530,101 및 5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; 및 Foote, US 6,881,557 참고). 수용기 항체 서열은 예를 들어, 성숙한 인간 항체 서열, 이러한 서열의 복합체, 인간 항체 서열의 컨센서스(consensus) 서열 또는 생식선 영역 서열일 수 있다. 인간 수용기 서열은 다른 기준 중에서 수용기와 공여자 CDR 사이의 정식(canonical) 형태를 매칭시키기 위해 공여자 서열을 포함하는 가변 영역 프레임워크에서 높은 정도의 서열 동일성을 위해 선택될 수 있다. 따라서, 인간화 항체는 공여자 항체로부터 전체적으로 또는 실질적으로 유래된 CDR 및 존재하는 경우, 인간 항체 서열로부터 전체적으로 또는 실질적으로 유래된 가변 영역 프레임워크 서열 및 불변 영역을 갖는 항체이다.

유사하게, 인간화 중쇄는 전형적으로 공여자 항체 중쇄로부터 전체적으로 또는 실질적으로 유래된 3 개의 CDR 모두, 및 존재하는 경우, 인간 중쇄 가변 영역 프레임워크 및 불변 영역 서열로부터 실질적으로 유래된 중쇄 가변 영역 프레임워크 서열 및 중쇄 불변 영역을 갖는다. 유사하게, 인간화 경쇄는 전형적으로 공여자 항체 경쇄로부터 전체적으로 또는 실질적으로 유래된 3 개의 CDR 모두, 및 존재하는 경우, 인간 경쇄 가변 영역 프레임워크 및 불변 영역 서열로부터 실질적으로 유래된 경쇄 가변 영역 프레임워크 서열 및 경쇄 불변 영역을 갖는다. 인간화 항체의 CDR은, (카바트 넘버링에 의해 정의된 바와 같이) 상응하는 잔기의 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 이상, 또는 (카바트 넘버링에 의해 정의된 바와 같이) 상응하는 잔기의 약 100%가 각각의 CDR 간에 동일한 경우 비-인간 항체의 상응하는 CDR으로부터 실질적으로 유래한다. 항체 쇄의 가변 영역 프레임워크 서열 또는 항체 쇄의 불변 영역은, (가변 영역의 경우 카바트 넘버링에 의해 및 불변 영역의 경우 EU 넘버링에 의해 정의된 바와 같이) 상응하는 잔기의 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 이상, 또는 (가변 영역의 경우 카바트 넘버링에 의해 및 불변 영역의 경우 EU 넘버링에 의해 정의된 바와 같이) 상응하는 잔기의 약 100%가 동일한 경우 각각 인간 가변 영역 프레임워크 서열 또는 인간 불변 영역으로부터 실질적으로 유래한다.

[0205] 인간화 항체는 종종 마우스 항체로부터의(바람직하게, 카바트 또는 IMGT®에 의해 정의된) 6 개의 모든 CDR을 포함하지만, 이들은 또한 마우스 항체로부터의 6 개 미만의 모든 CDR(예컨대, 3, 4 또는 5 개 이상의) CDR로 이루어질 수 있다(예컨대, Pascalis 등, J. Immunol. 169:3076, 2002; Vajdos 등, Journal of Molecular Biology, 320: 415-428, 2002; Iwahashi 등, Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999; Tamura et al, Journal of Immunology, 164: 1432- 1441, 2000).

[0206] 인간화 항체에서의 CDR은, (카바트 (또는 IMGT)에 의해 정의된 바와 같이) 상응하는 잔기의 60% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 100%가 각각의 CDR 간에 동일한 경우 비-인간 항체의 상응하는 CDR로부터 "실질적으로 유래한다". CDR이 실질적으로 비-인간 번역글로불린으로부터 유래된 인간화 VH 또는 VL 도메인의 특정 변이에서, 인간화 VH 또는 VL 도메인의 CDR은 상응하는 비-인간 VH 또는 VL CDR에 대한 모든 3 개의 CDR에 걸쳐 6 개 이하(예컨대, 5 개 이하, 4 개 이하, 3 개 이하, 2 개 이하 또는 1 개 이하)의 아미노산 치환(바람직하게는 보존적 치환)을 갖는다. 항체 VH 또는 VL 도메인의 가변 영역 프레임워크 서열, 또는 존재하는 경우 번역글로불린 불변 영역의 서열은, (가변 영역의 경우 카바트 넘버링에 의해 및 불변 영역의 경우 EU 넘버링에 의해 정의된 바와 같이) 상응하는 잔기의 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 이상, 또는 (가변 영역의 경우 카바트 넘버링에 의해 및 불변 영역의 경우 EU 넘버링에 의해 정의된 바와 같이) 상응하는 잔기의 약 100%가 동일한 경우 각각 인간 VH 또는 VL 프레임워크 서열 또는 인간 불변 영역으로부터 "실질적으로 유래한다". 따라서, CDR을 제외한 인간화 항체의 모든 부분은 전형적으로 자연적 인간 번역글로불린 서열의 상응하는 부분으로부터 전체적으로 또는 실질적으로 유래한다.

[0207] 항체는 전형적으로 단리된 형태로 제공된다. 이는 항체가 전형적으로 간접 단백질 및 이의 생산 또는 정제로부터 발생하는 다른 오염 물질에 대해 약 50% w/w 이상 순수하지만, 항체가 과량의 약학적으로 허용가능한 담체

(들) 또는 이의 사용을 용이하게 하기 위한 다른 비히클과 조합될 가능성을 배제하지는 않는다는 것을 의미한다. 때때로, 항체는 간접 단백질 및 생산 또는 정제로부터의 오염 물질에 대해 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95% 또는 약 99% w/w 이상 순수하다. 단리된 항체를 포함하는 항체는 세포독성제에 접합될 수 있고 항체 약물 접합체로서 제공되고/되거나 예컨대, 연관된 코일형 코일로 마스킹될 수 있다.

[0208] 표적 항원에 대한 항체의 특이적 결합은 전형적으로 약  $10^6$ , 약  $10^7$ , 약  $10^8$ , 약  $10^9$  또는 약  $10^{10} M^{-1}$  이상의 친화도를 지칭한다. 특이적 결합은 규모가 더 크게 검출가능하고, 하나 이상의 비-특이적 표적에 발생하는 비-특이적 결합과 구별될 수 있다. 비특이적 결합은 전형적으로 반 데르 발스 힘의 결과인 반면, 특이적 결합은 특정 기능기 또는 특정 공간적 맞춤(예컨, 잠금 및 키 유형) 사이의 결합 형성의 결과일 수 있다.

[0209] 용어 "에피토프"는 항체가 결합하는 항원의 부위를 지칭한다. 에피토프는 하나 이상의 단백질의 3 차 폴딩(folding)에 의해 병치된 인접 아미노산 또는 비인접 아미노산으로부터 형성될 수 있다. 인접 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 변성제, 예컨대, 용매에 노출 시 유지되는 반면, 3 차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 변성제, 예컨대, 용매로 처리 시 손실된다. 에피토프는 전형적으로 독특한 공간적 입체구조로 약 3 개 이상, 보다 일반적으로 약 5 개 이상, 약 6 개 이상, 약 7 개 이상 또는 약 8-10 개의 아미노산을 포함한다. 에피토프의 공간적 입체구조를 결정하는 방법은 예를 들어, x-선 결정학 및 2-차원 핵 자기 공명을 포함한다. 예컨대, Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed.(1996) 참고.

[0210] 동일하거나 중첩된 에피토프를 인식하는 항체는 하나의 항체가 표적 항원에 대한 다른 항체의 결합과 경쟁할 수 있는 능력을 나타내는 간단한 면역검정으로 식별될 수 있다. 항체의 에피토프는 또한 접촉 잔기를 식별하기 위해 이의 항원에 결합된 항체의 X-선 결정학에 의해 정의될 수 있다.

[0211] 대안적으로, 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 항원의 모든 아미노산 돌연변이가 다른 것의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우(이러한 돌연변이가 항원 구조에서 전체적인 변경을 일으키지 않는다면), 두 항체는 동일한 에피토프를 갖는다. 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 일부 아미노산 돌연변이가 다른 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우, 두 항체는 중첩 에피토프를 갖는다.

[0212] 항체 간의 경쟁은 테스트 항체가 공통 항원에 대한 기준 항체의 특이적 결합을 억제하는 검정에 의해 결정될 수 있다(예컨대, Junghans 등, Cancer Res. 50: 1495, 1990 참고). 과량의 시험 항체가 기준 항체의 결합을 억제하는 경우, 테스트 항체는 기준 항체와 경쟁한다.

[0213] 경쟁 검정에 의해 식별된 항체(경쟁 항체)는 기준 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체 및 입체 장애(steric hindrance)가 발생하도록 기준 항체에 의해 결합된 에피토프에 충분히 근접한 인접 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다. 경쟁 검정에 의해 식별된 항체는 또한 표적 단백질의 입체구조 변화를 일으켜서 테스트 항체에 의해 결합된 것과 상이한 에피토프에 대한 기준 항체의 결합을 예방함으로써 기준 항체와 간접적으로 경쟁하는 것을 포함한다.

[0214] 항체 효과기 기능은 Ig의 Fc 영역에 의해 기여된 기능을 지칭한다. 이러한 기능은 예를 들어, 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC), 항체-의존성 세포성 식세포작용(ADCP) 또는 보체-의존성 세포독성(CDC)일 수 있다. 이러한 기능은 예를 들어, 식세포성 또는 용해 활성을 갖는 면역 세포 상의 Fc 수용체에 대한 Fc 영역의 결합 또는 보체 시스템의 구성요소에 대한 Fc 영역의 결합에 의해 영향을 받을 수 있다. 전형적으로, Fc-결합 세포 또는 보체 구성요소에 의해 매개된 효과(들)는 CD47-표적화된 세포의 억제 및/또는 고갈을 초래한다. 항체의 Fc 영역은 Fc 수용체(FcR)-발현 세포를 동원하여 항체-코팅된 표적 세포와 병치할 수 있다. Fc  $\gamma$  RIII(CD16), Fc  $\gamma$  RII(CD32) 및 Fc  $\gamma$  RIII(CD64)을 포함하는 IgG에 대한 표면 FcR을 발현하는 세포는 IgG-코팅된 세포의 파괴를 위한 효과기 세포로서 작용할 수 있다. 이러한 효과기 세포는 단핵구, 대식세포, 자연 살해(NK) 세포, 호중구 및 호산구를 포함한다. IgG에 의한 Fc  $\gamma$  R의 관여는 ADCC 또는 ADCP를 활성화시킨다. ADCC는 막 공극-형성 단백질 및 프로테아제의 분비를 통해 CD16+ 효과기 세포에 의해 매개되는 반면, 식세포작용은 CD32+ 및 CD64+ 효과기 세포에 의해 매개된다(Fundamental Immunology, 4<sup>th</sup> ed., Paul ed., Lippincott-Raven, N.Y., 1997, Chapters 3, 17 and 30; Uchida 등, J. Exp. Med. 199:1659-69, 2004; Akewanlop 등, Cancer Res. 61:4061-65, 2001; Watanabe 등, Breast Cancer Res. Treat. 53: 199-207, 1999 참고).

[0215] ADCC 및 ADCP 이외에, 세포-결합 항체의 Fc 영역은 또한 CDC를 이끌어 내기 위한 보체 고전 경로를 활성화시킬 수 있다. 보체 시스템의 C1q는 항원과 복합되는 경우 항체의 Fc 영역에 결합한다. 세포-결합 항체에 대한 C1q의 결합은 C3 전환효소를 생성하기 위해 C4 및 C2의 단백질분해 활성화를 관여하는 사건의 캐스케이드(cascade)를

개시할 수 있다. C3 전환효소에 의한 C3에서 C3b로의 절단은 C5b, C6, C7, C8 및 C9를 포함하는 말단 보체 구성 요소의 활성화를 가능하게 한다. 종합적으로, 이들 단백질은 항체-코팅된 세포 상에 막-공격 복합체 공극을 형성한다. 이러한 공극은 세포막 무결성을 파괴하여 표적 세포를 사멸시킨다(Immunobiology, 6<sup>th</sup> ed., Janeway et al, Garland Science, N. Y., 2005, Chapter 2 참고).

- [0216] 용어 "항체-의존성 세포성 세포독성" 또는 "ADCC"는 항체-코팅된 표적 세포와 용해 활성을 갖는 면역 세포(또한 효과기 세포로서 지칭됨)와의 상호작용에 의존하는 세포 사멸을 유도하는 메커니즘을 지칭한다. 이러한 효과기 세포는 자연 살해 세포, 단핵구/대식세포 및 호중구를 포함한다. 효과기 세포는 항원-결합 부위를 통해 표적 세포에 결합된 Ig의 Fc 영역에 부착된다. 항체-코팅된 표적 세포의 사멸은 효과기 세포 활성의 결과로서 발생한다. 특정 예시적인 실시양태에서, 본 발명의 항-CD47 IgG1 항체는 모 항체 및/또는 항-CD47 IgG3 항체와 비교하여 동등하거나 증가된 ADCC를 매개한다.
- [0217] 용어 "항체-의존성 세포성 식세포작용" 또는 "ADCP"는 항체-코팅된 세포가 Ig의 Fc 영역에 결합하는 식세포성 면역 세포에 의해(예컨대, 대식세포, 호중구 및/또는 수지상 세포에 의해) 전체 또는 부분적으로 내재화되는 과정을 지칭한다. 특정 예시적인 실시양태에서, 본 발명의 항-CD47 IgG1 항체는 모 항체 및/또는 항-CD47 IgG3 항체와 비교하여 동등하거나 증가된 ADCP를 매개한다.
- [0218] 용어 "보체-의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 표적-결합 항체의 Fc 영역이 표적 세포막에서 정공의 형성의 정점에 이르는 일련의 효소 반응을 활성화시키는 세포 사멸을 유도하는 메커니즘을 지칭한다.
- [0219] 전형적으로, 항원-항체 복합체, 예컨대, 항체-코팅된 표적 세포 상의 것들은 보체 구성요소 C1q에 결합하고 활성화하여, 보체 캐스케이드를 활성화시켜 표적 세포 사멸을 초래한다. 보체의 활성화는 또한 백혈구 상의 보체 수용체(예컨대, CR3)에 결합함으로써 ADCC를 촉진하는 표적 세포 표면 상에 보체 구성요소의 침착을 유발할 수 있다.
- [0220] "세포독성 효과"는 표적 세포의 고갈, 제거 및/또는 사멸을 지칭한다. "세포독성제"는 세포에 대한 세포독성 효과를 가져, 표적 세포의 고갈, 제거 및/또는 사멸을 매개하는 화합물을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 세포독성제는 항체에 접합되거나 항체와 병용하여 투여된다. 적합한 세포독성제는 본원에 추가로 기술된다.
- [0221] "세포정지 효과"는 세포 증식의 억제를 지칭한다. "세포정지제"는 세포에 대한 세포정지 효과를 가져, 특정 세포 유형 및/또는 세포 서브세트의 성장 및/또는 확장의 억제를 매개하는 화합물을 지칭한다. 적합한 세포정지제가 본원에 추가로 기술된다.
- [0222] 용어 "발현 유닛" 및 "발현 카세트(cassette)"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 세그먼트를 의미하고 숙주 세포에서 핵산 세그먼트의 발현을 제공할 수 있게 한다. 발현 유닛은 전형적으로 전사 프로모터, 관심 폴리펩티드를 코딩하는 오픈 리딩 프레임 및 작동적으로 연결된 전사 종결자를 포함한다. 전사 프로모터 및 종결자 이외에, 발현 유닛은 다른 핵산 세그먼트, 예컨대, 인핸서 또는 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함할 수 있다.
- [0223] 용어 "발현 벡터"는 하나 이상의 발현 유닛을 포함하는 선형 또는 원형의 핵산 분자를 지칭한다. 하나 이상의 발현 유닛 이외에, 발현 벡터는 또한 추가적인 핵산 세그먼트, 예컨대, 하나 이상의 복제 원점 또는 하나 이상의 선택가능한 마커를 포함할 수 있다.
- [0224] 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유래되거나, 둘 다의 요소를 함유할 수 있다.
- [0225] 용어 "환자" 또는 "대상체"는 예방적 또는 치료적 치료를 받는 인간 및 다른 포유동물 대상체, 예컨대, 비-인간 영장류, 토끼, 랫트, 마우스 등 및 이의 트랜스제닉(transgenic) 종을 포함한다. 특정 예시적인 실시양태에서, 대상체는 암, 예컨대, 고형 종양을 겪고 있거나 이가 발병할 위험이 있는 인간 환자이며, 이는 임의로 본원에 기술된 항-CD47 항체의 마스킹 도메인(예컨대, 코일형 코일 마스킹 도메인)을 절단할 수 있는 하나 이상의 프로테아제를 분비한다.
- [0226] 본원에 기술된 바와 같이 항-CD47 항체의 투여에 의한 CD47-발현 장애의 치료의 문맥에서 용어 "유효량"은 발생을 억제하거나 CD47-관련 장애(예컨대, CD47-발현 암)의 하나 이상의 증상을 완화시키기에 충분한 이러한 항체의 양을 지칭한다. 항체의 유효량이 "유효 양생법"으로 투여된다. 용어 "유효 양생법"은 투여되는 항체의 양 및 장애의 예방적 또는 치료적 치료(예컨대, CD47-발현 암의 예방적 또는 치료적 치료)를 달성하기에 충분한 투여량 빈도의 조합을 지칭한다.

- [0227] 용어 "약학적으로 허용가능한"은 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 승인가능하거나 미국 약전 또는 동물, 보다 특히 인간에서 사용하기 위해 일반적으로 인정되는 다른 약전에 열거된 것을 의미한다. 용어 "약학적으로 상용가능한 성분"은 항-CD47 항체가 제형화되는 약학적으로 허용가능한 희석제, 보조제, 부형제, 또는 비히클을 지칭한다.
- [0228] 구문 "약학적으로 허용가능한 염"은 약학적으로 허용가능한 유기 또는 무기 염을 지칭한다. 예시적인 염은 설페이트, 시트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 니트레이트, 바이설페이트, 포스페이트, 산 포스페이트, 이소니코티네이트, 락테이트, 살리실레이트, 산 시트레이트, 타르트레이트, 올레에이트, 탄네이트, 판토테네이트, 바이타르트레이트, 아스코르베이트, 숙시네이트, 말레에이트, 젠티시네이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 사카레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄설폰에이트, 에탄설폰에이트, 벤젠설폰에이트, p 톨루엔설폰에이트 및 파모에이트(즉, 1,1'-메틸렌 비스-(2-하이드록시-3-나프토에이트) 염을 포함한다. 약학적으로 허용가능한 염은 추가의 분자, 예컨대, 아세테이트 이온, 숙시네이트 이온 또는 다른 반대 이온을 추가로 포함할 수 있다. 반대 이온은 모 화합물의 전하를 안정화시키는 임의의 유기 또는 무기 모이어티일 수 있다. 또한, 약학적으로 허용가능한 염은 그 구조에 하나 이상의 하전된 원자를 가질 수 있다. 다중 하전된 원자가 약학적으로 허용가능한 염의 일부인 경우에는 다중 반대 이온을 가질 수 있다. 따라서, 약학적으로 허용가능한 염은 하나 이상의 하전된 원자 및/또는 하나 이상의 반대 이온을 가질 수 있다.
- [0229] 문맥에서 달리 명백하지 않은 한, 값이 "약" X 또는 "대략" X로서 표현되는 경우, 명시된 X의 값은  $\pm 10\%$ 까지 정확한 것으로 이해될 것이다.
- [0230] 본 발명의 맥락에서 용매화물은 용매 분자와의 배위를 통해 고체 또는 액체 상태에서 복합체를 형성하는 본 발명의 화합물의 형태이다. 수화물은 배위가 물과 함께 일어나는 용매화물의 하나의 특정 형태이다. 특정의 예시적인 실시양태에서, 본 발명의 맥락에서 용매화물은 수화물이다.
- [0231] 용어 "혈구응집반응"은 적혈구가 함께 군집되는 과정을 지칭한다. 혈구응집반응은 당업계에 알려진 항-CD47 항체의 원하지 않는 부작용이다. 본 발명의 인간화 항-CD47 항체는 임의로 무린 모 항-CD47 항체 및/또는 당업계에 알려진 하나 이상의 항-CD47 항체에 비해 감소된 혈구응집반응을 매개한다.
- [0232] **II. 항-CD47 항체 및 항원-결합 단편**
- [0233] 본 발명은 단리된, 재조합 및/또는 합성 항-CD47 인간, 영장류, 설치류, 포유동물, 키메라, 인간화 및/또는 CDR-그래프팅된 항체 및 이의 항원-결합 단편, 뿐만 아니라 하나의 항-CD47 항체 분자의 적어도 일부를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물 및 핵산 분자를 제공한다. 본 발명은 진단 및 치료 조성물, 방법 및 장치를 비롯하여 이러한 핵산 및 항체의 제조 및 사용 방법을 추가로 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 특정 예시적인 실시양태에서, 인간화 항-CD47 IgG1 항체를 제공한다. 다른 예시적인 실시양태에서, 마스킹된 인간화 항-CD47 IgG1 항체를 제공한다. 또 다른 예시적인 실시양태에서, 스테르블을 포함하는 인간화 항-CD47 IgG1 항체를 제공한다.
- [0234] 본 발명의 특정 실시양태에서, 다음 활성 중 하나 이상을 갖는 인간화 항-CD47 항체를 제공한다: 1) 기준 항체(예컨대, 무린 모 항체)에 비해 향상된 항원 결합; 2) 기준 항체(예컨대, 무린 모 항체)에 비해 향상된 항체 의존성 세포성 세포독성(ADCC); 3) 기준 항체(예컨대, 무린 모 항체)에 비해 향상된 식세포작용(예컨대, 항체 의존성 세포성 식세포작용(ADCP)); 4) 기준 항체(예컨대, 무린 모 항체)에 비해 감소된 적혈구 혈구응집반응(HA); 5) 3-차원(즉, 비-선형) CD47 에피토프에 대한 결합.
- [0235] 본 발명의 예시적인 항-CD47 항체 및 이의 항원-결합 단편은 다음 CD47 항체 중쇄/경쇄 쌍을 포함한다: 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(탈아미노화(deamidation) 돌연변이) - hvH1 / hvK3 G91A; Ab47 - HV3-7/HJ4 / KV3D-11/KJ1; 및 mB6H12 - vH1 / vL. 예시적인 항-CD47 항체 중쇄 가변 영역 서열, 경쇄 가변 영역, 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR은 표 1-표 6에서 찾을 수 있다. 예시적인 인간화 항-CD47 항체의 중쇄 및 경쇄에 대한 아미노산 서열은 표 7에서 찾

을 수 있다.

[0236]

표 1. 뮤린 B6H12 항체로부터 유래된 중쇄 가변 서열. 카바트 CDR은 밑줄 그어져 있고, IMGT CDR은 볼드체이다.

변이체	서열
mB6h12 vH	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGMSWVRQTPDKRLEW VA <b><u>TITSGGTYTYYPDSVKGRFTISRDN</u></b> AKNTLYLQ <b><u>DSLK</u></b> SEDTAIYFCA <b><u>RS</u></b> LAGN <b><u>AMDY</u></b> WGQGTSVTVSS (서열번호 1)
Ab47vH (HV3-7/HJ4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGMSWVRQAPGKGLEW VA <b><u>TITSGGTYTYYPDSVKGRFTISRDN</u></b> AKNSLYLQ <b><u>MNSL</u></b> RAEDTAVVY <b><u>CAR</u></b> SLAGN <b><u>AMDY</u></b> WGQGLVTVSS (서열번호 2)
hvH1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGMSWVRQAPGKREW VA <b><u>TITSGGTYTYYPDSVKGRFTISRDN</u></b> SKNTLYLQ <b><u>MNSL</u></b> RAEDTAIYFC <b><u>AR</u></b> SLAGN <b><u>AMDY</u></b> WGQGLVTVSS (서열번호 3)
hvH2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VA <b><u>TITSGGTYTYYPDSVKGRFTISRDN</u></b> SKNTLYLQ <b><u>MNSL</u></b> RAEDTAVVYF <b><u>CAR</u></b> SLAGN <b><u>AMDY</u></b> WGQGLVTVSS (서열번호 4)
hvH3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VA <b><u>TITSGGTYTYYPDSVKGRFTISRDN</u></b> SKNTLYLQ <b><u>INSL</u></b> RAEDTAVVYFC <b><u>AR</u></b> SLAGN <b><u>AMDY</u></b> WGQGLVTVSS (서열번호 5)
hvH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMNWVRQAPGKGLEW VA <b><u>TITSGGTYTYYPDSVKGRFTISRDN</u></b> AKNSLYLQ <b><u>MNSL</u></b> RAEDTAVVY <b><u>CAR</u></b> SLAGN <b><u>AMDY</u></b> WGQGLVTVSS (서열번호 6)
hvH5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGMSWVRQAPGKGLEW VA <b><u>TITSGGTYTYYPDSVKGRFTISRDN</u></b> SKNTLYLQ <b><u>INSL</u></b> RAEDTAVVYFC <b><u>AR</u></b> SLAGN <b><u>AMDY</u></b> WGQGLVTVSS (서열번호 7)
hvH6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLVW VA <b><u>TITSGGTYTSYADSVKGRFTISRDN</u></b> AKNTLYLQ <b><u>MNSL</u></b> RAEDTAVVY <b><u>CAR</u></b> SLAGN <b><u>AMDY</u></b> WGQGLVTVSS (서열번호 8)

[0237]

[0238]

표 2. 뮤린 B6H12 항체로부터 유래된 경쇄 가변 서열. 카바트 CDR은 밑줄 그어져 있고, IMGT CDR은 볼드체이다.

변이체	서열
mB6h12 vL	DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRAS <b><u>QTISDYL</u></b> HWYQ <b><u>QKSH</u></b> ESPRLLIK <b><u>FASQ</u></b> SISGIPSRFSGSGSGDFILSIN <b><u>SV</u></b> EPEDVGVVY <b><u>CQNGHGFPRIFG</u></b> GGTKLEIKR (서열번호 9)
Ab47vL (KV3D-11/KJ1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <b><u>QTISDYL</u></b> HWYQ <b><u>QKPGQ</u></b> APRLLIK <b><u>FASQ</u></b> SISGIPARFSGSGSGTDFILTISSLEPEDFAVVY <b><u>CQNGHGFPRIFGQ</u></b> GTKVEIKR (서열번호 10)
hvK1	EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTILTCRAS <b><u>QTISDYL</u></b> HWYQ <b><u>QKPDQ</u></b> SPKLLIK <b><u>FASQ</u></b> SISGVPSRFSGSGSGTDFILTI <b><u>NSLEA</u></b> EDA <b><u>AVVY</u></b> C <b><u>QNGHGFPRIFG</u></b> GQGTKLEIK(R) (서열번호 11)
hvK2	EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTILTCRAS <b><u>QTISDYL</u></b> HWYQ <b><u>QKPDQ</u></b> SPKLLIK <b><u>FASQ</u></b> SISGVPSRFSGSGSGTDFILTI <b><u>NSLEA</u></b> EDA <b><u>AAVY</u></b> C <b><u>QNGHGFPRIFG</u></b> QGTKLEIK(R) (서열번호 12)
hvK3	EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTILTCRAS <b><u>QTISDYL</u></b> HWYQ <b><u>QKPDQ</u></b> SPKLLIK <b><u>FASQ</u></b> SISGVPSRFSGSGSGDFILTI <b><u>NSLEA</u></b> EDA <b><u>AAVY</u></b> C <b><u>QNGHGFPRIFG</u></b> QGTKLEIK(R) (서열번호 13)
hvK4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTLTTCRAS <b><u>QTISNYL</u></b> AWYQ <b><u>QKPGK</u></b> VPKLLIK <b><u>FASTLQ</u></b> SGVPSRFSGSGSGDFILTISS <b><u>LQ</u></b> PE <b><u>DVATVY</u></b> C <b><u>QNGHGFPRIFG</u></b> GQGTKLEIK(R) (서열번호 14)
hvK3 (G91A)	EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTILTCRAS <b><u>QTISDYL</u></b> HWYQ <b><u>QKPDQ</u></b> SPKLLIK <b><u>FASQ</u></b> SISGVPSRFSGSGSGDFILTI <b><u>NSLEA</u></b> EDA <b><u>AAVY</u></b> C <b><u>QNAHGFPRIFG</u></b> QGTKLEIKR (서열번호 15)

[0239]

[0240] 표 3. 변이체 항체의 중쇄 CDR 서열(카바트).

CDR	서열
hvH1 & hvH5 HCDR1 (카바트)	GYGMS (서열번호 16)
hvH1 HCDR2 (카바트)	TITSGGTYTYYPDSVKG (서열번호 17)
hvH1- hvH6 HCDR3 (카바트)	SLAGNAMDY (서열번호 18)
hvH2 & hvH3 HCDR1 (카바트)	SYAMS (서열번호 19)
hvH2, hvH3, & hvH5 HCDR2 (카바트)	TITSGGTYTYYADSVKG (서열번호 20)
hvH4 HCDR1 (카바트)	SYGMN (서열번호 21)
hvH4 HCDR2 (카바트)	TITSGGTYTYYADSVKG (서열번호 22)
hvH6 HCDR1 (카바트)	SYGMH (서열번호 23)
hvH6 HCDR2 (카바트)	TITSGGTYTSYADSVKG (서열번호 24)

[0241]

[0242] 표 4. 변이체 항체의 중쇄 CDR 서열(IMG).

CDR	서열
hvH1 & hvH5 HCDR1 (IMG)	GFTFSGYG (서열번호 25)
hvH1-hvH3, hvH5-hvH6 HCDR2 (IMG)	ITSGGTYT (서열번호 26)
hvH1- hvH6 HCDR3 (IMG)	ARSLAGNAMDY (서열번호 27)
hvH2 & hvH3 HCDR1 (IMG)	GFTFSSYA (서열번호 28)
hvH4 & hvH6 HCDR1 (IMG)	GFTFSSYG (서열번호 29)
hvH4 HCDR2 (IMG)	ITSGGTYI (서열번호 30)

[0243]

[0244] 표 5. 변이체 항체의 경쇄 CDR 서열(카바트).

CDR	서열
hvK1-hvK3 LCDR1 (카바트)	RASQTISDYLH (서열번호 31)
hvK1-hvK3 LCDR2 (카바트)	FASQSIG (서열번호 32)
hvK1- hvK4 LCDR3 (카바트)	QNGHGFprt (서열번호 33)
hvK4 LCDR1 (카바트)	RASQTISNYLA (서열번호 34)
hvK4 LCDR2 (카바트)	FASTLQS (서열번호 35)
hvK3 (G91A) LCDR3 (카바트)	QNAHGFprt (서열번호 36)

[0245]

[0246] 표 6. 변이체 항체의 경쇄 CDR 서열(IMG).

CDR	서열
hvK1-hvK3 LCDR1 (IMG)	QTISDY (서열번호 37)
hvK1-hvK4 LCDR2 (IMG)	FAS (서열번호 38)
hvK1- hvK4 LCDR3 (IMG)	QNGHGFprt (서열번호 39)
hvK4 LCDR1 (IMG)	QTISNY (서열번호 40)
hvK3 (G91A) LCDR3 (IMG)	QNAHGFprt (서열번호 41)

[0247]

[0248] 표 7. 본 발명의 바람직한 실시양태에 따른 마스킹된 항-CD47 항체의 완전한 중쇄 및 경쇄 서열. 중쇄 및 경쇄 서열은 평균(각각 서열번호 42 및 43)이고, 마스킹 서열은 볼드체이며, 프로테아제 절단 서열은 밑줄 그어져 있다.

항체쇄	서열
중쇄	<b>QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLG</b> <u>SIPVSLRSGE</u> VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGMSWVRQAPGKRLEWVATTI SGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIFYCARSLAGN AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHITFPAPLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYITLPPSRDELDT KNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK (서열번호 42)
중쇄 마스킹 서열	<b>QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLG</b> (서열번호 94)
경쇄	<b>QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLG</b> <u>SIPVSLRSGE</u> IVMTQSPDFQSVTPKEKVTLCRASQTIISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQ SISGVPSPRFSGSGSGSDFLTINSLEAEDAATYYCQNGHGFPRTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC (서열번호 43)
경쇄 마스킹 서열	<b>QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLG</b> (서열번호 95)

[0249]

[0250] hB6H12.1

[0251] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 3으로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또는 서열번호 11로서 제시된 LCVR의 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 16, 17 및 18의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 31, 32 및 33의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 25, 26 및 27의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 37, 38 및 39의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HCVR/LCVR 쌍 서열번호 3/서열번호 11을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 3에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR을 포함하고/하거나 서열번호 11에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.

[0252] hB6H12.2

[0253] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 3으로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또는 서열번호 12로서 제시된 LCVR의 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 16, 17 및 18의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 31, 32 및 33의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 25, 26 및 27의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 37, 38 및 39의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HCVR/LCVR 쌍 서열번호 3/서열번호 12를 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 3에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR을 포함하고/하거나 서열번호 12에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.

[0254] hB6H12.3

[0255] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 3으로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또는 서열번호 13으로서 제시된 LCVR의 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 16, 17 및 18의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 31, 32 및 33의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 25, 26 및 27의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 37, 38

및 39의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HCVR/LCVR 쌍 서열번호 3/서열번호 13을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 3에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR을 포함하고/하거나 서열번호 13에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.

[0256] hB6H12.4

[0257] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 3으로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또는 서열번호 14로서 제시된 LCVR의 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 16, 17 및 18의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 34, 35 및 33의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 25, 26 및 27의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 40, 38 및 39의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HCVR/LCVR 쌍 서열번호 3/서열번호 14를 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 3에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR을 포함하고/하거나 서열번호 14에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.

[0258] hB6H12.5

[0259] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 4로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또는 서열번호 11로서 제시된 LCVR의 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 19, 20 및 18의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 31, 32 및 33의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 28, 26 및 27의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 37, 38 및 39의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HCVR/LCVR 쌍 서열번호 4/서열번호 11을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 4에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR을 포함하고/하거나 서열번호 11에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.

[0260] hB6H12.6

[0261] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 4로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또는 서열번호 12로서 제시된 LCVR의 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 19, 20 및 18의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 31, 32 및 33의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 28, 26 및 27의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 37, 38 및 39의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HCVR/LCVR 쌍 서열번호 4/서열번호 12를 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 4에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR을 포함하고/하거나 서열번호 12에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.

[0262] hB6H12.7

[0263] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 4로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또는 서열번호 13으로서 제시된 LCVR의 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 19, 20, 및 18의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 31, 32 및 33의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 28, 26 및 27의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 37, 38 및 39의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HCVR/LCVR 쌍 서열번호 4/서열번호 13을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 4에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR을 포함하고/하거나 서열번호 13에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.

[0264] hB6H12.8

[0265] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 4로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또





열번호 7/서열번호 11을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 7에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR을 포함하고/하거나 서열번호 11에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.

[0284] hB6H12.18

[0285] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 7로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또는 서열번호 12로서 제시된 LCVR의 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 16, 20 및 18의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 31, 32 및 33의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 25, 26 및 27의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 37, 38 및 39의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HCVR/LCVR 쌍 서열번호 7/서열번호 12를 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 7에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR을 포함하고/하거나 서열번호 12에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.

[0286] hB6H12.19

[0287] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 7로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또는 서열번호 13으로서 제시된 LCVR의 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 16, 20, 및 18의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 31, 32 및 33의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 25, 26 및 27의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 37, 38 및 39의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HCVR/LCVR 쌍 서열번호 7/서열번호 13을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 7에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR을 포함하고/하거나 서열번호 13에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.

[0288] hB6H12.20

[0289] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 7로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또는 서열번호 14로서 제시된 LCVR의 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 16, 20 및 18의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 34, 35 및 33의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 25, 26 및 27의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 40, 38 및 39의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HCVR/LCVR 쌍 서열번호 7/서열번호 14를 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 7에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR을 포함하고/하거나 서열번호 14에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.

[0290] hB6H12.21

[0291] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 8로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또는 서열번호 11로서 제시된 LCVR의 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 23, 24 및 18의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 31, 32 및 33의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 29, 26 및 27의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 37, 38 및 39의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HCVR/LCVR 쌍 서열번호 8/서열번호 11을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 8에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR을 포함하고/하거나 서열번호 11에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.

[0292] hB6H12.22

[0293] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 8로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또는 서열번호 12로서 제시된 LCVR의 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단

편은 서열번호 23, 24, 및 18의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 31, 32 및 33의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 29, 26 및 27의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 37, 38 및 39의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HCVR/LCVR 쌍 서열번호 8/서열번호 12를 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 8에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR를 포함하고/하거나 서열번호 12에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.

[0294] hB6H12.23

[0295] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 8로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또는 서열번호 13으로서 제시된 LCVR의 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 23, 24 및 18의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 31, 32 및 33의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 29, 26 및 27의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 37, 38 및 39의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HCVR/LCVR 쌍 서열번호 8/서열번호 13을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 8에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR을 포함하고/하거나 서열번호 13에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.

[0296] hB6H12.24

[0297] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 8로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또는 서열번호 14로서 제시된 LCVR의 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 23, 24 및 18의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 34, 35 및 33의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 29, 26 및 27의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 40, 38 및 39의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HCVR/LCVR 쌍 서열번호 8/서열번호 14를 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 8에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR을 포함하고/하거나 서열번호 14에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.

[0298] hB6H12.3 G91A

[0299] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 3으로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또는 서열번호 15로서 제시된 LCVR의 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 16, 17 및 18의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 34, 35 및 36의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 25, 26 및 27의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 40, 38 및 41의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HCVR/LCVR 쌍 서열번호 3/서열번호 15를 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 3에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR을 포함하고/하거나 서열번호 15에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.

[0300] Ab47

[0301] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 2로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또는 서열번호 10으로서 제시된 LCVR의 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 16, 17 및 18의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 31, 32 및 33의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 25, 26 및 27의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 37, 38 및 39의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HCVR/LCVR 쌍 서열번호 2/서열번호 10을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 2에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR을 포함하고/하거나 서열번호 10에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.

- [0302] mB6H12
- [0303] 특정 예시적 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1로서 제시된 HCVR의 CDR 및/또는 서열번호 9로서 제시된 LCVR의 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 16, 17 및 18의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 31, 32 및 33의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 25, 26 및 27의 중쇄 CDR 및/또는 서열번호 37, 38 및 39의 경쇄 CDR을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HCVR/LCVR 쌍 서열번호 1/서열번호 9를 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 HCVR을 포함하고/하거나 서열번호 9에 대해 약 80% 이상(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 상동성 또는 동일성을 갖는 LCVR을 포함한다.
- [0304] 본원에 기술된 항-CD47 항체 및 이의 항원-결합 단편은 변형된 형태로 발현될 수 있다. 예를 들어, 추가의 아미노산, 특히 하전된 아미노산의 영역은 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 N-말단에 첨가되어 정제 동안, 또는 후속 취급 및 저장 동안에 숙주 세포에서 안정성 및 지속성을 개선시킬 수 있다. 또한, 펩티드 모이어티는 본 발명의 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 첨가되어 정제를 촉진할 수 있다. 이러한 영역은 항체 분자 또는 이의 하나 이상의 단편의 최종 제조 전에 제거될 수 있다. 이러한 방법은 많은 기준 실험실 매뉴얼, 예컨대, Sambrook, supra; Ausubel, 등, ed., Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y.(1987-2001)에 기술된다.
- [0305] 본원에 기술된 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 표준 결합 검정, 예를 들어, 비아코어(Biacore)-기반 결합 검정을 사용하여 측정된 바와 같이,  $\leq 1 \mu\text{M}$ , 예컨대,  $\leq 100 \text{ nM}$ , 바람직하게는  $\leq 10 \text{ nM}$ , 및 보다 바람직하게는  $\leq 1 \text{ nM}$ 의 평형 결합 상수로 CD47에 전형적으로 결합한다.
- [0306] 본 발명의 항체 분자는 기준 항-CD47 항체, 예를 들어, B6H12, 2D3, MABL, CC2C6, 또는 BRIC126와 비교하여 특정화될 수 있다. 예를 들어, 미국특허 제5,057,604호 및 제9,017,675호에 기술된, 항체 B6H12는 Abcam, PLC, Santa Cruz Biotechnology, Inc., and eBioscience, Inc로부터 상업적으로 이용가능하다.
- [0307] 글리코실화 변이체
- [0308] 항-CD47 항체 및 이의 항원-결합 단편은 불변 영역의 보존된 위치에서 글리코실화될 수 있다(Jefferis and Lund, (1997) Chem. Immunol. 65:111-128; Wright and Morrison, (1997) TibTECH 15:26-32). 면역글로불린의 올리고당 측쇄는 단백질의 기능(Boyd 등, (1996) Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe and Howard, (1990) Biochem. 29:4175-4180), 및 입체구조에 영향을 미치고 당단백질의 3 차원 표면을 제시할 수 있는 당단백질 부분들 사이의 분자내 상호 작용(Jefferis and Lund, supra; Wyss and Wagner, (1996) Current Op. Biotech. 7:409-416)에 영향을 미친다. 올리고당은 또한 특정 인식 구조에 기초하여 주어진 당단백질을 특정 분자에 표적화하는 역할을 할 수 있다. 예를 들어, 아갈락토실화된 IgG에서, CH2-간 공간 및 말단 N-아세틸글루코사민 잔기 중 올리고당 모이어티 '폴립스'가 만노스 결합 단백질에 결합하는 것이 이용가능하게 만드는 것으로 보고된다(Malhotra 등, (1995) Nature Med. 1:237-243). 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 생성된 CAMPATH-1H(인간 림프구의 CDw52 항원을 인식하는 재조합 인간화 무린 모노클로날 IgG1 항체)로부터의 올리고당의 글리코펩티다제에 의한 제거는 보체 매개 용해(CMCL)의 완전한 감소를 유발(Boyd 등, (1996) Mol. Immunol. 32:1311-1318)하는 반면, 뉴라미니다제를 사용한 시알산 잔기의 선택적 제거는 DMCL의 손실을 초래하지 않았다. 항체의 글리코실화는 또한 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC)에 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 특히, 이분(bisecting) GlcNAc의 글리코실트랜스퍼라제 촉매 형성인  $\alpha(1,4)$ -N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII)의 테트라 사이클린-조절된 발현을 갖는 CHO 세포는 개선된 ADCC 활성을 갖는 것으로 보고되었다(Umana 등(1999) Mature Biotech. 17:176-180).
- [0309] 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결이다. N-연결은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 부착을 지칭한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 효소 부착을 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드에서 이들 트리펩티드 서열 중 하나의 존재는 잠재적 글리코실화 부위를 생성한다. O-연결된 글리코실화는 하이드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 대한 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토오스 또는 자일로스 중 하나의 부착을 지칭하며, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시리

신이 또한 사용될 수 있다.

[0310] 항체의 글리코실화 변이체는 항체의 글리코실화 패턴이 변경된 변이체이다. 변경은 항체에서 발견된 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 삭제하고, 항체에 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 첨가하고, 글리코실화의 조성(글리코실화 패턴), 글리코실화의 정도 등을 변화시키는 것을 의미한다.

[0311] 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 글리코실화 부위의 첨가는 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우) 아미노산 서열이 하나 이상의 상기 기술된 트리펩티드 서열을 함유하도록 변경함으로써 달성될 수 있다. 변경은 (O-연결된 당화 부위의 경우) 또한 원래 항체의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 첨가 또는 치환에 의해 이루어질 수 있다. 유사하게, 글리코실화 부위의 제거는 항체의 천연 글리코실화 부위 내의 아미노산 변경에 의해 달성될 수 있다.

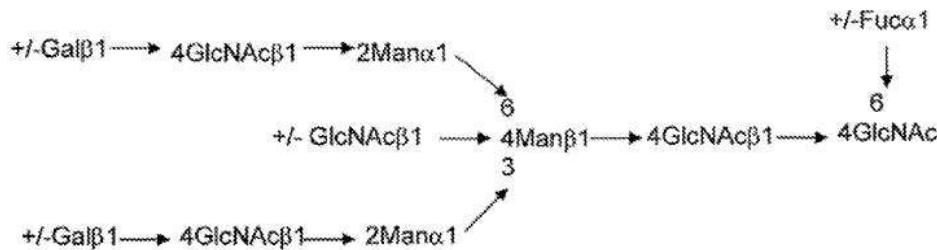
[0312] 아미노산 서열은 보통 기저(underlying) 핵산 서열을 변경함으로써 변경된다. 이들 방법은 (자연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우) 자연적 공급원으로부터의 단리 또는 올리고뉴클레오타이드-매개 (또는 부위-지정) 돌연변이 유발, PCR 돌연변이유발, 및 이전에 제조된 변이체의 카세트 돌연변이유발 또는 항체의 비-변이체 버전에 의한 제조를 포함한다.

[0313] 항체의 글리코실화(글리코실화 패턴 포함)는 또한 아미노산 서열 또는 기저 뉴클레오타이드 서열을 변경하지 않고 변경될 수 있다. 글리코실화는 주로 항체를 발현하는데 사용된 숙주 세포에 의존한다. 잠재적 치료제로서 제조할 당단백질, 예컨대, 항체의 발현에 사용된 세포 유형은 거의 천연 세포가 아니기 때문에, 항체의 글리코실화 패턴의 유의한 변이가 예상될 수 있다. 예컨대, Hse 등, (1997) J. Biol. Chem. 272:9062-9070 참고. 숙주 세포의 선택에 더하여, 항체의 재조합 생산 동안 글리코실화에 영향을 미치는 인자는 성장 방식, 배지 제형, 배양 밀도, 산소화, pH, 정제 스키마 등을 포함한다. 다양한 방법이 올리고당 생산에 관여하는 특정 효소의 도입 또는 과발현을 포함하여 특정 숙주 유기체에서 달성되는 글리코실화 패턴을 변경하기 위해 제안된다(미국특허 제5047335호; 제5510261호; 제5278299호). 글리코실화 또는 글리코실화의 특정 유형은 예를 들어 엔도글리코시다제 H(Endo H)를 사용하여 당단백질로부터 효소적으로 제거될 수 있다. 또한, 재조합 숙주 세포는 유전적으로 조작될 수 있으며, 예컨대, 다당류의 특정 유형을 가공하는데 결함이 있을 수 있다. 이들 및 유사한 기술은 당 업계에 잘 알려져 있다.

[0314] 항체의 글리코실화 구조는 렉틴 크로마토그래피, NMR, 질량 분석법, HPLC, GPC, 단당류 조성 분석, 순차적 효소 소화(digestion), 및 HPAEC-PAD를 비롯한 탄수화물 분석의 통상적인 기술에 의해 용이하게 분석될 수 있으며, 이는 전하에 기초하여 올리고당을 분리하기 위해 고 pH 음이온 교환 크로마토그래피를 사용한다. 분석 목적으로 올리고당을 방출하는 방법이 또한 알려져 있으며, 비제한적으로 효소적 처리(일반적으로 펩티드-N-글리코시다제 F/엔도-β-갈락토시다제를 사용하여 수행됨), 주로 O-연결 구조를 방출하기 위해 가혹한 알칼리 환경을 이용한 제거, 및 N-연결 및 O-연결 올리고당을 방출하기 위해 무수 하이드라진을 사용한 화학적 방법을 포함한다.

[0315] 항체의 글리코실화 변형의 바람직한 형태는 코어 푸코실화가 감소된다. "코어 푸코실화"는 N-연결된 글리칸의 환원 말단에서 N-아세틸글루코사민("GlcNAc")에 푸코스("푸코실화")의 첨가를 지칭한다.

[0316] "복합체 N-글리코시드-연결된 당 쇠"는 전형적으로(카바트 넘버에 따른) 아스파라긴 297에 결합된다. 본원에 사용된 바와 같이, 복합체 N-글리코시드-연결된 당 쇠는 주로 다음 구조를 갖는 바이안테너리(biantennary) 복합 당 쇠를 갖으며:



[0317]

[0318] 여기서 +/-는 당 분자가 존재하거나 부재할 수 있음을 나타내고, 숫자는 당 분자 사이의 연결의 위치를 나타낸다. 상기 구조에서, 아스파라긴에 결합하는 당 쇠 말단을 환원 말단(오른쪽)이라고 하며, 반대쪽을 비-환원 말단이라고 한다. 푸코스는 전형적으로 α1,6 결합(GlcNAc의 6-위치에 푸코스의 1-위치에 연결됨)에 의해 일반적으로 환원 말단의 N-아세틸글루코사민("GlcNAc")에 결합된다. "Gal"은 갈락토스를 지칭하며, "Man"은 만노스를

지칭한다.

- [0319] "복합체 N-글리코시드-연결된 당쇄"는 1) 코어 구조의 비-환원 말단 측이 갈락토스-N-아세틸글루코사민(또한 "gal-GlcNAc"로서 지칭됨)의 하나 이상의 분지를 갖는 복합체 유형을 가지며 Gal-GlcNAc의 비-환원 말단 측은 임의로 시알산, 이분 N-아세틸글루코사민 등을 갖는 복합체 유형; 또는 2) 코어 구조의 비-환원 말단 측이 높은 만노스 N-글리코시드-연결된 당쇄 및 복합체 N-글리코시드-연결된 당쇄의 분지 둘 다를 갖는 하이브리드 유형을 포함한다.
- [0320] 일부 실시양태에서, "복합체 N-글리코시드-연결된 당쇄"는 코어 구조의 비-환원 말단 측이 0개, 하나 이상의 갈락토스-N-아세틸글루코사민(또한 "gal-GlcNAc"로서 지칭됨)의 분지를 갖고 Gal-GlcNAc의 비-환원 말단 측이 임의로 시알산, 이분 N-아세틸글루코사민 등과 같은 구조를 추가로 갖는 복합체 유형을 포함한다.
- [0321] 본 방법에 따르면, 전형적으로 소량의 푸코스 만이 인간화, 키메라 또는 베니어링된(veneered) SG16.17 또는 SG16.45 항체의 복합체 N-글리코시드-연결된 당쇄(들) 내에 혼입된다. 예를 들어, 다양한 실시양태에서, 항체 분자의 약 60% 미만, 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 또는 약 3% 미만은 푸코스에 의한 코어 푸코실화를 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체 분자의 약 2%는 푸코스에 의한 코어 푸코실화를 갖는다.
- [0322] 특정 실시양태에서, 소량의 푸코스 유사체 (또는 푸코스 유사체의 대사산물 또는 생성물)만이 복합체 N-글리코시드-연결된 당쇄(들) 내에 혼입된다. 예를 들어, 다양한 실시양태에서, 인간화, 키메라 또는 베니어링된 SG16.17 또는 SG16.45 항체의 약 60% 미만, 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만 또는 약 3% 미만은 푸코스 유사체 또는 푸코스 유사체의 대사산물 또는 생성물에 의한 코어 푸코실화를 갖는다. 일부 실시양태에서, 인간화, 키메라 또는 베니어링된 SG16.17 항체의 약 2%는 푸코스 유사체 또는 푸코스 유사체의 대사산물 또는 생성물에 의한 코어 푸코실화를 갖는다.
- [0323] 푸코스 유사체와 항체-생성 세포를 항온처리함으로써 비-푸코실화된 항체를 제조하는 방법은 예컨대, WO2009/135181에 기술된다. 간략하게, 인간화, 키메라 또는 베니어링된 SG16.17 항체 항체를 발현하도록 조작된 세포는 푸코스 유사체 또는 푸코스 유사체의 세포내 대사산물 또는 생성물의 존재 하에 항온처리된다. 세포내 대사산물은 예를 들어, GDP-변형 유사체 또는 완전히 또는 부분적으로 탈-에스테르화된 유사체일 수 있다. 생성물은 예를 들어, 완전히 또는 부분적으로 탈-에스테르화된 유사체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 푸코스 유사체는 푸코스 회수 경로(salvage pathway)에서 효소(들)를 억제할 수 있다. 예를 들어, 푸코스 유사체 (또는 푸코스 유사체의 세포내 대사산물 또는 생성물)는 푸코 키나제, 또는 GDP-푸코스-피로포스포릴라제의 활성을 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 푸코스 유사체 (또는 푸코스 유사체의 세포내 대사산물 또는 생성물)는 푸코실트랜스퍼라제 (바람직하게 1,6-푸코실트랜스퍼라제, 예컨대, FUT8 단백질)를 억제한다. 일부 실시양태에서, 푸코스 유사체 (또는 푸코스 유사체의 세포내 대사산물 또는 생성물)는 푸코스에 대한 데노보 합성 경로에서 효소의 활성을 억제할 수 있다. 예를 들어, 푸코스 유사체 (또는 푸코스 유사체의 세포내 대사산물 또는 생성물)는 GDP-만노스 4,6-탈수효소 또는/또는 GDP-푸코스 합성효소의 활성을 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 푸코스 유사체 (또는 푸코스 유사체의 세포내 대사산물 또는 생성물)는 푸코스 수송체(예컨대, GDP-푸코스 수송체)를 억제할 수 있다.
- [0324] 일 실시양태에서, 푸코스 유사체는 2-플루로푸코스이다. 성장 배지의 푸코스 유사체 및 다른 푸코스 유사체를 사용하는 방법은 예컨대, WO/2009/135181에 개시되어 있으며, 이는 본원에 참조로 인용된다.
- [0325] 코어 푸코실화를 감소시키기 위해 세포주를 조작하는 다른 방법은 유전자 녹아웃, 유전자 녹인 및 RNA 간섭(RNAi)을 포함한다. 유전자 녹아웃에서, FUT8(알파 1,6-푸코실트랜스퍼라제 효소)을 코딩하는 유전자는 불활성화된다. FUT8은 N-글리칸의 Asn-연결된(N-연결된) GlcNAc의 위치 6으로의 GDP-푸코스의 푸코실 잔기의 이동을 촉매한다. FUT8은 Asn297에서 N-연결된 바이안테너리 탄수화물에 푸코스를 첨가하는 유일한 효소인 것으로 보고된다. 유전자 녹인은 효소, 예컨대, GNTIII 또는 골지 알파 만노시다제 II를 코딩하는 유전자를 첨가한다. 세포에서 이러한 효소 수준의 증가는 (감소된 코어 푸코실화를 야기하는) 푸코실화 경로로부터 모노클로날 항체를 전환시키고, 이분 N-아세틸글루코사민의 양을 증가시킨다. RNAi는 또한 전형적으로 FUT8 유전자 발현을 표적화하여, 감소된 mRNA 전사 수준을 야기하거나 완전히 유전자 발현을 녹아웃시킨다. 이들 방법 중 임의의 것이 비-푸코실화된 항체, 예컨대, 인간화, 키메라 또는 베니어링된 SG16.17 항체를 생성할 수 있는 세포주를 생성하기 위해 사용될 수 있다.
- [0326] 많은 방법이 항체에서 푸코실화의 양을 결정하기 위해 이용 가능하다. 방법은 예컨대, PLRP-S 크로마토그래피

및 전기분무 이온화 사중극자 TOF MS를 통한 LC-MS를 포함한다.

- [0327] 코일형 코일 마스크징제
- [0328] 본 발명의 특정 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 CD47에 대한 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 결합을 예방하는 코일형 코일 마스크징제(또한 "코일형 코일 마스크징 도메인" 또는 "마스크징 도메인"으로서 지칭됨)와 연관된다. 다양한 실시양태에서, 마스크징 도메인과 연관된 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 "마스크징된 항체"로서 지칭된다.
- [0329] 코일형 코일은 2 개 이상의 알파-헬릭스가 서로 감겨서 슈퍼코일을 형성하는 단백질 및 펩티드의 구조적 모티프이다. 코일형 코일 번들에 2 개, 3 개 또는 4 개의 헬릭스가 있을 수 있으며 헬릭스는 동일한(평행) 또는 반대(역평행) 방향으로 작동할 수 있다.
- [0330] 코일형 코일은 전형적으로 소수성 패턴 및 잔기 조성이 양친매성 알파-헬릭스 구조와 양립할 수 있는 3 개 및 4 개의 잔기의 서열 요소를 포함한다. 교번하는 3 개 및 4 개의 잔기 서열 요소는 아미노산이 'a,' 'b,' 'c,' 'd,' 'e,' 'f' 및 'g.'로 지정된 헵타드 반복체를 구성한다. 위치 'a' 및 'd'의 잔기는 일반적으로 소수성이며 다른 가닥에서 유사한 패턴과 맞물려서 단단히-피팅되는 (fitting) 소수성 코어를 형성하는 노브(knob)와 홀(hole)의 지그재그 패턴을 형성한다. 나머지 잔기 중 'b,' 'c' 및 'f'는 하전되는 경향이 있다. 따라서, 헵타드 반복체의 형성은 특정 아미노산이 아닌 것의 특정 위치에서 요구되는 소수성 및 전하의 물리적 특성에 의존한다. 특정 예시적인 실시양태에서, 본 발명의 코일형 코일은 2 개의 코일형 코일-형성 펩티드로부터 형성된다.
- [0331] 코일형 코일-형성 펩티드에서 헵타드 반복체에 대한 컨센서스 화학식의 예는 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참고로 인용된 W02011034605에 의해 제공된다.
- [0332] 특정 실시양태에 따른 예시적인 컨센서스 화학식이 하기에 제시된다:
- [0333] 화학식 1:  $(X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7)_n$ , 여기서:
- [0334] X1은 소수성 아미노산 또는 아스파라긴이고;
- [0335] X2, X3 및 X6은 임의의 아미노산이고;
- [0336] X4는 소수성 아미노산이고;
- [0337] X5 및 X7은 각각 하전된 아미노산 잔기이며; 및
- [0338] n은 양의 정수이다.
- [0339] 화학식 2:  $(X1', X2', X3', X4', X5, X6, X7)_n$ , 여기서:
- [0340] X1'는 소수성 아미노산 또는 아스파라긴이고;
- [0341] X2', X'3 및 X'6은 각각 임의의 아미노산 잔기이고;
- [0342] X4'는 소수성 아미노산이고;
- [0343] X5' 및 X7' 은 각각 하전된 아미노산 잔기이고;
- [0344] 여기서, 화학식 1 및 2의 n은 2 이상이고; 그리고
- [0345] n은 양의 정수이다.
- [0346] 화학식 1 및 화학식 2의 펩티드가 코일형 코일을 형성하는 특정 실시양태에서, 화학식 1의 X5는 화학식 2의 X'7과 전하가 반대이고, X7 또는 화학식 1은 화학식 2의 X'5와 전하가 반대이다. 코일형 코일 형성 펩티드 내에서 헵타드 반복체는 화학식 1 및/또는 2에 부합하면서 서로 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0347] 코일형 코일은 동종이량체 또는 이종이량체일 수 있다. 특정 예시적인 실시양태에 따라 코일형 코일을 형성할 수 있는 펩티드의 예는 표 8에 나타나있다. 펩티드 서열은 그대로 사용될 수 있거나, 이들의 구성요소는 다른 조합으로 사용될 수 있다. 예를 들어, Vel 코일형 코일-형성 펩티드는 다른 링커 서열과 함께 사용될 수 있다. 경쇄에 대해 나타낸 서열은 또한 중쇄와 함께 사용될 수 있고 그 반대도 가능하다.
- [0348] 특정 예시적 실시양태에서, 2 개의 경쇄 및 중쇄 쌍을 포함하는 2가 항체가 제공되며, 여기서 경쇄 및/또는 중쇄 중 하나 이상의 N-말단은 프로테아제 절단 부위를 포함하는 링커를 통해 코일형 코일을 형성하도록 회합하는

코일형 코일-형성 펩티드에 연결되어 표적에 대한 경쇄 및 중쇄 쌍의 결합 친화도를 감소시킨다. 임의로, 펩티드는 디설피이드 브릿지(disulfide bridge)를 형성하지 않고 회합한다.

- [0349] 임의로, 2 개의 경쇄 및 중쇄 쌍은 동일하다. 임의로, 2 개의 경쇄 및 중쇄 쌍은 상이하다. 임의로, 경쇄는 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역을 포함하고 중쇄는 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 임의로, 중쇄 영역은 CH1, 힌지(hinge), CH2 및 CH3 영역을 포함한다. 임의로, 2 개의 경쇄는 제1 이중 펩티드에 연결되고 2 개의 중쇄는 제2 이중 펩티드에 연결된다.
- [0350] 임의로, 프로테아제 절단 부위는 MMP1 또는 MMP2 절단 부위이다.
- [0351] 임의로, 표적은 CD47이다.
- [0352] 임의로, 항원 결합은 마스킹제(예컨대, 코일형 코일 마스킹제)의 존재에 의해 100-배 이상 감소된다. 임의로, 항원 결합은 마스킹제(예컨대, 코일형 코일 마스킹제)의 존재에 의해 200-1500-배 감소된다. 임의로, 접합체의 세포독성은 마스킹제(예컨대, 코일형 코일 마스킹제)의 존재에 의해 100-배 이상 감소된다. 임의로, 접합체의 세포독성은 마스킹제(예컨대, 코일형 코일 마스킹제)의 존재에 의해 200-1500-배 이상 감소된다.
- [0353] 임의로, 코일형 코일 형성 펩티드는 동일한 배향으로 중쇄 및 경쇄의 N-말단에 연결된다. 임의로, 코일형 코일-형성 펩티드는 반대 배향으로 중쇄 및 경쇄의 N-말단에 연결된다. 임의로, 코일형 코일 형성 펩티드의 다중 카피(copy)는 중쇄 및 경쇄의 N-말단에 직렬로(in tandem) 연결된다.
- [0354] 본 발명의 특정 실시양태에 따른 예시적인 코일형 코일-형성 펩티드 링커 및 프로테아제 부위가 도 34에 도시된다.
- [0355] 특정 예시적인 실시양태에 따르면, 서열번호 51을 포함하거나 이로 이루어진 펩티드(표 8의 Ve1 LC)는 프로테아제 절단 부위 및 경쇄의 N-말단에 연결된 코일형 코일-형성 펩티드를 포함하는 링커를 제공하기 위해 사용되고, 서열번호 50의 펩티드(표 8의 Ve1 HC)는 프로테아제 절단 부위 및 중쇄의 N-말단에 연결된 코일형 코일 형성 펩티드를 포함하는 링커를 제공하기 위해 사용되며, 그 반대도 가능하다. 이들 서열을 포함하는 펩티드는 본원에 개시된 임의의 항체에 연결될 수 있다.
- [0356] 특정 예시적인 실시양태에서, 코일형 코일을 형성하는 변이체 펩티드에서의 아미노산 치환은 보존적 치환이다. 다른 예시적인 실시양태에서, 반복 헵타드 패턴은 변이체 펩티드에서 유지되며, 이에 의해 코일형 코일 형성 펩티드는 화학식 1 및/또는 화학식 2에서와 같이, 아미노산 유형에 의해 화학식에서 위치를 차지하는 아미노산을 범주화하는 화학식에 순응하는 인접한 헵타드 세그먼트로 세분될 수 있다. 특정 실시양태에서, 아미노산의 헵타드 당 1 개 또는 2 개 이하의 치환이 존재하며, 임의의 이러한 치환은 보존적이다. 다른 실시양태에서, 변이체는 본원에 기술된 코일형 코일-형성 펩티드와 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 가지며, 코일형 코일을 형성할 수 있다.
- [0357] 코일형 코일을 형성하는 예시적인 펩티드는 표 8A 및 표 8B에 제시된다.

[0358] 표 8A. 특정 예시적인 실시양태에 따른 마스킹 도메인 서열. 절단 서열은 밑줄이 그어져 있다.

마스킹 펩티드	서열
A2B1 HC	GASTSVDELQAEVDQLQDENYALKTKVAQLRKKVEKLSEGGGGG <u>PLGVR</u> GGGGS (서열번호 44)
A2B1 LC	GASTTVAQLRERVKTLRAQNYELESEVQRLREQVAQLASGGGGG <u>PLGVR</u> GGGGS (서열번호 45)
M11 HC	LEIEAAFLERENTALETRVAELRQRVQRARNRVSQYRTRYGGGGG <u>PLGVR</u> GGGGS (서열번호 46)
M11 LC	LEIRAAFLRQRNTALRTEVAELEQEVQRLENEVSQYETRYGGGGG <u>PLGVR</u> GGGGS (서열번호 47)
M15 HC	LEIRAAFLRRRNTALRTRVAELRQRVQRLRNIVSQYETRYGGGGG <u>PLGV</u> <u>R</u> GGGGS (서열번호 48)
M15 LC	LEIEAAFLEQNTALETEVAELEQEVQRLENIVSQYETRYGGGGG <u>PLGVR</u> GGGGS (서열번호 49)
Vel HC	GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLS <u>IPVSLRSG</u> (서열번호 50)
Vel LC	GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGS <u>IPVSLRSG</u> (서열번호 51)
Fos-Jun HC	GALDTLQAETDQLEDKKSALQTEIANLLKEKEKLEFILAAHGGGGG <u>PLG</u> <u>V</u> RGGGGS (서열번호 52)
Fos-Jun LC	GARIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMNYGGGGG <u>P</u> <u>L</u> GVRGGGGS (서열번호 53)
A4B4 HC	GKIAALKQKIAALKYKNAALKKKIAALKQGGGGG <u>PLGVR</u> GGGGS (서열번호 54)
A4B4 LC	GEIAALEQEIAALEKENAALEWEIAALEQGGGGG <u>PLGVR</u> GGGGS (서열번호 55)

[0359]

[0360] 표 8B. 특정 예시적인 실시양태에 따른 마스킹 도메인 서열. 절단 서열은 밑줄이 그어져 있다. EAC 잔기가 포함된다.

마스킹 펩티드	서열
CA2B1 HC	EACGASTSVDELQAEVDQLQDENYALKTKVAQLRKKVEKLEGGGGG <u>PLGVRGGGGS</u> (서열번호 75)
CA2B1 LC	EACGASTTVAQLRERVKTLRAQNYELESEVQRLREQVAQLASGGGGG <u>PLGVRGGGGS</u> (서열번호 76)
CM11 HC	EACLEIEAAFLERENTALET RVAELRQRVQRARNRVSQYRTRYGGGGG <u>PLGVRGGGGS</u> (서열번호 77)
CM11 LC	EACLEIRAAFLRQRNTALRTEVAELEQEVQRLENEVSQYETRYGGGGG <u>PLGVRGGGGS</u> (서열번호 78)
CM15 HC	EACLEIRAAFLRRRNTALRTRVAELRQRVQRLRNIVSQYETRYGGGGG <u>PLGVRGGGGS</u> (서열번호 79)
CM15 LC	EACLEIEAAFLQENTALETEVAELEQEVQRLENIVSQYETRYGGGGG <u>PLGVRGGGGS</u> (서열번호 80)
CVel HC	EACGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLG <u>SIPVSLRSG</u> (서열번호 81)
CVel LC	EACGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEVAQLG <u>SIPVSLRSG</u> (서열번호 82)
CFos-Jun HC	EACGALTDTLQAETDQLEDKKSALQTEIANLLKEKEKLEFILAAHGGGGG <u>PLGVRGGGGS</u> (서열번호 83)
CFos-Jun LC	EACGARARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMNYGGG <u>GPLGVRGGGGS</u> (서열번호 84)
CA4B4 HC	EACGKIAALKQKIAALKYKNAALKKKIAALKQGGGGG <u>PLGVRGGGGS</u> (서열번호 85)
CA4B4 LC	EACGEIAALEQEIAALEKENAALEWEIAALEQGGGGG <u>PLGVRGGGGS</u> (서열번호 86)

[0361]

[0362]

링커 및 절단 부위

[0363]

본 발명의 특정 실시양태에서, 링커는 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 코일형 코일 마스킹제를 결합시키기 위해 사용된다. 링커는 펩티드 도메인을 연결하기 위한 링커로서 통상적으로 사용되는 아미노산의 임의의 세그먼트일 수 있다. 적합한 링커는 예컨대, 1-20, 2-15, 3-12, 4-10, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개로부터의 길이로 다양할 수 있다. 일부 이러한 링커는 폴리글리신의 세그먼트를 포함한다. 일부 이러한 링커는 종종 글리신 잔기의 측면 위치에 하나 이상의 세린 잔기를 포함한다. 다른 링커는 하나 이상의 알라닌 잔기를 포함한다. 글리신 및 글리신-세린 중합체는 비교적 비구조적이므로 구성요소들 사이의 중성 테더(tether)로서 작용할 수 있다. 글리신은 심지어 알라닌보다 유의하게 더 많이 phi-psi 공간에 접근하며, 더 긴 측쇄를 갖는 잔기보다 훨씬 덜 제한적이다(Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142(1992) 참고). 일부 예시적인 링커는 S(G)nS 형태이며, 여기서 n은 5-20이다. 다른 예시적인 링커는 (G)n, 글리신-세린 중합체(예컨대, (GS)n, (GSGGS)n [(GSGGS)는 서열번호 59임] 및 (GGGS)n, [(GGGS)는 서열번호 60임] 여기서, n은 1 이상의 정수임), 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체 및 당업계에 알려진 다른 가요성 링커이다. 링커의 일부 예는 Ser-(Gly)10-Ser(서열번호 61), Gly-Gly-Ala-Ala(서열번호 62), Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(서열번호 63), Leu-Ala-Ala-Ala-Ala(서열번호 64), Gly-Gly-Ser-Gly(서열번호 65), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly(서열번호 66), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly(서열번호 67), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly(서열번호 68), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly(서열번호 69), Gly-Ser-Ser-Ser-Gly(서열번호 70) 등이다.

[0364]

프로테아제 부위는 바람직하게는 세포 외로 발현된 프로테아제에 의해 인식되고 절단되어, 마스킹된 항체와 접촉하여 마스킹된 항체를 방출하며 이것이 표적, 예컨대, 수용체 세포의 도메인 또는 가용성 리간드와 접촉하는 것을 허용한다. 몇몇 매트릭스 메탈로프로테이나제 부위(MMP1-28)가 적합하다. MMP는 조직 리모델링에서 역할을 하며 신생물 공격, 예컨대, 형태형성, 혈관형성 및 전이에 연루된다. 일부 예시적인 프로테아제 부위는 PLG-XXX(서열번호 71), MMP에 대해 잘 알려진 내인성(endogenous) 서열, PLG-VR(서열번호 72)(WO2014193973) 및 IPVSLRSG(서열번호 73)(Turk 등, Nat. Biotechnol., 2001, 19, 661-667), LSGRSDNY(서열번호 74)(Cytomyx) 및 GPLGVR(서열번호 57)(Chang 등, Clin. Cancer Res. 2012 Jan 1; 18(1):238-47)이다. MMP의 추가적인 예는 US 2013/0309230, WO 2009/025846, WO 2010/081173, WO 2014/107599, WO 2015/048329, US 20160160263, 및

Ratnikov 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111: E4148-E4155(2014)에 제공된다.

[0365] 표 9. 프로테아제 절단 서열. MMP-절단 부위는 \*로 표시되고 uPA/매트립타제/레구마인(legumain) 절단 부위는 \*\*로 표시된다.

절단 부위 명칭	서열
M2	GPLG*VR** (서열번호 57)
IPV	IPVS*LR**SG (서열번호 58)

[0366]

[0367] 항-CD47 항체에 대한 코일형 코일 마스크제의 연결

[0368]

코일형 코일 형성 펩타이드는 프로테아제 부위를 포함하는 링커를 통해 항체 가변 영역의 N-말단에 연결된다. 전형적인 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 이 경우 코일형 코일 형성 펩타이드는 각각의 N-말단에 연결된다. 2가 항체는 동일하거나 동일하지 않을 수 있는 2 개의 결합 부위를 갖는다. 정상 단일특이적 항체에서, 결합 부위는 동일하고 항체는 2 개의 동일한 경쇄 및 중쇄 쌍을 갖는다. 이 경우, 각각의 중쇄는 동일한 코일형 코일 형성 펩타이드에 연결되고 각각의 경쇄는 동일한 코일형 코일 형성 펩타이드(중쇄에 연결된 펩타이드와 동일하거나 동일하지 않을 수 있음)에 연결된다. 이중특이적 항체에서, 결합 부위는 상이하고 2 개의 상이한 중쇄 및 경쇄 쌍으로부터 형성된다. 이러한 경우에, 하나의 결합 부위의 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 다른 결합 부위의 중쇄 및 경쇄 가변 영역과 같이 코일형 코일 형성 펩타이드에 각각 연결된다. 전형적으로, 두 중쇄 가변 영역은 두 경쇄 가변 영역과 같이 코일형 코일 형성 펩타이드의 동일한 유형에 연결된다.

[0369]

코일형 코일-형성 펩타이드는 프로테아제 부위를 포함하는 링커를 통해 항체 가변 영역에 연결될 수 있다. 전형적으로, 동일한 프로테아제 절단 부위를 갖는 동일한 링커는 코일형 코일 펩타이드에 항체의 각각의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 연결하기 위해 사용된다. 프로테아제 절단 부위는 의도된 표적 조직 또는 병리학, 예컨대, 암에서 세포외에 존재하는 프로테아제에 의해 절단될 수 있는 것이어서, 링커의 절단이 항체의 활성을 마스크하는 코일형 코일로부터 항체를 방출하여 항체가 의도된 표적, 예컨대, 세포-표면 항원 또는 가용성 리간드에 결합할 수 있도록 해야 한다.

[0370]

가변 영역뿐만 아니라, 마스크된 항체는 전형적으로 불변 영역의 전부 또는 부분을 포함하며, 이는 경쇄 불변 영역, CH1, 힌지, CH2 및 CH3 영역 중 임의의 것 또는 전부를 포함할 수 있다. 다른 항체와 마찬가지로, 하나 이상의 C-말단 잔기가 단백질분해적으로 가공되거나 유도체화될 수 있다.

[0371]

코일형 코일은 동종이량체를 형성하는 동일한 펩타이드 또는 이종이량체를 형성하는 2 개의 상이한 펩타이드로부터 형성될 수 있다. 동종이량체의 형성의 경우, 경쇄 및 중쇄 항체 쇄는 동일한 코일형 코일 형성 펩타이드에 연결된다. 이종이량체의 형성의 경우, 경쇄 및 중쇄 항체 쇄는 상이한 코일형 코일 펩타이드에 연결된다. 코일형 코일 형성 펩타이드의 일부 쌍의 경우, 비록 반대 배향이 또한 가능하지만 쌍 중 하나는 항체의 중쇄에 연결되고 다른 하나는 경쇄에 연결되는 것이 바람직하다.

[0372]

각각의 항체 쇄는 단일 코일형 코일 형성 펩타이드 또는 다중의 이러한 펩타이드(예컨대, 펩타이드의 2, 3, 4 또는 5 개의 카피)에 직렬로 연결될 수 있다. 후자의 경우, 직렬 연결의 펩타이드는 일반적으로 동일하다. 또한, 직렬 연결이 사용되는 경우, 경쇄 및 중쇄는 보통 동일한 수의 펩타이드에 연결된다.

[0373]

코일형 코일 형성 펩타이드에 대한 항체 쇄의 연결은 이러한 연결이 없거나 이러한 연결의 절단 후에 동일한 항체에 비해 약 10-배, 약 50-배, 약 100-배, 약 200-배, 약 500-배, 약 1000-배 또는 약 1500-배 이상으로 항체의 결합 친화도를 감소시킬 수 있다. 일부 이러한 항체에서, 결합 친화도는 약 50-1500-배 사이, 약 100-1500-배 사이, 약 200-1500-배 사이, 약 500-1500-배 사이, 약 50-1000-배 사이, 약 100-1000-배 사이, 약 200-1000-배 사이, 약 500-1000-배 사이, 약 50-500-배 사이, 또는 약 100-500-배 사이로 감소된다. 항체 약물 접합체에서 약물에 대한 연결의 결과로서 ADCC, 식세포작용 및 CDC 또는 세포독성과 같은 항체의 효과기 기능은 동일한 인자에 의해 감소되거나 동일한 범위로 감소될 수 있다. 항체를 비마스크하거나 항체로부터 마스크를 제거하는 역할을 하는 단백질분해성 절단 시, 복원된 항체는 전형적으로 마스크되지 않은 다른 동일한 대조군 항체와 비교하여 실험 오차 내에서 2, 1.5의 계수(factor) 내에 있거나 바람직하게는 변하지 않는 친화도 또는 효과 기능을 갖는다.

[0374] 항체-약물 접합체

[0375]

특정 실시양태에서, 본 발명의 항-CD47 항체는 항체 약물 접합체(ADC)와 조합될 수 있다. 특정 ADC는 세포독성

제(예컨대, 화학요법제), 전구약물 전환 효소, 방사성 동위원소 또는 화합물, 또는 독소(이들 모이어티는 총괄적으로 치료제로서 지칭됨)를 포함할 수 있다. 예를 들어, ADC는 세포독성제, 예컨대, 화학요법제, 또는 독소(예컨대, 세포정지제, 살세포제(cytocidal agent), 예컨대, 아브린, 리신 A(ricin A), 슈도모나스 외독소 또는 디프테리아 독소)에 접합될 수 있다. 세포독성제의 유용한 부류의 예는 예를 들어, DNA 마이너 그루브 바인더, DNA 알킬화제 및 튜블린 억제제를 포함한다. 예시적인 세포독성제는 예를 들어, 아우리스타틴, 캄프토테신, 칼리케아미신, 듀오카르마이신, 에토포시드, 메이탄시노이드(예컨대, DM1, DM2, DM3, DM4), 탁산, 벤조디아제핀(예컨대, 피롤로[1,4]벤조디아제핀 이량체, 인돌리노벤조디아제핀 이량체 및 옥사졸리디노벤조디아제핀 이량체를 비롯한 피롤로[1,4]벤조디아제핀, 인돌리노벤조디아제핀 및 옥사졸리디노벤조디아제핀) 및 빈카 알칼로이드를 포함한다.

[0376] ADC는 전구-약물 전환 효소에 접합될 수 있다. 전구-약물 전환 효소는 알려진 방법을 사용하여 항체에 재조합적으로 융합되거나 이에 화학적으로 접합될 수 있다. 예시적인 전구-약물 전환 효소는 카복시펩티다제 G2, 베타-글루쿠로니다제, 페니실린-V-아미다제, 페니실린-G-아미다제,  $\beta$ -락타마제,  $\beta$ -글루코시다제, 니트로환원효소 및 카복시펩티다제 A이다.

[0377] 치료제를 단백질, 특히 항체에 접합시키는 기술은 잘 알려져 있다.(예컨대, Alley 등, Current Opinion in Chemical Biology 2010 14: 1-9; Senter, Cancer J., 2008, 14(3): 154-169 참고.) 치료제는 (예컨대, 가수 분해, 단백질분해성 분해 또는 절단제에 의해) 항체에서 절단되지 않는 한 활성을 감소시키는 방식으로 접합될 수 있다. 일부 양태에서, 치료제는 접합체가 (예컨대, 엔도솜에서 또는 예를 들어, 리소솜 환경에서 또는 카베올라(caveolar) 환경에서 pH 민감성 또는 프로테아제 민감성에 의해) CD47-발현 암 세포에 의해 내재화되는 경우 항체로부터 절단되도록 CD47-발현 암 세포의 세포내 환경에서의 절단에 민감하나 세포외 환경에서는 실질적으로 민감하지 않은 절단가능한 링커를 이용하여 항체에 부착된다. 일부 실시양태에서, 치료제는 또한 비-절단가능한 링커를 이용하여 항체에 부착될 수 있다.

[0378] 특정 예시적인 실시양태에서, ADC는 세포독성제 또는 세포정지제와 항체 사이의 링커 영역을 포함할 수 있다. 상기 언급한 바와 같이, 링커는 링커의 절단이 세포내 환경에서(예컨대, 리소솜 또는 엔도솜 또는 카베올라 내에서) 항체로부터 치료제를 방출하도록 세포내 조건 하에서 절단가능할 수 있다. 링커는 예컨대, 리소솜 또는 엔도솜 프로테아제를 포함하는 세포내 펩티다제 또는 프로테아제 효소에 의해 절단된 펩티딜 링커일 수 있다. 절단제는 카텝신 B 및 D 및 플라스민을 포함할 수 있다(예컨대, Dubowchik and Walker, Pharm. Therapeutics 83:67-123, 1999 참고). CD47-발현 세포에 존재하는 효소에 의해 절단가능한 펩티딜 링커가 가장 전형적이다. 예를 들어, 암성 조직에서 고도로 발현되는 티올-의존성 프로테아제 카텝신-B에 의해 절단가능한 펩티딜 링커(예컨대, Phe-Leu 또는 Val-Cit 펩티드를 포함하는 링커)가 사용될 수 있다.

[0379] 절단가능한 링커는 pH-민감성, 즉, 특정 pH 값에서 가수분해에 민감성일 수 있다. 전형적으로, pH-민감성 링커는 산성 조건 하에서 가수분해가능하다. 예를 들어, 리소솜에서 가수분해 가능한 산-불안정성(labile) 링커(예컨대, 하이드라존, 세미카르바존, 티오세미카르바존, 시스-아코니틱 아마이드, 오르토에스테르, 아세탈, 케탈, 또는 기타 등등)가 사용될 수 있다.(예컨대, 미국특허 제5,122,368호; 제5,824,805호; 제5,622,929호; Dubowchik and Walker, Pharm. Therapeutics 83:67-123, 1999; Neville et al, Biol. Chem. 264: 14653-14661, 1989 참고.) 이러한 링커는 중성 pH 조건, 예컨대, 혈액에서의 pH 조건 하에서 비교적 안정적이나, 리소솜의 대략적인 pH인 pH 5.5 또는 5.0 미만에서는 불안정하다.

[0380] 다른 링커(예컨대, 디설파이드 링커)는 환원 조건 하에서 절단가능하다. 디설파이드 링커는 SATA(N-숙신이미딜-S-아세틸티오아세테이트), SPDP(N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트), SPDB(N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)부티레이트) 및 SMPT(N-숙신이미딜-옥시카보닐-알파-메틸-알파-(2-피리딜-디티오)톨루엔), SPDB 및 SMPT를 사용하여 형성될 수 있는 것들을 포함한다.(예컨대, Thorpe 등, Cancer Res. 47:5924-5931, 1987; Wawrzynczak 등, In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer 참고.(C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. 또한 미국특허 제4,880,935호 참고.)

[0381] 링커는 또한 말로네이트 링커(Johnson et al, Anticancer Res. 15 : 1387-93, 1995), 말레이미도벤조일 링커(Lau 등, Bioorg-Med-Chem. 3: 1299-1304, 1995), 또는 3'-N-아미드 유사체(Lau 등, Bioorg-Med-Chem. 3: 1305-12, 1995)일 수 있다.

[0382] 링커는 또한, 비-절단가능한 링커, 예컨대, 치료제에 직접적으로 부착되고 항체의 단백질분해성 분해에 의해 방출되는 말레이미도-알킬렌 또는 말레이미드-아릴 링커일 수 있다.

- [0383] 전형적으로, 링커는 세포의 환경에 실질적으로 민감하지 않으며, 이는 ADC가 세포의 환경(예컨대, 혈장)에 존재하는 경우 ADC 샘플에서 링커의 약 20% 이하, 전형적으로 약 15% 이하, 보다 전형적으로 약 10% 이하, 및 더욱 더 전형적으로 약 5% 이하, 약 3% 이하, 또는 약 1% 이하가 절단된다. 링커가 세포의 환경에 실질적으로 민감하지 않은지의 여부는, 예를 들어, 소정의 시간 기간(예컨대, 2, 4, 8, 16 또는 24 시간) 동안(a) ADC("ADC 샘플") 및 (b) 동등한 물량의 비접합 항체 또는 치료제 둘 다를 혈장과 독립적으로 항온처리한 뒤, 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정된, ADC 샘플에 존재하는 비접합 항체 또는 치료제의 양을 대조군 샘플에 존재하는 양과 비교함으로써 결정될 수 있다.
- [0384] 링커는 또한 세포 내재화를 촉진할 수 있다. 링커는 치료제에 접합되는 경우(즉, 본원에 기술된 ADC 또는 ADC 유도체의 링커-치료제 모이어티의 환경에서), 세포 내재화를 촉진할 수 있다. 대안적으로, 링커는 치료제 및 항체 둘 다에 접합되는 경우(즉, 본원에 기술된 ADC 환경에서), 세포 내재화를 촉진할 수 있다.
- [0385] 항체는 항체의 헤테로원자를 통해 링커에 접합될 수 있다. 이들 헤테로원자는 자연 상태로 항체에 존재할 수 있거나 항체 내에 도입될 수 있다. 일부 양태에서, 항체는 리신 잔기의 질소 원자를 통해 링커에 접합될 것이다. 다른 양태에서, 항체는 시스테인 잔기의 황 원자를 통해 링커에 접합될 것이다. 링커 및 약물-링커를 항체에 접합시키는 방법은 당업계에 알려져 있다.
- [0386] 예시적인 항체-약물 접합체는 약물 구성요소가 아우리스타틴 약물임을 의미하는 아우리스타틴 기반 항체-약물 접합체를 포함한다. 아우리스타틴은 튜불린에 결합하여 미세소관 역학 및 핵 및 세포 분열을 방해하고 항암 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 전형적으로 아우리스타틴 기반 항체-약물 접합체는 아우리스타틴 약물과 항-CD47 항체 사이의 링커를 포함한다. 링커는 예를 들어, 절단가능한 링커(예컨대, 펩티딜 링커) 또는 비-절단가능한 링커(예컨대, 항체의 분해에 의해 방출된 링커)일 수 있다. 아우리스타틴은 MMAF 및 MMAE를 포함한다. 예시적인 아우리스타틴의 합성 및 구조는 미국 공개공보 제7,659,241호, 제7,498,298호, 제2009-0111756호, 제2009-0018086호 및 제7,968,687호에 기술되며, 이들 각각은 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참고로 인용된다.
- [0387] 다른 예시적인 항체-약물 접합체는 약물 구성요소가 메이탄시노이드 약물임을 의미하는 메이탄시노이드 항체-약물 접합체, 및 약물 구성요소가 벤조디아제핀(예컨대, 피롤로[1,4]벤조디아제핀 이량체, 인돌리노벤조디아제핀 이량체 및 옥사졸리디노벤조디아제핀 이량체)임을 의미하는 벤조디아제핀 항체 약물 접합체를 포함한다.
- [0388] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항-CD47 항체는 상이한 표적에 대한 결합 특이성을 갖는 ADC와 조합될 수 있다. 항-CD47 항체와 조합될 수 있는 예시적인 ADC는 브렌투시맙 베도틴(항-CD30 ADC), 엔포르투맙 베도틴(항-넥틴-4 ADC), 라디라투주맙 베도틴(항-LIV-1 ADC), 데닌투주맙 마포도틴(항-CD19 ADC), 글렘바투무맙 베도틴(항-GPNMB ADC), 항-TIM-1 ADC, 플라투주맙 베도틴(항-CD79b ADC), 항-MUC16 ADC, 데파특시주맙 마포도틴, 텔리소투주맙 베도틴, 항-PSMA ADC, 항-C4.4a ADC, 항-BCMA ADC, 항-AXL ADC, 티소투우맙 베도틴(항-조직 인자 ADC)을 포함한다.
- [0389] 항체 분자 발현
- [0390] 본 발명의 핵산은 본 발명의 항체 또는 마스킹된 항체를 코딩하는 내인성 DNA를 함유하는 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 이러한 방법은, 예컨대, 미국특허 제5,580,734호, 제5,641,670호, 제5,733,746호, 및 제5,733,761호에 기술된 바와 같이 당업계에 잘 알려져 있다. 또한, 예컨대, 상기 Sambrook, 등, 및 상기 Ausubel, 등, 참고. 당업자는 본 발명의 단백질을 코딩하는 핵산의 발현에 이용 가능한 수많은 발현 시스템에 대해 잘 알고 있다. 항체, 마스킹된 항체, 이의 특정 부분 또는 변이체의 생산에 유용한 세포 배양의 예시는 포유동물 세포이다. 포유동물 세포 시스템은 종종 포유동물 세포 현탁액 또는 생물반응기가 또한 사용될 수 있지만, 세포의 단층 형태일 것이다. 온전한 글리코실화된 단백질을 발현할 수 있는 다수의 적합한 숙주 세포주는 당업계에서 개발되었으며, COS-1(예컨대, ATCC CRL 1650), COS-7(예컨대, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21(예컨대, ATCC CRL-10), CHO(예컨대, ATCC CRL 1610) 및 BSC-1(예컨대, ATCC CRL-26) 세포주, hep G2 세포, P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 헬라 세포 등을 포함하며, 이는 예를 들어, 미국 버지니아주 매너서스의 American Type Culture Collection에서 용이하게 이용가능하다. 효모 및 박테리아 숙주 세포가 또한 사용될 수 있으며 당업자에게 잘 알려져 있다. 본 발명의 핵산 또는 단백질의 생산에 유용한 다른 세포는, 예를 들어, 세포주 및 하이브리도마의 American Type Culture Collection Catalogue 또는 다른 알려진 또는 상업적 공급원으로부터 알려지고/지거나 이용가능하다.
- [0391] 발현 벡터는 다음의 하나 이상의 발현 제어 서열, 예컨대, 비제한적으로 복제 기점; 프로모터(예컨대, 후기 또는 초기 SV40 프로모터, CMV 프로모터(미국특허 제5,168,062호; 제5,385,839호), HSV tk 프로모터, pgk(포스포 글리세레이트 키나제) 프로모터, EF-1 알파 프로모터(미국특허 제5,266,491호), 하나 이상의 인간 면역글로불린

프로모터; 인헨서 및/또는 가공 정보 부위, 예컨대, 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위(예컨대, SV40 대 T Ag 폴리 A 첨가 부위) 및 전사 종결자 서열)을 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 Ausubel 등.; 상기 Sambrook, 등, 참고.

[0392] 발현 벡터는 임의로 하나 이상의 선택가능한 마커를 포함한다. 이러한 마커는, 예컨대, 메토티렉세이트(MTX), 디하이드로폴레이트 환원효소(DHFR, 미국특허 제4,399,216호; 제4,634,665호; 제4,656,134호; 제4,956,288호; 제5,149,636호; 제5,179,017호), 암피실린, 네오마이신(G418), 미코페놀산, 또는 글루타민 합성효소(GS, 미국특허 제5,122,464호; 제5,770,359호; 및 제5,827,739호), 진핵생물 세포 배양에 대한 내성, 및 대장균 및 다른 박테리아 또는 원핵생물을 배양하기 위한 테트라사이클린 또는 암피실린 내성 유전자를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 기술된 숙주 세포에 대한 적절한 배양 배지 및 조건은 당업계에 알려져 있다. 적합한 벡터는 당업자에게 용이하게 명백할 것이다. 숙주 세포 내로 벡터 물의 도입은 칼슘 포스페이트 형질주입, DEAE-텍스트란 매개 형질주입, 양이온성 지질-매개 형질주입, 전기천공, 형질도입, 감염 또는 다른 알려진 방법에 의해 영향을 받을 수 있다. 이러한 방법은 당업계, 예컨대, 상기 Sambrook; 상기 Ausubel에 기술된다.

[0393] 핵산 삽입체는 적절한 프로모터에 작동가능하게 연결되어야 한다. 발현 물은 전사 개시, 종결을 위한 부위, 및 전사된 영역에서 번역을 위한 리보솜 결합 부위를 추가로 함유할 것이다. 작제물에 의해 발현된 성숙 전사체의 코딩 부분은 바람직하게는 시작 시 개시되는 번역 및 번역될 mRNA의 말단에 적절하게 위치한 종결 코돈(예컨대, UAA, UGA 또는 UAG)을 포함할 것이며, UAA 및 UAG가 포유동물 또는 진핵생물 세포 발현에 대해 바람직하다.

[0394] 핵산 삽입체는 임의로, 예컨대, 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 서열의 N-말단에서 코일형 코일 서열 및/또는 MMP 절단 서열과 함께 프레임에 존재한다. 대안적으로, 코일형 코일 서열 및/또는 MMP 절단 서열은 예컨대 디설파이드 결합 등을 통해 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 번역-후 첨가될 수 있다.

[0395] 진핵생물 숙주 세포가 사용되는 경우, 폴리아데닐화 또는 전사 종결자 서열은 전형적으로 벡터 내에 혼입된다. 종결자 서열의 예는 소 성장 호르몬 유전자로부터의 폴리아데닐화 서열이다. 전사체의 정확한 스플라이싱을 위한 서열이 또한 포함될 수 있다. 스플라이싱 서열의 예는 SV40의 VP1 인트론이다(Sprague, 등(1983) J. Virol. 45:773-781). 또한, 당업계에 알려진 바와 같이 숙주 세포에서의 복제를 제어하기 위한 유전자 서열이 벡터 내에 혼입될 수 있다.

[0396] 항체 단리 및 정제

[0397] 본원에 기술된 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체는 단백질 A 정제, 암모늄 설페이트 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피를 비제한적으로 포함하는 알려진 방법에 의해 재조합 세포 배양물로부터 회수 및 정제될 수 있다. 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)가 또한 정제를 위해 사용될 수 있다. 예컨대, Colligan, Current Protocols in Immunology, or Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1997-2001) 참고.

[0398] 본원에 기술된 항체 및 마스킹된 항체는 정제된 생성물, 화학적 합성 절차의 생성물 및 예를 들어, 효모, 고등 식물, 곤충 및 포유동물 세포를 포함하는 진핵생물 숙주로부터 재조합 기술에 의해 생성된 생성물을 포함할 수 있다. 재조합 생산 절차에 사용된 숙주에 따라, 본 발명의 항체 또는 마스킹된 항체는 글리코실화될 수 있거나 비-글리코실화될 수 있으며, 글리코실화가 바람직하다. 이러한 방법은 많은 표준 실험실 매뉴얼, 예컨대, 상기 Sambrook; 상기 Ausubel; 상기 Colligan, Protein Science에 기술된다.

[0399] 핵산 분자

[0400] 본 발명의 핵산 분자는 RNA 형태, 예컨대, mRNA, hnRNA, tRNA 또는 임의의 다른 형태, 또는 클로닝에 의해 수득되거나 합성에 의해 생성된 cDNA 및 게놈 DNA를 비제한적으로 포함하는 DNA 형태, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. DNA는 삼중-가닥, 이중-가닥 또는 단일-가닥, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. DNA 또는 RNA의 하나 이상의 가닥의 임의의 부분은 센스 가닥으로서 또한 알려진 코딩 가닥일 수 있거나, 안티센스 가닥으로서 또한 지칭되는 비-코딩 가닥일 수 있다.

[0401] 본 발명의 단리된 핵산 분자는 임의로 하나 이상의 인트론을 갖는 오픈 리딩 프레임(ORF), 예컨대, 비제한적으로 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3로서 하나 이상의 CDR의 하나 이상의 특정 부분을 포함하는 핵산 분자; 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체, 또는 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체 가변 영역에 대한 코딩 서열을 포함하는 핵산 분자; 및 상기 기술된 것과 실질적으로 상이한 뉴클레오티드 서열을 포함하지만, 유전자 코드의 축퇴성(degeneracy)으로 인해 본원에 기술되고/되거나 당업계에 알려진 바와 같은 하나 이상의

항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체를 여전히 코딩하는 핵산 분자를 포함할 수 있다. 유전자 코드가 당업계에 잘 알려져 있다는 것을 고려하면, 당업자는 본 발명의 특정 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체를 코딩하는 이러한 축퇴된 핵산 변이체를 생성하는 것이 일상적이다.

[0402] 본원에 나타난 바와 같이, 항-CD47 항체 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 본 발명의 핵산 분자는 그 자체로 항체 단편의 아미노산 서열을 코딩하는 것들; 전체 항체 또는 이의 일부에 대한 코딩 서열; 항체, 단편 또는 부분에 대한 코딩 서열, 뿐만 아니라 비제한적으로 비-코딩 5 '및 3' 서열, 예컨대, 전사, 스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호(예를 들어, mRNA의 리보솜 결합 및 안정성)를 비롯한 mRNA 가공에서 역할을 하는 전사된 비-번역된 서열을 포함하는 추가의 비-코딩 서열과 함께, 상기 언급된 추가 코딩 서열, 예컨대, 하나 이상의 인트론을 포함하거나 포함하지 않는, 마스킹제(예컨대, 코일형 코일 마스킹제) 및/또는 MMP 절단 서열 중 하나 또는 둘 다와 같은 추가 서열; 추가의 아미노산, 예컨대, 추가의 기능성을 제공하는 것들을 코딩하는 추가의 코딩 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체를 코딩하는 서열은 마커 서열, 예컨대, 항체 단편 또는 일부를 포함하는 융합된 항체의 정제를 용이하게 하는 펩티드를 코딩하는 서열에 융합될 수 있다.

[0403] 핵산의 구축(construction)

[0404] 본 발명의 단리된 핵산은 당업계에 잘 알려진 (a) 재조합 방법, (b) 합성 기술, (c) 정제 기술 또는 이들의 조합을 사용하여 제조될 수 있다. 핵산은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 외에 서열들을 편리하게 포함할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 엔도뉴클레아제 제한 부위를 포함하는 다중-클로닝 부위는 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕기 위해 핵산 내에 삽입될 수 있다. 또한, 번역가능한 서열은 본 발명의 번역된 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕기 위해 삽입될 수 있다. 예를 들어, 헥사-히스티딘 마커 서열은 본 발명의 단백질을 정제하기 위한 편리한 수단을 제공한다. 코딩 서열을 제외한 본 발명의 핵산은 임의로 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 클로닝 및/또는 발현을 위한 벡터, 어댑터 또는 링커이다. 추가 서열은 클로닝 및/또는 발현에서의 기능을 최적화하거나, 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕거나, 세포 내로의 폴리뉴클레오티드의 도입을 개선시키기 위해 이러한 클로닝 및/또는 발현 서열에 첨가할 수 있다. 클로닝 벡터, 발현 벡터, 어댑터 및 링커의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. (예컨대, 상기 Ausubel; 또는 상기 Sambrook 참고.)

[0405] 본 발명의 단리된 핵산 조성물, 예컨대, RNA, cDNA, 게놈 DNA 또는 이들의 임의의 조합은 당업자에게 알려진 임의의 수의 클로닝 방법론을 사용하여 생물학적 공급원으로부터 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 엄격한 조건 하에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 선택적으로 하이브리드 화하는 올리고뉴클레오티드 프로브는 cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리에서 원하는 서열을 식별하는데 사용된다. RNA의 단리 및 cDNA 및 게놈 라이브러리의 구축은 당업자에게 널리 알려져 있다.(예컨대, 상기 Ausubel; 또는 상기 Sambrook 참고.)

[0406] **III. 치료적 적용**

[0407] 본 발명은 CD47을 발현하는 세포, 예컨대, 암과 연관된 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 세포는 관심 장애와 연관이 없는 세포에 비해 상승된 수준의 CD47을 발현할 수 있거나 발현하지 않을 수 있다. 결과적으로, 본 발명은 본원에 기술된 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체를 사용하여 대상체, 예를 들어, 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 방법은 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체, 또는 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 것을 포함한다.

[0408] 본원에 사용된 용어 "대상체" 및 "환자"는 본 발명의 방법에 의해 처리될 유기체를 지칭한다. 이러한 유기체는 바람직하게 포유류(예컨대, 무린, 유인원, 말, 소, 돼지, 개, 고양이 등)를 포함하나, 이에 제한되지는 않으며, 보다 바람직하게 인간을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는", 예컨대, 저감, 감소, 조정, 완화 또는 제거는 병태, 질환, 장애 등의 개선을 유발하거나 이의 증상을 완화하는 임의의 효과, 예컨대 예를 들어, 감소된 암 세포 수, 감소된 종양 크기, 감소된 말초 기관으로의 암 세포의 침윤 속도, 또는 감소된 종양 전이 또는 종양 성장 속도를 포함한다.

[0409] 암에서의 긍정적인 치료 효과는 많은 방식으로 측정될 수 있다(W. A. Weber, J. Nu11. Med. 50:1S-10S(2009); 상기 Eisenhauer 등, 참고). 일부 바람직한 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체에 대한 반응은 RECIST 1.1 기준을 사용하여 평가하였다. 일부 실시양태에서, 치료적 유효량에 의해 달성되는 치료는 부분 반응(PR), 완전 반응(CR), 무 진행 생존(PFS), 무 질환 생존(DFS), 객관적 반응(OR) 또는 전체 생존(OS) 중 어느 하나이다. 일차 또는 이차 간암 환자를 치료하는데 효과적인 본원에 기술된 요법의 투여량 양생법은 요인, 예컨대, 환자의 질환 상태, 연령 및 체중, 및 대상체의 항-암 반응을 이끌어내는 요법의 능력에 따라 달라질 수 있다. 본 발명의 치료 방법, 의약 및 용도의 실시양태가 모든 대상체에서 긍정적인 치료 효과를 달성하는 데 효과

적이지 않을 수 있지만, 당업계에 알려진 임의의 통계적 테스트, 예컨대, 스튜던트 t-검정(Student's t-test), 카이2-검정(chi2-test), 맨-휘트니에 따른 U-검정(U-test according to Mann and Whitney), 크루스칼-왈리스 검정(Kruskal-Wallis test)(H-test), 존키어-터프스프라 검정(Jonckheere-Terpstra-test) 및 윌콕슨-검정(Wilcoxon-test)에 의해 결정된 대상체의 통계적으로 유의한 수에서 그렇게 해야만 한다.

[0410] 본원에 사용된 "RECIST 1.1 반응 기준"은 반응이 측정되는 상황에 기초하여, 적절한 경우 표적 병변 또는 비-표적 병변에 대해 Eisenhauer 등, E. A. 등, Eur. J Cancer 45:228-247(2009)에 개시된 정의를 의미한다.

[0411] 일차 또는 이차 간암으로 진단되거나 이를 갖는 것으로 의심되는 대상체에 적용되는 "종양"은 임의의 크기의 악성 또는 잠재적으로 악성 신생물 또는 조직 덩어리를 지칭한다. 고형 종양은 보통 낭종 또는 액체 영역을 함유하지 않는 조직의 비정상적인 성장 또는 덩어리이다. 고형 종양의 다른 유형은 이들을 형성하는 세포의 유형으로 명명된다. 고형 종양의 예는 육종, 암종 및 림프종이다. 백혈병(혈액 암)은 일반적으로 고형 종양을 형성하지 않는다(국립 암 연구소, 암 용어 사전(National Cancer Institute, Dictionary of Cancer Terms)). 비제한적인 예시적인 육종은 연조직 육종 및 골육종을 포함한다.

[0412] "종양 부하(tumor load)"로서 또한 지칭되는 "종양 부담(tumor burden)"은, 신체 전체에 분포된 종양 물질의 총량을 지칭한다. 종양 부담은 림프절 및 좁은 뼈(bone marrow)를 비롯한 신체 전체의 암 세포의 총 수 또는 종양(들)의 총 크기를 지칭한다. 종양 부담은 당업계에 알려진 다양한 방법에 의해, 예컨대, 캘리퍼를 사용하여 대상체로부터 제거 시 또는 이미징 기술, 예컨대, 초음파, 뼈 스캔, 컴퓨터 단층 촬영(CT) 또는 자기 공명 영상(MRI) 스캔을 사용하여 신체에서 종양(들)의 치수를 측정함으로써 결정될 수 있다.

[0413] 용어 "종양 크기"는 종양의 길이 및 폭으로서 측정될 수 있는 종양의 총 크기를 지칭한다. 종양 크기는 당업계에서 알려진 다양한 방법에 의해, 예컨대, 캘리퍼를 사용하여 대상체로부터 제거 시 또는 이미징 기술, 예컨대, 뼈 스캔, 초음파, CT 또는 MRI 스캔을 사용하여 신체에서 종양(들)의 치수를 측정함으로써 결정될 수 있다.

[0414] 본원에 사용된 용어 "유효량"은 유익하거나 원하는 결과를 달성하기에 충분한 화합물(예컨대, 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체)의 양을 지칭한다. 유효량은 1 회 이상의 투여, 적용 또는 투여량으로 투여될 수 있으며 특정 제형 또는 투여 경로로 제한되도록 의도되지 않는다. 일반적으로, 활성 구성요소의 치료적 유효량은 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg, 예컨대, 1 mg/kg 내지 100 mg/kg, 1 mg/kg 내지 10 mg/kg의 범위이다. 투여되는 투여량은 알려진 인자, 예컨대, 특정 작용제의 약력학적 특성, 및 투여 방식 및 투여 경로; 수령자의 연령, 건강 및 체중; 치료할 질환 또는 징후(indication)의 유형 및 정도, 증상의 본질 및 정도, 병행 치료의 종류, 치료 빈도 및 원하는 효과에 따라 달라질 수 있다. 초기 투여량은 원하는 혈액-수준 또는 조직-수준을 신속하게 달성하기 위해 상위 수준 이상으로 증가시킬 수 있다. 대안적으로, 초기 투여량은 최적보다 작을 수 있고, 일일 투여량은 치료 과정 동안 점진적으로 증가될 수 있다. 인간 투여량은, 예컨대, 0.5 mg/kg 내지 20 mg/kg으로 작동하도록 설계된 통상적인 I 상 투여량 단계적 증가(dose escalation) 연구에서 최적화될 수 있다. 투여 빈도는 인자, 예컨대, 투여 경로, 투여량 양, 항체의 혈청 반감기 및 치료될 질환에 따라 달라질 수 있다. 예시적인 투여 빈도는 1 일 1 회, 주 1 회 및 2 주마다 1 회이다. 모노클로날 항체-기반 약물의 제형은 통상적인 기술 내에 있다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 동결건조된 다음 투여 시점에 완충 식염수로 재구성된다.

[0415] 특정 예시적인 실시양태에서, 본 발명은 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에서 암의 치료 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 인간에서 고형암의 치료 방법을 제공한다. 예시적인 암은 암을 갖는 세포에서 CD47 발현을 소유하는 것들(즉, "CD47-발현 암")이다. 암의 예는 고형 종양, 연조직 종양, 고형 종양을 유발하는 조혈 종양 및 전이성 병변을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 고형 종양을 유발할 가능성이 있는 조혈 종양의 예는 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 여포성 림프종, 골수이형성 증후군(MDS), 림프종, 호지킨 병, 악성 림프종, 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 다발성 골수종, 리히터 증후군(리히터 형질전환) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 고형 종양의 예는 다양한 기관계, 예컨대, 두경부(인두 포함), 갑상선, 폐(소 세포 또는 비-소 세포 폐 암종(NSCLC)), 유방, 림프, 위장관(예컨대, 구강, 식도, 위, 간, 췌장, 소장, 결장 및 직장, 항문관), 생식기 및 비노생식기 관(예컨대, 신장, 요로, 방광, 난소, 자궁, 자궁 경부, 자궁 내막, 전립선, 고환), 중추 신경계(예컨대, 신경 또는 신경아교세포, 예컨대, 신경모세포종 또는 신경교종), 피부(예컨대, 흑색종) 등의 악성종양, 예컨대, 육종(연조직 육종 및 골육종 포함), 선암종 및 암종을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 고형 종양은 NMDA 수용체 양성 기형종이다. 다른 실시양태에서, 암은 유방암, 결장암, 췌장암(예컨대, 췌장 신경내분비 종양(PNET) 또는 췌장 관 선암(PDAC)), 위암, 자궁암 및 난소암으로부터 선택된다.

[0416] 특정 실시양태에서, 암은 백혈병, 예컨대, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 급성 골

수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 모발 세포 백혈병(HCL), T 세포 전림프구성 백혈병(T-PLL), 큰 과립성 림프구성 백혈병, 성체 T 세포 백혈병 및 급성 단핵구성 백혈병(AMoL)으로부터 선택되나, 이에 제한되지 않는다.

[0417] 일 실시양태에서, 암은 복수와 연관된 고형 종양이다. 복수는 여러 유형의 암의 증상이며 또한 많은 병태, 예컨대, 진행성 간 질환에 의해 유발될 수 있다. 복수를 유발할 가능성이 있는 암의 유형은 유방, 폐, 대장(결장), 위, 췌장, 난소, 자궁(자궁 내막) 및 복막 등의 암을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 복수와 연관된 고형 종양은 유방암, 결장암, 췌장암, 위, 자궁암 및 난소암으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 흉수, 예컨대 폐암과 연관된다.

[0418] 고형 종양을 유발하는 추가 혈액암은 비-호지킨 림프종(예컨대, 미만성 거대 B 세포 림프종, 맨틀 세포 림프종, B 림프모구성 림프종, 말초 T 세포 림프종 및 버킷 림프종), B 림프모구성 림프종; B 세포 만성 림프구성 백혈병/소 림프구성 림프종; 림프형질세포성 림프종; 비장 변연부 B 세포 림프종(± 용모 림프구); 혈장 세포 골수종/형질세포종; MALT 유형의 결절외 변연부 B 세포 림프종; 결절 변연부 B 세포 림프종(± 단핵구모양 B 세포); 여포성 림프종; 미만성 거대 B 세포 림프종; 버킷 림프종; 전구 T 림프모구성 림프종; T 성체 T 세포 림프종 (HTLV 1-양성); 결절의 NK/T 세포 림프종, 코 유형; 장병변-유형 T 세포 림프종; 간비장  $\gamma$ - $\delta$  T 세포 림프종; 피하 지방층염-유사 T 세포 림프종; 균상 식육종/시자리 증후군; 역형성 대 세포 림프종, T/닐 세포, 일차 피부 유형; 역형성 대 세포 림프종, T-/닐-세포, 일차 전신 유형; 달리 특성화되지 않는 말초 T 세포 림프종; 혈관면역모구성 T 세포 림프종, 다발성 골수종, 진성 다혈구증 또는 골수섬유증, 피부 T 세포 림프종, 소 림프구성 림프종(SLL), 변연부 림프종, CNS 림프종, 면역모구성 대 세포 림프종 및 전구 B 림프모구성 림프종 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0419] 특정 실시양태에서, 암은 육종, 결장 직장암, 두경부암, 폐암, 난소암, 췌장암, 위암, 흑색종 및/또는 유방암이다.

[0420] 본원에 기술된 항-CD47 항체 및 마스킹된 항체는 또한 암과 연관된 장애, 예컨대, 암-유발 뇌병증을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0421] 본 발명의 방법 및 조성물은 다른 치료제 및/또는 모달리티(modality)와 병용하여 사용될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "병용" 투여되는은, 장애로 인한 대상체의 고통의 과정 동안에 2 종(이상)의 상이한 치료가 대상체에 전달되어 환자에 대한 치료의 효과가 특정 시점에서 중첩하도록 하는 것을 의미하도록 이해된다. 특정 실시양태에서, 하나의 치료의 전달은 제2 전달이 시작될 때도 여전히 발생하여, 투여 측면에서 중첩이 있도록 한다. 이것은 본원에서 때때로 "동시" 또는 "병행 전달"로서 지칭된다. 다른 실시양태에서, 하나의 치료의 전달은 다른 치료의 전달이 시작되기 전에 종료된다. 어느 경우 든 일부 실시양태에서, 치료는 병용 투여로 인해 보다 효과적이다. 예를 들어, 제2 치료는 보다 효과적이거나, 예컨대, 등가 효과가 제2 치료가 적을 때 나타나거나, 제2 치료는 제1 치료의 부재 시, 또는 제1 치료로 관찰되는 유사한 상황 시에 투여되는 경우 나타난 것보다 더 큰 정도로 증상을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 전달은 증상의 감소, 또는 장애와 관련된 다른 파라미터가 다른 치료의 부재 시 전달되는 하나의 치료로 관찰되는 것보다 더 클 수 있도록 한다. 두 치료의 효과는 부분적으로 부가적이거나, 완전히 부가적이거나, 또는 부가적보다 클 수 있다(즉, 상승작용적 반응). 전달은 전달된 제1 치료의 효과가 제2가 전달될 때 여전히 검출가능하도록 할 수 있다.

[0422] 일 실시양태에서, 본 발명의 방법은 하나 이상의 추가 요법, 예컨대, 수술, 방사선 요법 또는 다른 치료적 제제의 투여와 병용하여 본원에 기술된 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체, 예컨대, 조성물 또는 제제를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시양태에서, 추가 요법은 화학요법, 예컨대, 세포독성제를 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 추가 요법은 표적 요법, 예컨대, 티로신 키나제 억제제, 프로테아좀 억제제 또는 프로테아제 억제제를 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 추가 요법은 항-염증제, 항-혈관신생, 항-섬유증 또는 항-증식성 화합물, 예컨대, 스테로이드, 생물학적 면역조절제, 예컨대, 면역 체크포인트 분자의 억제제, 모노클로날 항체, 항체 단편, 앵타머, siRNA, 안티센스 분자, 융합 단백질, 사이토카인, 사이토카인 수용체, 기관지확장제, 스타틴, 항-염증제(예컨대, 메토틱세이트) 또는 NSAID를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 추가 요법은 상이한 클래스의 요법을 병용하는 것을 포함할 수 있다. 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체 제제 및 추가 요법은 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0423] 본원에 사용된 "면역 체크포인트 분자"는 신호를 올리거나(자극성 분자) 신호를 낮추는(억제성 분자) 면역계의 분자를 지칭한다. 많은 암이 T 세포 시그널링을 억제함으로써 면역계를 회피한다.

- [0424] 예시적인 면역 체크포인트 분자는 프로그램된 세포 사멸 단백질 1(PD-1), 프로그램된 사멸-리간드 1(PD-L1), PD-L2, 세포독성 T 림프구-연관 단백질 4(CTLA-4), T 세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인 함유 3(TIM-3), 림프구 활성화 유전자 3(LAG-3), 암배아성 항원 관련 세포 부착 분자 1(CEACAM-1), CEACAM-5, T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제자(VISTA), B 및 T 림프구 약화인자(BTLA), Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체(TIGIT), 백혈구-연관 면역글로불린-유사 수용체 1(LAIR1), CD160, TGFR, 아테노신 2A 수용체(A2AR), B7-H3(또한 CD276 으로서 알려짐), B7-H4(또한 VTCN1이라고 함), 인돌아민 2,3-디옥시게나제(IDO), 2B4 및 살해 세포 면역글로불린-유사 수용체(KIR) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0425] 본원에 사용된 "면역 체크포인트 억제제"는 하나 이상의 억제성 체크포인트 분자를 억제 및/또는 차단하는 분자 (예컨대, 소분자, 모노클로날 항체, 항체 단편 등)를 지칭한다.
- [0426] 예시적인 면역 체크포인트 억제제는 다음 모노클로날 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다: PD-1 억제제, 예컨대, 켈트루리주맙(Keytruda, Merck) 및 니볼루맙(Opdivo, Bristol-Myers Squibb); PD-L1 억제제, 예컨대, 아테졸리주맙(Tecentriq, Genentech), 아벨루맙(Bavencio, Pfizer), 두르발루맙(Imfinzi, AstraZeneca); 및 CTLA-1 억제제, 예컨대, 이필리무맙(Yervoy, Bristol-Myers Squibb).
- [0427] 예시적인 세포독성제는 항-미세소관제, 토포아이스머라제 억제제, 항대사산물, 단백질 합성 및 분해 억제제, 유사분열 억제제, 알킬화제, 백금화제, 핵산 합성 억제제, 히스톤 디아세틸라제 억제제(HDAC 억제제, 예컨대, 보리노스타트(SAHA, MK0683), 엔티노스타트(MS-275), 파노비노스타트(LBH589), 트리코스타틴 A(TSA), 모세티노스타트(MGCD0103), 벨리노스타트(PXD101), 로미텡신(FK228, 텡시캡티드)), DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제, 질소 머스타드, 니트로소우레아, 에틸렌이민, 알킬 설포네이트, 트리아젠, 염산 유사체, 뉴클레오시드 유사체, 리보뉴클레오티드 환원효소 억제제, 빈카 알칼로이드, 탁산, 에포틸론, 삽입제, 신호 전달 경로를 방해할 수 있는 작용제, 아폽토시스 및 방사선을 촉진하는 작용제, 또는 독성제를 전달하기 위해 표면 단백질에 결합하는 항체 분자 접합체를 포함한다. 일 실시양태에서, 본원에 기술된 제제와 함께 투여될 수 있는 세포독성제는 백금-기반 작용제(예컨대, 시스플라틴), 사이클로포스파미드, 다카르바진, 메토크세이트, 플루오로우라실, 켄시타빈, 카페시타빈, 하이드록시우레아, 토포테칸, 이리노테칸, 아자사이티딘, 보리노스타트, 익사베필론, 보르테조미드, 탁산(예컨대, 파클리탁셀 또는 도세탁셀), 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈, 콜히친, 안트라사이클린(예컨대, 독소루비신 또는 에피루비신) 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 액티노마이신 D, 아드리아마이신, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신, 리신(ricin) 또는 메이탄시노이드이다.
- [0428] 본 발명의 방법 및 조성물은 CD47 양성 암을 갖는 대상체의 치료에 사용될 수 있다. 일 실시양태에서, CD47 양성 암은 하나 이상의 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)를 발현한다. 예시적인 MMP는 MMP1 내지 MMP28을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 특히 예시적인 MMP는 MMP2 및 MMP9를 포함한다. 일 실시양태에서, CD47 양성 암은 침윤성 대식세포가 존재하는 종양이다.
- [0429] 본 발명의 방법 및 조성물은 하나 이상의 MMP를 발현하고 침윤성 대식세포를 함유하는 CD47 양성 암을 갖는 대상체의 치료에 사용될 수 있다.
- [0430] CD47 양성 암의 존재, MMP 발현, 및 종양 침윤성 대식세포의 존재를 결정하는 방법은 당업계에 알려져 있다.
- [0431] 대상체에서 CD47 양성 암의 평가는 면역조직화학(IHC), 웨스턴 블롯, 유세포 분석 또는 RNA 시퀀싱 방법을 포함하는 통상적인 방법에 의해 결정될 수 있다. IHC, 웨스턴 블롯 및 유세포 분석은 당업계에 알려진 임의의 항-CD47 항체뿐만 아니라 본원에 개시된 항-CD47 항체를 이용하여 분석할 수 있다.
- [0432] 조직에서 대식세포 침윤의 평가는 면역조직화학(IHC), 웨스턴 블롯, 유세포 분석, 또는 RNA 시퀀싱 방법을 포함하는 통상적인 방법에 의해 마우스 대식세포의 경우 F4/80, 또는 CD163, CD68 또는 CD11b를 포함하는 대식세포의 표면 마커를 모니터링함으로써 수행될 수 있다.
- [0433] 조직에서 프로테아제의 평가는 프로테아제 활성을 모니터링하는 것뿐만 아니라 단백질분해 활성을 검출할 수 있는 것 둘 다를 포함하는 다양한 기술을 사용하여 모니터링될 수 있다. 프로테아제의 불활성 및 활성 형태 둘 다를 포함할 수 있는 조직에서 프로테아제의 존재를 검출할 수 있는 통상적인 방법은 IHC, RNA 시퀀싱, 웨스턴 블롯 또는 ELISA-기반 방법을 포함한다. 추가 기술은 조직에서 프로테아제 활성을 검출하기 위해 사용될 수 있는데, 이는 자이모그래피, 형광 현미경 검사법에 의한 인 시츄 자이모그래피 또는 형광 단백질분해 기질의 사용을 포함한다. 또한, 형광 단백질분해 기질의 사용은 특정 프로테아제의 면역-포획과 조합될 수 있다. 또한, 프로테

아제의 활성 부위에 대한 항체는 IHC, 형광 현미경, 웨스턴 블롯, ELISA 또는 유세포 분석을 비롯한 다양한 기술에 의해 사용될 수 있다(Sela-Passwell 등 Nature Medicine. 18:143-147. 2012; LeBeau 등 Cancer Research. 75:1225-1235. 2015; Sun 등 Biochemistry. 42:892-900. 2003; Shiryaev 등 2:e80. 2013 참고.)

[0434] 상세한 설명을 통해, 조성물 및 키트가 특정 구성요소를 갖거나 비롯하거나 포함하는 것으로서 기술되거나, 공정 및 방법이 특정 단계를 갖거나 비롯하거나 포함하는 것으로서 기술되는 경우, 추가로 언급된 구성요소로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어지는 본 발명의 조성물 및 키트가 존재하며, 언급된 공정 및 방법 단계로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어지는 본 발명에 따른 공정 및 방법이 존재하는 것으로 고려된다.

[0435] **IV. 약학 조성물 및 제형**

[0436] 치료적 용도를 위해, 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체는 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 담체와 조합된다. 본원에 사용된 "약학적으로 허용가능한 담체"는 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증없이 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는, 인간 및 동물의 조직과의 접촉에 사용하기에 적합한 완충제, 담체 및 부형제를 의미한다. 담체(들)는 제형의 다른 성분과 상용성이고 수용자에게 해롭지 않다는 의미에서 "허용가능"해야 한다. 약학적으로 허용가능한 담체는 약학적 투여에 상용가능한 완충제, 용매, 분산매, 코팅제, 및 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약학적 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 당업계에 알려져 있다.

[0437] 따라서, 본 발명의 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체 조성물은 임의의 적합한 부형제, 예컨대, 비 제한적으로 희석제, 바인더, 안정화제, 완충제, 염, 친유성 용매, 보존제 또는 보조제 등 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 부형제가 바람직하다. 이러한 멸균 용액의 비-제한적인 예 및 이의 제조 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예컨대, Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co.(Easton, Pa.) 1990에 기술된 것에 제한되지 않는다. 당업계에 널리 알려져 있거나 본원에 기술된 항체 분자, 단편 또는 변이체 조성물의 투여 방식, 용해도 및/또는 안정성에 적합한 약학적으로 허용가능한 담체가 일상적으로 선택될 수 있다.

[0438] 본 조성물에 유용한 약학적 부형제 및 첨가제는 단백질, 펩티드, 아미노산, 지질 및 탄수화물(예컨대, 단당류, 디-, 트리-, 테트라-, 및 올리고당을 비롯한 당; 유도체화된 당, 예컨대, 알디톨, 알도산 및 에스테르화된 당 등; 및 다당류 또는 당 중합체)을 포함하나, 이에 제한되지 않으며, 이는 단독 또는 중량 또는 부피 기준 1-99.99%로 조합하는 것을 포함하여 단독으로 또는 조합하여 존재할 수 있다. 예시적인 단백질 부형제는 혈청 알부민, 예컨대, 인간 혈청 알부민(HSA), 재조합 인간 알부민(rHA), 젤라틴 및 카제인 등을 포함한다. 완충 용량으로 또한 기능할 수 있는 대표적인 아미노산/항체 분자 구성요소는 알라닌, 글리신, 아르기닌, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 리신, 류신, 이소류신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌 및 아스파탐 등을 포함한다.

[0439] 본 발명에 사용하기에 적합한 탄수화물 부형제는 예를 들어, 단당류, 예컨대, 과당, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스 및 소르보스 등; 이당류, 예컨대, 락토스, 수크로스, 트레할로스 및 셀로비오스 등; 다당류, 예컨대, 라피노스, 멜레지토스, 말토덱스트린, 텍스트란 및 전분 등; 및 알디톨, 예컨대, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 자일리톨 소르비톨(글루시톨) 및 마이오이노시톨 등을 포함한다. 본 발명에 사용하기에 바람직한 탄수화물 부형제는 만니톨, 트레할로스 및 라피노스이다.

[0440] 항체 분자 조성물은 또한 완충제 또는 pH 조절제를 포함하며; 전형적으로, 완충제는 유기산 또는 염기로부터 제조된 염이다. 대표적인 완충제는 유기산 염, 예컨대, 시트르산, 아세트산, 아스코르브산, 글루콘산, 카르본산, 타르타르산, 숙신산 또는 프탈산의 염; 트리스, 트로메타민 하이드로클로라이드 또는 포스페이트 완충제를 포함한다.

[0441] 또한, 본 발명의 항체 분자 조성물은 중합체 부형제/첨가제, 예컨대, 폴리비닐피롤리돈, 피콜(중합체성 설탕), 텍스트레이트(예컨대, 사이클로텍스트린, 예컨대, 2-하이드록시프로필-β-사이클로텍스트린), 폴리에틸렌 글리콜, 향미제, 향미생물제, 감미제, 산화방지제, 정전기 방지제, 계면활성제(예컨대, 폴리소르베이트, 예컨대 "트윈(TWEEN) 20" 및 "트윈 80"), 지질(예컨대, 인지질, 지방산), 스테로이드(예컨대, 콜레스테롤) 및 킬레이트제(예컨대, EDTA)를 포함할 수 있다.

[0442] 본 발명에 따른 항체 분자 조성물에 사용하기에 적합한 이들 및 추가의 알려진 약학 부형제 및/또는 첨가제는 당업계에 알려져 있으며, 예컨대, "Remington: The Science & Practice of Pharmacy," 19th ed., Williams & Williams, (1995), and in the "Physician's Desk Reference," 52nd ed., Medical Economics, Montvale,

N.J.(1998)에 열거된다. 바람직한 담체 또는 부형제 재료는 탄수화물(예컨대, 당류 및 알디톨) 및 완충제(예컨대, 시트레이트) 또는 중합체성 작용제이다.

[0443] 본 발명은 하나 이상의 항-CD47 항체 분자를 약학적으로 허용가능한 제형으로 포함하는 안정한 조성물을 제공한다. 보존된 제형은 하나 이상의 알려진 보존제를 함유하거나 하나 이상의 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알콜, 페닐머큐릭 니트라이드, 페녹시에탄올, 포름알데하이드, 클로로부탄올, 마그네슘 클로라이드(예컨대, 헥사하이드레이트), 알킬파라벤(메틸, 에틸, 프로필 및 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 소듐 데하이드로아세테이트 및 티메로살, 또는 수성 희석제 중 이들의 혼합물로부터 임의로 선택된다. 임의의 적합한 농도 또는 혼합은 당업계에 알려진 바와 같이, 예컨대, 0.001-5% 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값, 예컨대, 비제한적으로 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, 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값으로 사용될 수 있다. 비-제한적인 예는 보존제 없이, 0.1-2%(예컨대, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.9 또는 1.0%)의 m-크레졸, 0.1-3%(예컨대, 0.5, 0.9, 1.1, 1.5, 1.9, 2.0 또는 2.5%)의 벤질 알콜, 0.001-0.5%(예컨대, 0.005 또는 0.01%)의 티메로살, 0.001-2.0%(예컨대, 0.05, 0.25, 0.28, 0.5, 0.9 또는 1.0%)의 페놀 및 0.0005-1.0%(예컨대, 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 또는 1.0%)의 알킬파라벤(들) 등을 포함한다.

[0444] 본원에 개시된 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체를 함유하는 약학 조성물은 투여량 유닛 형태로 제공될 수 있으며 임의의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다. 약학 조성물은 의도된 투여 경로에 상용가능하도록 제형화되어야 한다. 투여 경로의 예는 정맥 내(IV), 피내, 흡입, 경피, 국소, 점막경유 및 직장 투여이다. 모노클로날 항체의 바람직한 투여 경로는 IV 주입이다. 유용한 제형은 약학 분야에 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 상기 Remington's Pharmaceutical Sciences(1990) 참고. 비경구 투여에 적합한 제형 구성요소는 멸균 희석제, 예컨대, 주사용 물, 식염수, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매; 항균제, 예컨대, 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 산화방지제, 예컨대, 아스코르브산 또는 소듐 바이설파이트; 킬레이트제, 예컨대, EDTA; 완충제, 예컨대, 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트; 및 등장성 조절을 위한 작용제, 예컨대, 소듐 클로라이드 또는 텍스트로스를 포함한다.

[0445] 정맥 내 투여의 경우, 적합한 담체는 생리 식염수, 정균수, 크레모퍼(cremophor) EL™(BASF, Parsippany, N.J.) 또는 포스페이트 완충 식염수(PBS)를 포함한다. 담체는 제조 및 보관 조건 하에서 안정적이어야 하며 미생물에 대항하여 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산매일 수 있다.

[0446] 약학 제형은 바람직하게는 멸균성이다. 멸균은 임의의 적합한 방법, 예컨대, 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 달성될 수 있다. 조성물이 동결건조되는 경우, 필터 멸균은 동결건조 및 재구성 이전 또는 이후에 수행될 수 있다.

[0447] 본 발명의 조성물은 다양한 형태일 수 있다. 이들은 예를 들어, 액체, 반-고체 및 고체 투여량 형태, 예컨대, 액체 용액(예컨대, 주사가능한 및 불용해성 용액), 분산제 또는 현탁제, 리포솜을 포함한다. 바람직한 형태는 의도된 투여 방식 및 치료적 적용에 의존한다. 전형적인 바람직한 조성물은 주사가능한 또는 불용해성 용액의 형태이다. 바람직한 투여 방식은 비경구(예컨대, 정맥 내, 피하, 안구 내, 복강 내, 근육 내)이다. 바람직한 실시양태에서, 제제는 정맥 내 주입 또는 주사에 의해 투여된다. 다른 바람직한 실시양태에서, 제제는 근육 내 또는 피하 주사에 의해 투여된다.

[0448] 본원에 사용된 구문 "비경구 투여" 및 "비경구적으로 투여된"은 일반적으로 주사에 의한 경장(enteral) 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하며, 비제한적으로 정맥 내, 근육 내, 피하, 동맥 내, 척수강 내, 낭 내 (intracapsular), 안와 내, 유리체 내, 심장 내, 피내, 복강 내, 기관 경유, 흡입, 피하, 표피하, 관절 내, 피막하, 지주막하, 척수 내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.

[0449] 본 발명은 포장 재료 및 임의로 수성 희석제 중 규정된 완충제 및/또는 보존제와 함께 하나 이상의 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체의 용액을 포함하는 하나 이상의 바이알을 포함하는 키트를 제공한다. 수성 희석제는 임의로 약학적으로 허용가능한 보존제를 추가로 포함한다. 보존제는 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알콜, 알킬파라벤(메틸, 에틸, 프로필 및 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 소듐 데하이드로아세테이트 및 티메로살, 또는 이의 혼합물로부터 선택된 것을 포함한다. 제형에 사용된

보존제의 농도는 항-미생물 효과를 수득하기에 충분한 농도이다. 이러한 농도는 선택된 보존제에 의존하고 당업자에 의해 용이하게 결정된다.

[0450] 다른 부형제, 예컨대, 등장화제, 완충제, 산화방지제, 보존제 증강제는 임의로 그리고 바람직하게는 희석제에 첨가될 수 있다. 등장화제, 예컨대, 글리세린은 일반적으로 알려진 농도로 사용된다. 개선된 pH 제어를 제공하기 위해 생리학적으로 용인되는 완충제가 바람직하게 첨가된다. 제형은 광범위한 pH 범위, 예컨대, 약 pH 4.0 내지 약 pH 10.0, 약 pH 5.0 내지 약 pH 9.0, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 8.0을 커버(cover)할 수 있다.

[0451] 다른 첨가제, 예컨대, 트윈 20(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우레이트), 트윈 40(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노팔미테이트), 트윈 80(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노올레에이트), 플루로닉(Pluronic) F68(폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 블록 공중합체), 및 PEG(폴리에틸렌 글리콜) 또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대, 폴리소르베이트 20 또는 80 또는 폴록사머 184 또는 188, 플루로닉® 폴리일, 다른 블록 공-중합체, 및 길레이터, 예컨대, EDTA 및 EGTA는 응집을 감소시키기 위해 제형 또는 조성물에 임의로 첨가될 수 있다. 이들 첨가제는, 제형을 투여하기 위해 펌프 또는 플라스틱 용기를 사용하는 경우 특히 유용하다. 약학적으로 허용가능한 계면활성제의 존재는 단백질이 응집하는 경향을 완화시킨다.

[0452] 다양한 전달 시스템이 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체를 대상체에 투여하기 위해 사용될 수 있다. 특정 예시적인 실시양태에서, 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체의 투여는 정맥 내 주입에 의한 것이다. 일부 실시양태에서, 투여는 2 시간의 정맥 내 주입에 의한 것이다.

[0453] 상기 기술된 임의의 제형은 액체 또는 냉동 형태로 저장될 수 있고 임의로 보존 공정을 거칠 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 기술된 제형은 동결건조된다, 즉, 이들은 동결건조화가 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 기술된 제형은 보존 공정, 예를 들어, 동결건조화를 거치고, 이어서 적합한 액체, 예를 들어, 물로 재구성된다. 동결건조된 것은, 조성물이 진공 하에서 동결-건조된 것을 의미한다. 동결건조화는 전형적으로 용질이 용매(들)로부터 분리되도록 특정 제형을 동결시킴으로써 달성된다. 이어서, 용매는 승화(즉, 일차 건조) 및 이어서 탈착(즉, 이차 건조)에 의해 제거된다.

[0454] 본 발명의 제형은 본원에 기술된 방법 또는 질환을 치료하기 위한 다른 방법과 함께 사용될 수 있다. 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체 제형은 대상체에 투여하기 전에 추가로 희석될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제형은 식염수로 희석되고 대상체에 투여하기 전에 IV 백(bag) 또는 주사기에 수용될 것이다. 따라서, 일부 실시양태에서, 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법은 항-CD47 항체 또는 마스킹된 항체를 포함하는 약학 조성물의 주당 용량을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함할 것이다.

[0455] 본원에 기술된 방법의 다른 적합한 변형 및 각색이 본원에 개시된 실시양태의 범주의 벗어남없이 적합한 등가물을 사용하여 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게 용이하게 명백할 것이다. 이제 특정 실시양태를 상세하게 기술하였지만, 다음의 실시예를 참고하여 더욱 명확하게 이해될 것이며, 이는 단지 예시의 목적으로 포함되며 제한하려는 의도가 아니다. 본원에 기술된 모든 특허, 특허 출원 및 참고 문헌은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 인용된다.

[0456] **실시예**

[0457] **실시예 1: 항체 생성**

[0458] 뮤린 B6H12 항-CD47 항체의 인간화 변이체를 생성하였다. DNA & 벡터 생성을 위해, 비-주형(template) PCR을 사용하여 항체 가변 도메인 서열을 합성하였다. 요컨대, 가상 유전자 서열은 ATUM의 독점 소프트웨어 스위트를 사용하여 올리고뉴클레오티드 서열로 변환된다. 올리고뉴클레오티드를 PCR을 사용하여 합성, 풀링(pooled) 및 증폭하였다. PCR 반응으로부터의 전장 앰플리콘을 SapI 부위를 사용하여 벡터 내로 클로닝하고, 대장균 내로 형질전환시키고 특유의 콜로니를 단리시킨다. 콜로니를 액체 배지에서 하룻밤 동안 성장시키고 플라스미드 DNA를 단리하고 정제하고(Machery-Nagel Midi Prep Kit) Sanger 시퀀싱을 사용하여 서열을 확인하였다. 경쇄 가변 도메인은 Kappa-Hs 벡터 내로 클로닝되고 중쇄 도메인은 IgG1.01-Fc-Hs 벡터 내로 클로닝된다. 항체 발현을 위해, 1:1 비의 항체 중쇄 및 경쇄 벡터를 PolyPlus FectoPro 형질주입 시약을 포함하는 LifeTech Optimem 배지로 희석하였다. 이어서, DNA/형질주입 시약을 LifeTech ExpiExpression 배지 중의 Atum-특이적 HEK293 세포에 첨가하고 5 일 동안 배양하였다. 배양물을 원심 분리 및 0.2 um 여과에 의해 수확하였다. 항체 정제를 위해 GE mAb select sure가 IgG의 정제에 사용된다. 용리 전에, 수지를 PBS 중의 10CV 1M NaCl 및 10CV의 PBS로 세척하였다. IgG를 20 mM NaCitate pH3.2 완충액을 사용하여 용리시켰다. 샘플은 Pierce Zeba 컬럼을 사용하여 PBS로 버퍼 교환된다. 이어서, 샘플을 특성화를 위해 채취하기 전에 필터 멸균하였다. 특성화는 A280 농도

및 p200 테이프스크린이 있는 Agilent P200 테이프 스테이션 2200을 사용한 환원 및 비-환원된 전기영동을 포함한다.

[0459] 모 B6H12 항체의 특이적 돌연변이는 하기 제시된 표 10-13에 기술된다.

[0460] 표 10. hB6H12 중쇄 변이체에서의 인간화 돌연변이

vH 변이체	IGHV 엑손 수용기 서열	뮤린 공여체 프레임워크 잔기	인간 수용기 CDR 잔기
hvH1	IGHV3-23/HJ4	H44, H49, H89, H91, H94	없음
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

[0461]

[0462] 표 11. hB6H12 카파 경쇄 변이체에서의 인간화 돌연변이

vK 변이체	IGKV 엑손 수용기 서열	뮤린 공여체 프레임워크 잔기	인간 수용기 CDR 잔기
hvK1	IGKV6-21/KJ2	L4, L21, L85	없음
hvK2	IGKV6-21/KJ2	L4, L21	없음
hvK3	IGKV6-21 /KJ2	L4, L21, L69	없음
hvK4	IGKV1-27 /KJ2	L21, L49, L69	L31, L34, L53, L54, L55

[0463]

[0464] 표 12. hB6H12 중쇄 변이체에서의 특정 뮤린 프레임워크 돌연변이

변이체	29	44	49	82	89	91	94	% 인간
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

[0465]

[0466] \* 뮤린 잔기

[0467] 표 13. hB6H12 카파 경쇄 변이체의 특정 뮤린 프레임워크 돌연변이

변이체	4	21	49	69	85	% 인간
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

[0468]

[0469] \* 뮤린 잔기

[0470] 실시예 2: 인간화 항-CD47 항체

- [0471] 항체 생성
- [0472] 항체를 Expi HEK 또는 Expi CHO 세포의 일시적 형질주입 또는 CHO-DG44의 안정한 형질주입을 통해 발현시키고 MabSelect SuRe 컬럼(GE Healthcare)을 사용하여 정제하였다. 90% 미만의 단량체인 마스킹된 항체에 대해 Superdex 컬럼(GE Healthcare)을 사용한 추가의 제조용 크기-배제 크로마토그래피 정제를 수행하였다.
- [0473] 유세포 분석 및 ELISA에 의한 포화 결합
- [0474] 다양한 중쇄 및 경쇄 서열을 갖는 인간화 항-CD47 B6H12 항체를 포화 ELISA 또는 세포 FACS 분석에 의해 인간 CD47에 대한 이들의 결합 친화도에 대해 평가하고 EC50 또는 Kd를 계산하였다. 중쇄 1 서열(hvH1)(bin A; 항체 1-4) 또는 중쇄 5 서열(hvH5)(bin B, 항체 17-20)로 구성된 항체 만이 CD47에 결합할 수 있었다. 이들 빈으로부터의 항체는 무린 항체 mB6H12 및 대안적으로 인간화 항체 Ab47과 유사한 Kd(도 2a) 및 EC<sub>50</sub>(도 2b) 친화도로 결합하였다.
- [0475] 세포 FACS 분석을 위해, L450cy 암 림프종 세포를 인간화 B6H12 항체의 증가하는 농도로 처리하였고, 이는 CD47에 대한 결합 및 결정된 Kd 값을 유지하는 것으로 밝혀졌다. 대안적인 인간화 프레임워크는 무린 모 및 대안적으로 인간화 항체 Ab47과 유사한 결합 Kd를 유지하였다(도 2a).
- [0476] CD47에 대한 인간화 B6H12 항체의 친화도의 세포 결합 평가 이외에, 엘리사(Elisa)에 의해 결정되었다. 인간 CD47로 코팅된 플레이트를 인간화 B6H12 항체의 증가하는 농도로 처리하였으며, 이는 CD47에 대한 결합 및 결정된 EC<sub>50</sub> 값을 유지하는 것으로 밝혀졌다. 대안적인 인간화 프레임워크 무린 모 및 대안적으로 인간화 항체 Ab47과 유사한 결합 Kd를 유지하였다(도 2b).
- [0477] ELISA 검정에서 결합 EC50을 평가하는 것 외에, 결합 동역학을 또한 평가하였다. 예상치 못하게, Bin A의 항체(hB6H12.3 및 hB6H12.4)는 모 항체, mB6H12, Bin B의 항체(hB6h12.19 및 hB6H12.20) 또는 대안적인 인간화 항체, Ab47보다 유의하게 높은 최대 결합(BMax)을 나타냈다(도 2c).
- [0478] 유세포 분석에 의한 포화 결합
- [0479]  $2 \times 10^5$  개의 지시된 세포(SW780 또는 인간 적혈구)를 염색 완충제(PBS, 5% FBS, 0.2% NaN<sub>3</sub>)에서 지시된 항체의 연속 희석으로 조합하였다. 샘플을 얼음 상에서 1 시간 동안 항온처리하고 빙-냉(ice-cold) 염색 완충제로 2 회 세척하였다. 세포를 얼음 상에서 1 시간 동안 항-인간 IgG-AF647(JacksonImmunoResearch, 염색 완충제 중의 1 : 200 희석)로 재현탁하였다. 세포를 빙냉 염색 완충제로 2 회 세척하고 염색 완충제에 재현탁하였다. 표지된 세포를 생존불능 세포를 배제하기 위해 게이트된 Invitrogen Attune NxT 유세포 분석기에서 유세포 분석에 의해 검사하고 FlowJo 10 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. K<sub>d</sub>를 비-선형 회귀를 사용하여 GraphPad Prism 6을 사용하여 계산하였다.
- [0480] ELISA에 의한 포화 결합
- [0481] 가용성 재조합 인간 CD47-Fc(R&D Systems)를 50 mM 카보네이트 완충제, pH 9.6에 적절한 농도로 희석하였다. 96-웰 Maxisorb ELISA 플레이트의 각 웰에 100  $\mu$ L의 가용성 항원을 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고 4  $^{\circ}$ C에서 밤새 보관하였다. 이어서, 플레이트를 PBS-T가 완충된 상태(PBS, pH 7.4 + 0.05% 트윈-20)로 3-5 회 세척하였다. 웰을 실온에서 1 시간 동안 BSA를 함유하는 PBS-T 완충제의 300  $\mu$ L/웰을 사용하여 차단한 후, PBS-T로 3-5 회 세척하였다. 항체의 희석액을 차단 완충제에서 제조하고 100  $\mu$ L의 부피로 각 웰에 첨가하였다. 항체를 실온에서 1 시간 동안 항온처리한 후, PBS-T로 3-5 회 세척하였다. 이어서, HRP-접합된 이차 항체(항-인간 Fc 또는 항-인간 카파 경쇄)를 첨가하고 실온에서 1 시간 동안 항온처리하였다. 플레이트를 PBS-T로 3-5 회 세척하였다. ELISA는 100  $\mu$ L의 TMB 용액을 첨가하고 실온에서 3-15 분 동안 배양함으로써 전개하였다. 반응을 중지시키기 위해, 100  $\mu$ L의 1N 황산을 각 웰에 첨가하였다. 450 nm에서의 흡광도는 Spectramax 190 플레이트 판독기(Molecular Biosciences)를 사용하여 측정하였고 GraphPad Prism 6을 사용하여 데이터를 플롯팅하였다.
- [0482] B6H12-매개 식세포작용
- [0483] 인간 적혈구의 인간 식세포작용 및 혈구응집반응을 비롯한 인간화 B6H12 항체의 기능적 특성화를 수행하였다. 형광 적색 PKH 염료로 표지된 인간 적혈구는 빈 A 및 B로부터의 인간화 B6H12 항체의 농도를 증가시키면서 30 분 동안 흡소닌화하였다. RBC를 세척하고 2 시간 동안 단핵구 대식세포에 대해 10:1 비로 공급하였다. 샘플을 비-섭취(non-ingested) 적혈구의 용해 및 제거를 가능하게 하는 ACK 저장성 용해 완충제로 3 회 세척하였다. 샘플

플은 유세포 분석을 실시하고 식세포작용을 평가하였다. 빈 A 및 B로부터의 항체는 인간 적혈구 식세포작용을 매개하는 유사한 능력을 나타냈다. 놀랍게도, 빈 A로부터의 항체 hB6H12.3은 뮤린 모 항체보다 더 나은 식세포 작용을 매개하고, 대안적인 인간화 항체 Ab47과 동등한 수준이었다.

[0484] 항체 빈 A 및 B로부터의 인간화 B6H12 항체는 유사하게 CD47 양성 인간 적혈구의 식세포작용을 매개한다. hB6H12.3은 뮤린 mB6H12와 비교하여 1  $\mu\text{g/ml}$ 에서 우수한 식세포성-촉진 활성 및 Ab47과 비교하여 유사한 식세포성-촉진 활성을 일으켰다(도 3a 및 도 3b).

[0485] B6H12-매개 혈구응집반응

[0486] B6H12의 홀마크 특징은 인간 적혈구의 혈구응집반응을 촉진하는 능력이다. 혈구응집반응은 CD47 항체로 처리하는 경우 2 개의 CD47 발현 세포가 응집되거나 군집되도록 하는 동형(homotypic) 상호작용의 예이다. 교착 격자(agglutinated lattice)는 RBC를 부유 분포로 유지하는데, 이는 이미지 분석 또는 유세포 분석에 의해 모니터링된 응집 수준에 의해 시각적으로 정량화될 수 있다. PBS에 현탁되고 둥근 바닥 96 웰 플레이트에 도달된 인간 적혈구를 증가하는 농도의 항-CD47 항체에 노출시켰다. 37 °C에서 30 분 후, 혈구응집반응은 세포 응집의 증가에 따른 RBC 밀도의 변화 및 유세포 분석에 의해 광학적으로 모니터링하였다. 빈 A 내의 항체, 특히 hB6H12.3은 모 항체 mB6H12 및 대안적으로 인간화 항체 Ab47과 비교하여 혈구응집반응의 감소를 나타냈다(도 4a).

[0487] 혈구응집반응을 평가하기 위해, 표준 이미지 캡처를 수행하고 분산된 비-침강 RBC의 형성을 평가하였다. 또한, GE In Cell 분석기를 사용하여 플레이트를 스캔하고 웰 내의 겉보기 스팟의 직경을 평가하였다. 임상 모니터링을 처리할 수 있는 검정에서 혈구응집반응을 평가하기 위한 노력에서, 유세포 분석을 사용하였고, 응집을 모니터링하는 방법인 명백한 RBC SSC/FSC의 전반적인 증가로서 혈구응집반응을 평가하였다. 이 방법은 인간화 항-CD47 항체 hB6H12.3 및 Ab47에 의해 유도된 혈구응집반응을 평가하기 위해 사용하였다(도 4a 및 도 4b).

[0488] Fc $\gamma$  수용체의 B6H12-매개 활성화

[0489] 생체 내에서, 단핵구, 대식세포, 호중구 및 수지상 세포는 Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RI 및 Fc $\gamma$ RIIIa를 통해 ADCP를 매개할 수 있다. 3개의 수용체 모두 ADCP에 참여할 수 있지만, Fc $\gamma$ RIIa는 이 과정에 관여하는 주요한 Fc $\gamma$  수용체인 것으로 여겨진다. 인간 Fc $\gamma$ RI 또는 NFAT-루시페라제 리포터 작제물에 연결된 고 친화도 Fc $\gamma$ RIIa-H로 안정적으로 형질주입된 Jurkat 세포를 마우스 B6H12, Ab47 또는 hB6H12.3의 증가하는 농도로 코팅된 WIL2S 세포에 노출시켰다. Fc $\gamma$ R 활성화는 루시페라제 생산에 의해 모니터링되었다. 결과는 도 5a 및 5b에 도시된다. Ab47 및 hB6H12.3 코팅된 세포 둘 다는 Fc $\gamma$ RI 수용체를 용량 의존적으로 활성화시켰지만, hB6H12.3 만이 ADCP 활성을 직접 매개하는 것과 가장 밀접하게 연결된 수용체인 Fc $\gamma$ RIIa-H의 활성화를 유도할 수 있었다.

[0490] 항체 매개 세포 식세포작용에 관여하는 Fc $\gamma$  수용체의 항체 매개 활성화를 Fc $\gamma$ RI 또는 Fc $\gamma$ RIIa-H를 안정적으로 발현하는 조작된 Jurkat 세포(고-친화도 H131 변이체) 및 효과기 세포로서 반딧불이 루시페라제의 발현을 유도하는 NFAT 반응 요소를 사용하여 평가하였다. 항체 생물학적 활성은 NFAT 경로 활성화의 결과로서 생성된 루시페라제를 통해 정량화하고; 효과기 세포에서 루시페라제 활성은 발광 관독으로 정량화한다(도 5a 및 도 5b).

[0491] NK 세포-매개 ADCC 활성

[0492] NK 세포 매개 항체 의존성 세포성 세포독성(ADCC) 및 mB6H12, Ab47 및 hB6H12.3에 의한 Fc $\gamma$ RIIIa의 활성화를 시험하였다. 증가하는 농도의 항체로 코팅된 크롬 로딩된 Wils-2 세포를 일차 인간 자연 살해(NK) 세포에 4 시간 동안 노출시키고, 조직 배양 배지 내로의 방사성 크롬의 방출에 의해 특이적 용해를 평가하였다. 대안적으로, 증가하는 농도의 mB6H12, Ab47 또는 hB6H12.3으로 코팅된 Wils-2 세포를 Fc $\gamma$ RIIIa의 고 친화도 V/V 변이체를 안정적으로 발현하는 Jurkat 세포에 노출시키고 수용체 활성화를 NFAT 유도된 루시페라제 활성으로서 평가하였다. hB6H12.3은 Ab47 또는 뮤린 B6H12 모 항체 둘 다와 비교하여 우수한 ADCC 및 Fc $\gamma$ RIIIa 활성화를 나타냈다. 결과는 도 6a 및 6b에 도시된다. hB6H12.3의 IgG1 백본은 ADCC 활성을 매개하고, 현재 IgG4 임상 항체에는 없는 기능인 Fc $\gamma$ RIII 시그널링을 유도한다.

[0493] ADCC 검정을 수행하기 위해, Astarte Biologics로부터 음성으로 선택된 정제된 인간 NK 세포를 해동하고 (70  $\mu\text{L}$ 가 대략  $5 \times 10^4$  개의 효과기 세포를 함유하도록)  $7.2 \times 10^5$  개의 CD16+세포/ML의 농도로 RPMI/1% FBS에 재-현탁시켰다.  $5 \times 10^6$  개의 표적 세포(WIL2S 세포)를 수집하고 원심 분리하고 100  $\mu\text{L}$ 의 FBS에 재현탁시켰다. 100  $\mu\text{L}$ (대략 100  $\mu\text{Ci}$ )의 Cr-51을 세포에 첨가하고 부드럽게 혼합하였다. 세포를 37 °C CO<sub>2</sub>-가습 항온처리에 넣어 1 시간 동안 표지하였다. 세포를 현탁된 상태로 유지하기 위해 때때로 가볍게 두드렸다. 세포를 적절한 폐기물 용기에 방사성 상층액을 폐기하는 데 주의하면서 RPMI/1% FBS로 3 회 세척하였다. 이어서 세포를 10 mL RPMI/1% FBS

에 재현탁시키고 계수하였다.  $7.2 \times 10^5$  개의 세포를 제거하고  $70 \mu\text{L}$ 가 대략  $5 \times 10^3$  개의 표적혈구와 동등하도록 총 부피  $10 \text{ mL}$ 의 검정 배지에 현탁시켰다.

[0494] 항체 희석 및 플레이트 조립을 위해, 항체를 검정 배지에서 희석시켰다( $\text{prep @ } 3\text{X}$ ). Cr-표지된 표적혈구의 첨가 직전에 항체를 플레이트에 첨가하였다. 웰을 제어하기 위해, 항체 대신에  $70 \mu\text{L}$  및  $140 \mu\text{L}$ 의 검정 배지를 첨가하였다. 이들 웰은 각각 총 및 자발적 방출 제어율 나타낸다. 표적혈구를 혼합하고,  $70 \mu\text{L}$ 를 96-웰 플레이트의 각각의 테스트 및 대조군 웰에 첨가하였다. 항체를 갖는 표적을 30 분 동안  $37^\circ\text{C}$  항온처리기에서 항온처리하였다.  $70 \mu\text{L}(5 \times 10^4 \text{ 개})$ 의 효과기 세포를 각각의 테스트 웰에 첨가하였다. 총 방출 웰에  $70 \mu\text{L}$ 의 3% 트리톤 X-100을 첨가하고 상하로 3 회 피펫팅하여 혼합하였다. 플레이트를 4 시간 동안  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$ -가습 항온처리기에서 돌려졌다.

[0495] 종합하면, 데이터는 본 발명의 신규한 인간화 항-CD47 항체가 무린 모 항체보다 우수하고 예상치 못한 특성을 갖는다는 것을 입증한다. 인간화 항-CD47 항체는 RBC 식세포작용(도 3b) 및  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$  시그널링(도 5b)에 의해 입증된 바와 같이 우수한 식세포성/ADCP 능력을 나타낸다. 인간화 항-CD47 항체는 NK 세포-매개 세포 용해(도 6a) 및  $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$  시그널링(도 6b)에 의해 입증된 바와 같이 우수한 세포 용해/ADCC를 나타낸다. 인간화 항-CD47 항체는 우수한  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$  시그널링을 나타낸다(도 5a). 최종적으로, 인간화 항-CD47 항체는 또한 감소된 혈구응집반응에 의해 입증된 바와 같이, 혈구응집반응 검정에서 입증된 바와 같이, 우수한 독성 프로파일을 나타낸다(도 4a 및 도 4b). 인간화 항-CD47 항체인 hB6H12.3은 특히 효과적인 것으로 밝혀졌다.

[0496] 항-CD47 항체의 억제자 기능

[0497] 식세포성 활성을 차단하는 것 외에도, CD47과 SIRP  $\alpha$ 의 상호작용은 또한 SHP1의 활성화 및 Vav와 같은 다운스트림 신호의 비활성화를 통해 염증성 사이토카인 생성을 감소시킨다. 인간 단핵구를 LPS로 처리하여 모 및 다양한 인간화 항-CD47 항체의 부재 하에 사이토카인 생성을 유도하였다. 모든 CD47 표적 항체로의 처리는 LPS 유도 사이토카인을 유의하게 향상시킬 수 있었다. 더 나은 사이토카인 생성 및 선천적혈구 활성화의 하나의 결과는 이차 T 세포 반응을 유도하는 능력이다. 종양 연관 대식세포는 이차 T 세포 활성화를 지지할 수 없고 적극적으로 억제할 수 있는 억제 표현형을 나타내는 것으로 알려져 있다. 인간 단핵성 세포를 면역 억제성 TAM-유사 표현형 쪽으로 유도하기 위해, 분화시키고 IL10 및 MSCF로 분극시켰다. 이들 분화된 단핵구는 자가 T 세포의 CD3/CD28 유도된 증식을 억제할 수 있다. 이 패러다임에서 항-CD47 처리의 추가는 TAM을 활성화시키고 이를 더 MO/M1 표현형(CD86/ MHCII 증가) 쪽으로 이동시킬 수 있었다. 예컨대, 도 7a 7b 및 7c 참고. TAM-유사 표현형에서의 이러한 변화는 CD3/CD28 매개된 T 세포 증식 및 활성화를 지지하는 능력과 관련이 있다. 예컨대, 도 7d 참고.

[0498] IL-10을 갖는 대식세포와 같이 종양으로 분화된 인간 단핵구를 이용한 억제자 검정을 자가 T 세포와 공동-배양하고 T 세포 수용체 매개 활성화를 지지하는 능력을 평가하였다. CD47은 배양물에 첨가되었고, CD86 및 MHCII의 상향 조절에 의해 측정된 바와 같이 대식세포의 활성화 마커의 상향 조절을 야기하는 것으로 밝혀졌다. 또한, TCR 매개 T 세포 활성화를 지지하는 T 세포에서 MHCII의 상향 조절 및  $\text{IFN}\gamma$ 의 분비에 의해 평가하였다(도 7a-도 7d).

[0499] 다른 항-CD47 항체와 비교

[0500] hB6H12.3을 다른 알려진 CD47 항체인 5F9 및 CC-9002와 비교하였다(WO2011/143624 참고). 비교에서,  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$  및  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$  활성화는 상기 기술된 바와 동일한 NFAT-루시퍼라제 Jurkat 세포 검정에서 측정하였다. hB6H12.3은 5F9 및 CC-9002 IgG4 항체에 비해  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$  및  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ 를 활성화시키는 우수한 능력을 나타냈다(도 8a 및 도 8b).

[0501] 또한, NK-매개 ADCC 및  $\text{IFN}\gamma$  분비는 상기 기술된 바와 같이 측정하였다. 다시 한번, hB6H12.3은 5F9 및 CC-9002에 비해 ADCC를 매개하고  $\text{IFN}\gamma$  분비를 자극하는 데 우수한 능력을 나타냈다(도 8c 및 도 8d).

[0502] **실시예 3: 마스크를 갖는 인간화 항-CD47 항체**

[0503] 결합 및 기능 연구를 위해 제조된 인간 MMP를 사용한 마스크된 항체의 절단

[0504] 제조된 MMP는 1-2 시간 동안  $37^\circ\text{C}$ 에서  $1.25 \text{ mM}$ 의 4-아미노페닐 머큐릭 아세테이트(APMA)와 함께 항온처리를 통해 모두 활성화되었다. 전형적으로,  $1-2 \mu\text{g}$ 의 활성화된 rhMMP2를  $0.25-0.5 \text{ mg}$ 의 마스크된 항체에 첨가하고  $37^\circ\text{C}$ 에서 4-16 시간 동안 항온처리하였다. 항체 절단 정도는 PLRP-MS  $3 \mu\text{m}$  컬럼이 장착된 Waters Acquity/Xevo UPLC(Agilent)를 사용한 감소된 항체 역상 LC-MS에 의해 평가하였다. UNIFI 소프트웨어(Waters)를 사용하여 데이터를 분석하였다. MMP에 의한 재활성화는 의도된 절단 부위에서 마스크의 부위-특이적 절단을 초래한다. 마스크

킹된 항체의 완전 재활성화 시, 절단된 생성물을 결합 검정에 사용하기 전에 MabSelect SuRe 단백질 A 수지를 사용하여 정제하였다.

- [0505] MMP2 재-활성화된 마스킹된 항체에 대한 질량 분석 데이터를 생성하였다. 재조합 인간 MMP2를 이용한 절단 전 (도 9a) 및 후(도 9b)에 Ve1-IPV-hB6H12.3에 대한 디콘블루션된 경쇄 질량. 온전한 경쇄에 대한 예상 m/z는 28681(관측치: 28680.8)이다. MMP2-절단 항체(LRSG-hB6H12.3)에 대한 예상 m/z는 23969(관측치: 23968.4)이다.
- [0506] 단백질분해 후 남아있는 N-말단에서 "스터브" 서열을 갖는 항-CD47 항체를 또한 Expi-HEK 또는 Expi-CHO 세포에서 일시적 발현을 통해 생성하였다. 예를 들어, IPVS-LRSG MMP 절단 서열을 사용하는 마스킹된 항체의 경우, LRSG 서열은 MMP 활성화 후에 유지된다.
- [0507] MMP-기반 절단 서열의 프로테아제 특이성 평가
- [0508] MMP는 1 시간 내지 최대 24 시간 동안 37 °C에서 1.25 mM의 4-아미노페닐 머큐릭 아세테이트(APMA)와 함께 항온처리를 통해 활성화시켰다. 레구마인을 50 mM 소듐 아세테이트, 100 mM NaCl, pH 4.0에서 37 °C에서 2 시간 항온처리를 통해 활성화시켰다.
- [0509] 절단 서열의 절단 프로파일을 평가하기 위해, 제조자 보고 값에 의해 나타난 바와 같이 항체(10 µg)를 400 pmol/분 정규화된 프로테아제와 함께 37 °C에서 밤새 항온처리하였다. 항체 절단 정도는 PLRP-MS 3 µm 컬럼이 장착된 Waters Acquity/Xevo UPLC(Agilent)를 사용한 감소된 항체 역상 LC-MS에 의해 평가하였다. UNIFI 소프트웨어(Waters)를 사용하여 데이터를 분석하였다.
- [0510] 2 개의 프로테아제 절단 부위(IPV 및 M2)의 프로테아제 절단 프로파일을 종양-연관 프로테아제, 예컨대, 인간 및 무린/랫트 MMP, ADAM 패밀리, uPA, 매트립타제 및 레구마인의 패널에 대해 테스트하였다. 또한, 세포의 프로테아제 tPA 및 인자 Xa에 의한 서열의 절단을 또한 테스트하였다. 이들 3 개의 프로테아제 절단 부위에서의 프로테아제 절단 프로파일은 표 14에 제시된다.
- [0511] (hBU12 항체 백본에 N-말단 융합된) 펩티드를 400 pmol/min 정규화된 프로테아제와 함께 37 °C에서 밤새 항온처리하고 절단에 대해 평가하였다. M2 부위는 대부분의 MMP 및 uPA 및 매트립타제에 의해 절단되었다. IPV 부위는 MMP13을 제외한 거의 모든 MMP에 의해 절단되었고 다른 프로테아제 클래스에 의해 바뀌지 않았다.

[0512] 표 14. 2 개의 상이한 프로테아제 절단 부위에서의 프로테아제 절단 프로파일.

효소	절단 서열:	
	M2	IPV
	GPLG*VR**	IPVS*LR**SG
인간 MMP2	완전	완전
인간 MMP7	완전	완전
인간 MMP9	완전	완전
인간 MMP13	완전	최소
뮤린 MMP2	완전	부분적
뮤린 MMP7	부분적	완전
랫트 MMP9	부분적	완전
uPA	부분적	없음
매트립타제	완전	최소
레구마인	없음	최소
tPA	--	없음
인자 Xa	최소	없음
ADAMs (hu, mu)	없음	없음

[0513]

[0514] MMP-절단 부위는 \*로 표시되고 uPA/매트립타제/레구마인 절단 부위는 \*\*로 표시된다. 어느 부위에서든 절단은 항체 결합을 복구하기에 충분하다

[0515] 마스킹된 항-CD47 항체의 포화 결합

[0516] SW780 인간 방광암 세포에 대한 항-CD47 항체의 포화 결합을 수행하였다. Ve1-IPV 마스킹된 hB6H12 항체를 MMP2 사전-활성화 비교자와 함께 테스트하였다. 절단된 Ve1-IPV-항체는 항체 N-말단에서 램넨트-LRSG 서열을 보유하고 있다(도 10 및 표 15).

[0517] 표 15. 포화 결합에 의해 수득된 SW780 세포에 대한 결합 친화도(Kd)의 측정(도 10).

항체	Kd (nM)
절단된 Vel-IPV-hB6H12.3	11.4
절단된 Vel-IPV-hB6H12.4	9.2
절단된 Vel-IPV-hB6H12.19	26.6
절단된 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

[0518]

[0519] Vel-IPV-마스킹된 hB6H12 항체를 MMP2 사전-활성화된 비교자와 함께 테스트하였다. 절단된 Vel-IPV- 및 스테르브-IPV 항체는 항체 N-말단에서 램넨트-LRSG 서열을 보유하였다. 스테르브-IPV 항체는 재조합적으로 생성되는 반면, 절단된 항체는 MMP2를 이용한 절단을 통해 생성되었다(도 11 및 표 16). 본원에 사용된 "스테르브", "스테르브 항체" 또는 "스테르브 항원-결합 단편"은 MMP에 의해 절단 후의 항체 또는 항체-결합 단편 또는 재조합적으로 생성된, 즉, 코일형 코일 도메인 없이 생성되어서 절단이 수행되지 않는 항체 또는 항원-결합 단편을 지칭한다. MMP 절단은 짧은 아미노산 서열 램넨트를 초래한다. IPV 절단 부위, 램넨트 또는 스테르브의 경우 서열은 LRSG 또는 SG이어야 한다. M2 절단 부위, 램넨트 또는 스테르브의 경우 서열은 VR이어야 한다.

[0520] 표 16. 포화 결합에 의해 수득된 SW780 세포에 대한 결합 친화도(Kd)의 측정(도 11).

항체	Kd (nM)
hB6H12.3	19.2
Ab47	8.0
Vel-IPV-hB6H12.3	> 2000
스테르브 IPV-hB6H12.3	18.1
절단된 Vel-IPV-hB6H12.3	14.2

[0521]

[0522] 인간 적혈구에 대한 항-CD47 항체의 포화 결합을 수행하였다. Vel-IPV-마스킹된 hB6H12 항체를 재-활성화된 비교자(스테르브 IPV-hB6H12.3 또는 MMP2-절단 된 Vel-IPV-hB6H12.3)와 함께 테스트하였다. 절단된 Vel-IPV- 및 스테르브-IPV 항체는 항체 N-말단에서 램넨트-LRSG 서열을 보유하였다. 스테르브-IPV 항체는 재조합적으로 생성된 반면, 절단된 항체는 MMP2을 이용한 절단을 통해 생성되었다(도 12 및 표 17).

[0523] 표 17. 포화 결합에 의해 수득된 인간 적혈구에 대한 결합 친화도(Kd)의 측정(도 12).

항체	Kd (nM)
hB6H12.3	58.2
Ab47	26.5
Vel-IPV-hB6H12.3	>2000
스터브 IPV-hB6H12.3	46.8
절단된 Vel-IPV-hB6H12.3	41.7

[0524]

[0525] ELISA에 의해 rhCD47에 대한 항-CD47 항체의 포화 결합을 수행하였다. Vel-IPV-hB6H12.3은 유의하게 손상된 결합을 나타냈다. 결합은 rhMMP2에 의한 절단 시 복구될 수 있다(도 13 및 표 18).

[0526] 표 18. ELISA에 의한 rhCD47에 대한 결합 친화도(Kd)의 측정(도 13).

항체	Kd (nM)
hB6H12.3	1.7
Vel-IPV-hB6H12.3	1.7
절단된 Vel-IPV-hB6H12.3	> 250

[0527]

[0528] ELISA에 의한 rhCD47에 대한 항-CD47 항체의 포화 결합은 LCDR3에서 G91A 점 돌연변이를 갖는 hB6H12.3 G91A로 수행하였다. hB6H12.3 및 hB6H12.3 G91A 모두는 Ab47보다 높은 B<sub>max</sub>를 나타냈다(도 14 및 표 19).

[0529] 표 19. ELISA에 의한 rhCD47에 대한 결합 친화도(Kd)의 측정(도 14).

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

[0530]

[0531] SW780 인간 방광암 세포에 대한 항-CD47 항체의 포화 결합을 수행하였다. Ab47 및 hB6H12.3의 결합을 LCDR3에서 G91A 돌연변이를 갖는 변이체와 비교하였다(도 15 및 표 20).

[0532] 표 20. 포화 결합에 의해 수득된 SW780 인간 방광암 세포에 대한 결합 친화도(Kd)의 측정(도 15).

항체	Kd (nM)
Ab47	6.8
Ab47 G91A	19.8
hB6H12.3	20.5
hB6H12.3 G91A	62.3

[0533]

[0534] 인간 적혈구에 대한 항-CD47 항체의 포화 결합을 수행하였다. Ab47 및 hB6H12.3의 결합을 LCDR3에서 G91A 돌연변이를 갖는 변이체와 비교하였다(도 16 및 표 21).

[0535] 표 21. 포화 결합에 의해 수득된 적혈구에 대한 결합 친화도(Kd)의 측정(도 16).

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

[0536]

[0537] 실시예 4: 생체 내 실험

[0538] 조직에서 대식세포 침윤의 평가는 면역조직화학(IHC), 웨스턴 블롯, 유세포 분석 또는 RNA 시퀀싱 방법을 포함하는 통상적인 방법에 의해 마우스 대식세포 또는 CD163, CD68 또는 CD11b에 대한 F4/80을 비롯한 대식세포의 표면 마커를 모니터링함으로써 수행될 수 있다..

[0539] 조직에서의 프로테아제의 평가는 프로테아제 활성을 모니터링하는 것뿐만 아니라 단백질분해 활성을 검출할 수 있는 것 둘 다를 포함하는 다양한 기술을 사용하여 모니터링될 수 있다. 프로테아제의 불활성 및 활성 형태 둘 다를 포함할 수 있는 조직에서 프로테아제의 존재를 검출할 수 있는 통상적인 방법은 IHC, RNA 시퀀싱, 웨스턴 블롯 또는 ELISA-기반 방법을 포함한다. 추가 기술은 조직에서 프로테아제 활성을 검출하기 위해 사용될 수 있으며, 이는 자이모그래피, 형광 현미경 검사법에 의한 인 시츄 자이모그래피 또는 형광 단백질분해 기질의 사용을 포함한다. 또한, 형광 단백질분해 기질의 사용은 특정 프로테아제의 면역-포획과 조합될 수 있다. 또한, 프로테아제의 활성 부위에 대한 항체는 IHC, 형광 현미경, 웨스턴 블롯, ELISA 또는 유세포 분석을 비롯한 다양한 기술에 의해 사용될 수 있다(Sela-Passwell 등 Nature Medicine. 18:143-147. 2012; LeBeau 등 Cancer Research. 75:1225-1235. 2015; Sun 등 Biochemistry. 42:892-900. 2003; Shiryaev 등 2:e80. 2013 참고.)

[0540] NSG 마우스의 L428 림프종 이종이식편 종양 모델에서 항-CD47 항체의 활성을 측정하였다. 이 이종이식편 모델은 IHC에 의한 마우스 F4/80의 강력한 염색에 의해 입증되는 바와 같이 높은 대식세포 침윤을 갖는다. 예컨대, 도 17b 참고. 항체를 1 또는 10 mg/kg으로 q4dx4 i.p. 투여하였다. 마스킹된 항체 Ve1-IPV-hB6H12.3뿐만 아니라 마스킹되지 않은 항체 Ab47 및 hB6H12.3은 모두 10 mg/kg 용량의 연구 기간 동안 종양 부피를 효과적으로 감소시켰다. 1 mg/kg의 용량에서, Ve1-IPV-hB6H12.3 및 마스킹되지 않은 hB6H12.3 둘 다는 종양 성장 지연을 제공하였다. 마스킹된 항체인 Ve1-IPV-hB6H12.3은 이 용량에서 마스킹되지 않은 hB6H12.3보다 약간 덜 활성되었다. (도 17a).

[0541] NSG 마우스에서 디트로이트 562 이종이식편 두경부 종양 모델에서 항-CD47 항체의 활성을 측정하였다. 이 이종이식편 모델은 IHC에 의한 마우스 F4/80의 강력한 염색에 의해 입증되는 바와 같이 높은 대식세포 침윤을 갖는다. 도 18b 참고. 5 mg/kg에서 q4dx4. 항체 Ab47, hB6H12.3 및 Ve1-IPV-hB6H12.3은 연구 기간 동안 종양 부피를 효과적으로 감소시켰다(도 18a).

[0542] NSG 마우스의 HT1080 이종이식편 섬유육종 종양 모델(도 19a 및 19b) 및 HEPG2 이종이식편 간세포 종양 모델(도 19c 및 19d)에서 항-CD47 항체의 활성을 측정하였다. 이들 이종이식편 모델은 10 mg/kg으로 IHC.q4dx4에 의한 마우스 F4/80의 제한된 염색에 의해 입증된 바와 같이 낮은 대식세포 침윤을 갖는다. 항체 Ab47, hB6H12.3 및 Ve1-IPV-hB6H12.3은 연구 기간 동안 종양 부피를 효과적으로 감소 및/또는 둔화시켰다.

[0543] 항-종양 활성 및 대식세포 침윤과의 상관성을 평가하는 것 외에도, 이들 종양 내의 MMP의 수준 및 마스킹되지 않은 항체의 평가가 평가되었다. 이들 종양 내의 MMP의 수준을 모니터링할뿐만 아니라 TME 내의 RNA 및 단백질 수준의 상관 관계를 이해하기 위해 이종이식편 및 동계 종양 모델로부터의 종양을 수확하고 단백질 및 RNA 서열 평가를 수행하였다. Luminex multiplex platform을 사용한 단백질 분석은 Ve1-IPV-hB6H12.3의 항-종양 활성을 조사하는 데 사용된 종양 모두가 MMP2와 9의 강력한 수준을 함유한다는 것을 밝혔다(표 22). 또한, 우리가 세포 배양 시스템 내에 존재하는 것들과 종양 MMP 수준을 비교했을 때, 우리는 생체 외 조직 배양 조건에서 보여지는 수준을 훨씬 능가하는 종양 부위에서 MMP 수준의 현저한 증가를 발견하였다(도 35a 및 35b).

[0544] 표 22. 선별된 종양에서의 MMP2 및 MMP9 수준(pg/ml).

		종양			
이종이식편 모델	MMPs	HT1080	HEPG2	L428	
		MMP2	7506	787	204
		MMP9	2020	771	47
동계 모델	MMPs	HT1080	HEPG2	L428	
		MMP2	8453	27765	47899
		MMP9	28137	20845	22661

[0545]

[0546]

내재성 대식세포 저 함량을 갖는 종양 모델에서 항-CD47 항체의 활성화는 대식세포 침윤을 유발하는 것으로 알려진 MMAE 아우리스타틴 ADC와 조합되는 경우 증폭될 수 있다. 이는 NSG 마우스에서 HepG2 이종이식편 종양 모델에서 입증되었다. 항-CD47 항체는 MMAE ADC와 함께 1 mg/kg으로 1 회 투여되는 동안 5 mg/kg으로 q4dx4 i.p. 투여하였다. 항체의 조합은 항체 단독보다 종양 부피를 감소시키는 데 보다 효과적이었다(도 20). 다른 MMAE 함유 아우리스타틴(LIV1A 및 CD30)을 이용한 추가 실험은 Liv1A ADC에 대한 유방암 이종이식편 모델 MCSF7 및 CD30 ADC에 대한 L428 림프종 모델에서 항-CD47 항체와 유사한 조합성을 입증하였다(도 36a 및 36b).

[0547]

마우스 반응성 항-CD47 항체 mIAP301(Oldenborg 등, J. Exp. Med. 193:855-861, 2001)은 인간 hB6H12.3 항체에 사용된 동일한 V<sub>L</sub> 및 I<sub>P</sub>V 서열을 사용하여 마스킹될 수 있다. 이러한 작제물을 이용한 마스킹은 무린 CD47 양성 종양에 대한 항체 결합을 차단하고(도 21a), RBC 식세포작용에 의해 측정된 기능성을 예방하였다(도 21b).

[0548]

항-마우스 CD47 항체 mIAP301은 10 mg/kg의 단일 IV 용량으로 투여되는 경우 BALB/c 마우스에서 혈소판의 고갈을 유도하였다. 대조적으로, 이 고갈은 마우스에 10 mg/kg IV의 용량으로 마스킹된 V<sub>L</sub>-I<sub>P</sub>V-mIAP301 및 V<sub>L</sub>-M2-mIAP301 항체를 투여하는 경우에는 관찰되지 않았다(도 22a).

[0549]

마스킹된 V<sub>L</sub>-I<sub>P</sub>V-mIAP301 항체는 마스킹되지 않은 mIAP301과 비교하여 BALB/c 마우스의 혈장에서 약동학이 크게 개선되어, 마스킹된 항체가 전형적인 항-CD47 항체에 의해 직면되는 표적-매개 약물 동태(drug disposition)를 피할 수 있음을 입증하였다. V<sub>L</sub>-I<sub>P</sub>V-mIAP301 및 mIAP301 항체는 리신 결합을 통해 <sup>3</sup>H-프로프리오네이트로 표지하였고 1mg/kg의 IV 용량으로 BALB/c 마우스에 투여하였다. 항체 농도는 상이한 시점에서 채혈한 혈장의 샘플 계수에 의해 결정되었다(도 22b). 혈장에서 mIAP301의 농도는 15 분 이내에 검출가능한 양 미만인 반면, V<sub>L</sub>-I<sub>P</sub>V-mIAP301 농도는 투여-후 7 일까지 측정될 수 있었다.

[0550]

마스킹된 V<sub>L</sub>-I<sub>P</sub>V-mIAP301, 및 V<sub>L</sub>-M2-mIAP301 및 마스킹되지 않은 mIAP301의 생물분포를 1 및 10 mg/kg의 용량으로 <sup>3</sup>H-표지된 항체를 사용하여 A20-보유 BALB/c 마우스에서 테스트하였다. 종양이 250 mm<sup>3</sup>에 도달하면 항체를 투여하였다. 지정된 시점에서, 마우스를 희생시키고 혈장, 혈액, 종양, 비장 및 간에서의 항체 농도를 샘플 계수에 의해 측정하였다. 도 37a 및 37b에 도시된 바와 같이, 혈장 내 mIAP301의 농도는 투여-후 1 시간 이내에는 무시할 만하다. 한편, 마스킹되지 않은 mIAP301 항체와 비교할 때 비장에 마스킹된 항체가 유의하게 덜 존재한다(도 37c 및 37d). 간에서 비슷한 결과가 나타났다.(데이터는 도시되지 않음). 대조적으로, 정상 조직에서 CD47의 표적-매개 동태를 피함으로써, 마스킹된 V<sub>L</sub>-I<sub>P</sub>V-mIAP301 및 V<sub>L</sub>-M2-mIAP301 항체는 mIAP301과 비교하여 종양에서 증가된 수준을 나타낸다(도 37e 및 37f).

[0551]

항-마우스 CD47 항체 mIAP301은 A20 림프종 모델에서 항종양 활성을 유도했지만 동시에 RBC 고갈을 유발하였다(도 23a 및 도 23b). 마스킹된 V<sub>L</sub>-I<sub>P</sub>V-mIAP301 항체는 유사한 활성을 부여하지만 RBC 고갈에 대한 영향을 제거하였다. V<sub>L</sub>-I<sub>P</sub>V-mIAP301 항체는 RBC 항원 싱크를 피했지만 종양 결합을 잘 유지하였다(도 23c 및 도 23d). A20 림프종 모델은 Donnou 등(Advances in Hematology, Article ID 701704, 2012) 및 Liu 등(Nature Medicine, 21:1209-1215, 2015)에 추가로 상세히 기술된다.

[0552]

항-마우스 CD47 항체 mIAP301은 MC38 결장암 모델에서 항종양 활성을 유도했으며, 이는 면역 종양학 작용제에 반응성인 것으로 알려져 있다. 이 모델에서 마스킹된 mIAP301 항체의 활성화는 동물이 완전한 반응을 나타내는 것과 같이 나타난 우수한 효능을 나타냈다(도 24). 이 동물의 재-도전은 종양의 완전한 거부를 유발하여, 장기 기억 T 세포 반응의 유도를 나타내었다(데이터는 도시되지 않음). MC38 결장암 모델은 Liu 등(상기)에 추가로 상세히 기술된다.

[0553]

Liv1a 또는 CD30에 대한 ADC와 인간 항-CD47 항체의 조합 활성을 테스트하는 것 이외에, 본 발명자들은 또한 다

른 면역 조정제(modulatory agent)와의 조합 활성을 평가하였다. 이를 달성하기 위해, 본 발명자들은 면역 완전 마우스 시스템으로 옮기고 항-CD47 대응 항체 mIAP를 표적화하는 뮤린을 이용하였다. A20 모델을 사용하여, 본 발명자들은 마스킹된 항-CD47 항체가 항-PD-1 대응 항체뿐만 아니라 항-SEA-CD40 항체, SEA-1C10과 함께 상승작용한다는 것을 입증하였다. 이들 데이터는 마스킹된 CD47 표적 작용제와 함께 면역계의 선천적 및 후천적 암 (arm) 둘 다의 인게이지먼트(engagement)이 강력한 항-종양 반응을 유도하기 위해 조합될 수 있다는 증거를 제공한다.

[0554] 모 및 마스킹된 항-뮤린 CD47 항체 mIAP301은 항-PD-1 대응 항체와 조합하여 증가된 항-종양 활성을 유도하였으며, 이는 CR 반응을 나타내는 4/6 마리의 동물을 야기하였다(PD-1 항체, 클론 RMP1-14에 대한 참고를 위해 Dahan 등 Cancer Cell. 28:285-295. 2015, 참고) (도 25a). 모 항-뮤린 CD47 항체 mIAP301은 대식세포 활성화 CD40 표적화된 SEA-항상된 대응 항체 1C10과 함께 증가된 항-종양 활성을 유도하였다(1C10 항체에 대한 참고를 위해 W02016/069919 참고; mIAP301에 대한 참고를 위해 Lindberg 등 J. Biol. Chem. 269: 1567-1570. 1994 참고) (도 25b).

[0555] 항-PD-1 또는 항-CD40과 조합된 항-CD47을 나타내는 데이터는 항-CD47 요법이 체크포인트 억제제 항체(항-PD-1 항체)뿐만 아니라 선천적혈구 활성을 향상시키는 작용제(항-CD40 항체 또는 다른 CD40 억제제)의 맥락에서와 같이 T 세포 활성을 향상시키는 작용제의 활성을 향상시킬 수 있음을 나타낸다. 이는 항-CD47 항체가 항-종양 반응의 후천적 및 선천적 암 둘 다를 지지하는 입장에서 다중 면역 조정제와 쌍을 이룰 수 있다는 개념을 지지한다.

[0556] **실시예 5: 코일형 코일 도메인 마스킹된 항체**

[0557] 상이한 코일형 코일 도메인을 보유하는 마스킹된 인간화 B6H12 항체의 안정성을 BALB/c 마우스에 정맥 내 투여를 사용하여 평가하였다. 항체는 5 mg/kg으로 투여하였다. 주어진 시점(3 일)에, 투여된 마우스로부터 혈장을 수집하였다. 인간 항체를 IgSelect 수지를 사용하여 혈장으로부터 정제하였다. 포획된 항체를 감소시키고 SDS-PAGE에 의해 분리한 다음, HRP-접합된 항-인간 Fc 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 탐지하였다. 절단된 항체의 백분율은 크기가 약 5 kDa만큼 상이한 마스킹 및 마스킹되지 않은 중쇄에 상응하는 밴드의 밀도측정에 의해 평가하였다(도 26).

[0558] 표 23은 중쇄(서열번호 2) 및 경쇄(서열번호 10)를 포함하고 상이한 세포주에서 테스트된 인간화 B6H12 항체에 혼입된 상이한 코일형 코일 형성 펩티드 쌍으로 마스킹하는 효과를 나타낸다. 실시예에서 항체는 또한 Ab47로 불린다. Kd(nM)는 각각의 항체에 대해 도시되며, 이는 각각의 각자의 세포주에 대한 포화 결합으로부터 유래되었다. 각 결합 실험을 위해 고농도 2000 nM을 사용하였다. 표 23에 도시된 바와 같이, 다양한 코일형-코일 도메인은 2 마이크로몰 초과 농도에서 테스트되는 경우에도 세포 표면 상에 발현된 CD47에 대한 Ab47의 결합을 억제할 수 있는 반면, 마스킹되지 않은 Ab47 항체는 3.3-21 nM의 IC<sub>50</sub>을 나타냈다.

[0559] Vel-IPV 코일형 코일 및 절단 서열을 보유하는 마스킹된 인간화 B6H12 항체의 안정성 및 활성화를 인간 HT1080 섬유육종 이종이식편을 보유하는 누드 마우스에서 평가하였다. 항체를 5 mg/kg IP로 투여하였다. 주어진 시점(1, 3, 4 일)에, 마우스를 희생시키고 조직 및 혈장을 수집하였다. 조직을 균질화하고 인간 항체를 IgSelect 수지를 사용하여 생물학적 샘플로부터 정제하였다. 포획된 항체를 감소시키고 SDS-PAGE에 의해 분리한 다음, HRP-접합된 항-인간 Fc 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 탐지하였다. 절단된 항체 백분율은 크기가 약 5 kDa만큼 상이한 마스킹 및 마스킹되지 않은 중쇄에 상응하는 밴드의 밀도측정에 의해 평가하였다(도 38a 및 38b). 테스트된 임의의 시점에서 혈장 또는 간에서 매우 적은 마스킹되지 않은 항체(<5%)가 검출되었다. 한편, 20-30% 이상의 절단이 종양에서 검출되었고, 최대 절단량은 투여-후 3-4 일에 발생하였다. 추가로, 4 일 또는 7 일 동안 Ab47 또는 Vel-IPV-Ab47로 처리된 마우스로부터 수확된 HT1080 종양은 종양 발현된 CD47에 결합하고 포화시킬 수 있는 항체의 정도를 측정하기 위해 유세포 분석을 실시하였다(도 38b).

[0560] 표 23. 상이한 항체 마스킹 도메인을 보유하는 인간화 B6H12 항체(Ab47)의 포화 결합 유세포 분석에 의해 유래된 친화도(nM).

코일형 코일	HT1080	SW780	HCT116	라지(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
хин지	> 2000	476	118	104

[0561]

[0562]

인간화 항-CD47 항체의 활성화 및 약동학 및 시노물구스 마카크에서의 마스킹을 통한 개선된 내약성 입증

[0563]

항-CD47 IgG1 항체 변이체의 약동학 및 내약성을 개선시키기 위한 마스킹 능력을 테스트하기 위해, 일련의 IV 단일 용량 연구를 시노물구스 마카크에서 수행하였다. 테스트된 항-CD47 IgG1 항체는 발현 및 서열에서 이들 중에 걸쳐 고도로 보존된 인간 및 시노 CD47과 교차-반응성이었다. 시노물구스 마카크와 인간 조직의 패널의 인시츄 겔 자이모그래피에 의한 프로테아제 활성의 평가는 프로테아제 활성 수준이 또한 이들 중에 걸쳐서도 고도로 보존됨을 나타냈다. 또한, 시노물구스 마카크는 IgG1 항체와 고도로 유사한 FcγR 상호작용을 가지며 인간 IgG1 항체의 효과기 기능 관련 효과의 독성학적 예측으로 간주되어, IgG1 항-CD47 항체의 효과를 평가하기에 적합한 모델이 된다(Warncke 등 J. Immunol. 188:4405-4411. 2012). 종합하면, 시노물구스 마카크는 항-CD47 항체 단독의 상이한 활성을 평가하기 위한 관련 종을 나타내며, 이러한 활성이 마스킹 및 변형된 효과기 기능으로 어떻게 변경되는지를 나타낸다.

[0564]

대안적으로 인간화된 B6H12인 Ab47

[0565]

대안적으로 인간화된 IgG1 작제물에 대한 B6H12의 내약성 및 PK를 결정하고 내약성 및 약동학을 변경시키는 Vel-IPV 마스크 및 절단 서열의 능력에 대한 개념의 증거를 추가로 입증하기 위해, 나이브(naïve) 시노물구스 마카크에 대안적으로 인간화 IgG1 B6H12 항-CD47 항체인 Ab47의 0.1, 1, 10 및 30 mg/kg을 정맥 내 투여하였다. 인간화 IgG1-기반 Ab47은 인간화 IgG4 플랫폼에서 mB6H12 항체의 공개된 데이터와 비교하여 혈액학적 분석에 의해 적혈구 질량 손실로 입증된 활성 증가를 나타냈다(Liu, 2015). CD47과의 상호작용을 차단할뿐만 아니라 높은 ADCC, ADCP 및 CDC 활성을 가능하게 하는 효과기 기능이 결여된 IgG4 B6H12는 시노물구스 마카크에서 최대 30 mg/kg 용량의 내약성을 나타냈지만(Liu, 2015), Ab47은 1 mg/kg 초과 용량에서 용인되지 않았다(도 27a).

[0566]

Ab47 대 Vel-IPV-Ab47

[0567]

Ab47의 활성을 완화시키는 Vel-IPV 마스크의 능력을 입증하기 위해, 시노물구스 마카크에 0.1, 1 및 10 mg/kg의 용량을 투여하였다. 특히, 1.0 mg/kg의 Ab47 및 10 mg/kg의 Vel-IPV-Ab47로 처리된 동물에서 혈액학적 분석을 위해 수집된 혈액 샘플에서 유사한 수준의 적혈구 질량 손실에 의해 입증된 바와 같이, 대략 10 배 더 높은 용량이 비-마스킹된 Ab47보다 더 잘 용인되었다(도 27b). Ab47로 처리된 동물은 용혈과 연관된 일관된 임상 징후 및 내약성 결여(적색 비뇨생식기 분비물, 용혈된 샘플, 구토 및 활동저하)을 나타내며, 마스킹된 항체로 처리된 동물에서 관찰된 유해 임상 징후가 완전히 결여되었다. 마스킹된 Ab47에 의한 이러한 내약성의 증가는 또한 순환 혈장 사이토카인, 예컨대, 단핵구 화학유인 단백질-1, MCP-1의 증가를 감소시키는 마스킹 능력을 입증하였다. Vel-IPV-Ab47(10 mg/kg)의 최고 테스트 용량은 대조군과 유사한 수준을 나타냈으며 Ab47의 최저 테스트 용량은 0.1 mg/kg이다(도 39a). 또한, 마스킹은 분자의 PK를 극적으로 개선시켰다. 연구 3 일차에 1 mg/kg 용량의 Ab47이 체내적 TAb(총 항체) 검정에 대한 검출 한계 미만인 경우, 1 mg/kg의 Vel-IPV-Ab47가 연구의 전체 과정, 연구 15 일차를 통해 검출가능하였다(도 28). 체내적 TAb ELISA는 Ab47 및 Vel-IPV-Ab47의 인간 경쇄 카파에 결합하는 항-인간 경쇄 카파 mAb로 코팅된 96-웰 마이크로타이터 플레이트를 사용한다. 이는 시노물구스

원숭이 경쇄 카파와 교차 반응하지 않는다. 연구 샘플을 나이브 폴딩된 시노몰구스 원숭이 K<sub>2</sub>EDTA 혈장을 이용한 Ab47에 대한 검정의 동적 범위(10(LLOQ) 내지 1280 ng/mL(ULOQ)) 또는 Ve1-IPV-Ab47(20(LLOQ) 내지 2560 ng/mL(ULOQ))로 희석시켰다. QC 및 캘리브레이터와 함께 희석된 샘플은 차단 및 세척된 플레이트에 첨가하기 전에 검정 완충제를 이용하여 1:20의 최소 요구 희석(MRD)을 실시하였다. 실온에서 1 시간 동안 항온처리한 후, 플레이트를 세척하고, 결합된 분석물(Ab47 또는 Ve1-IPV-Ab47)을 비오틴화된 항-인간 경쇄 카파 mAb(포획 시약으로서 동일 클론)로 검출한 후 중합체 스트렙타비딘에 결합된 홀스래디쉬 퍼옥시다제(폴리-HRP-SA)를 첨가하였다. 항온처리 및 세척 후, HRP 기질 3,3',5,5'-테트라메틸-벤지딘(TMB)을 플레이트에 첨가하고 10 분 동안 색상을 전개시켰다. 반응을 1N HCl로 중단하고 플레이트를 450 nm-630 nm에서 Spectromax M5 플레이트 판독기에서 판독하였다. 순(net) 흡광도 값을 Watson LIMS v. 7.4.2로 불러오고 샘플에 존재하는 ng/mL 총 항체로 흡광도를 변환하기 위해 5-PL 비선형 회귀를 수행하였다.

[0568] Ab47 대 hB6H12.3

[0569] 생체 내에서의 상이한 활성을 테스트하기 위해 상이한 K<sub>d</sub>, 증가된 B<sub>max</sub> 및 감소된 혈구응집반응을 특징으로 하는 인간화 B6H12.3을 시노몰구스 마카크에 1 mg/kg의 용량으로 단일 IV 볼루스 투여하였다. 1 mg/kg의 hB6H12.3 및 Ab47 둘 다는 비슷한 수준의 적혈구 고갈을 유발하는 동안(도 29), Ab47은 또한 1 mg/kg에서 투여-전 혈소판 수준의 대략 40%로 고갈을 보인 반면 hB6H12.3은 샘플링 편향(bias)으로 인한 제어 수준과 유사한 단지 20%의 고갈을 나타냈다(도 30). 연구 7 일차에 시작된 혈소판의 증가는 아마도 일반적으로 자극된 골수로 인해 두 항체로 처리한 후에 발생하였다.

[0570] hB6H12.3 대 Ve1-IPV-hB6H12

[0571] hB6H12.3의 활성을 완화시키는 Ve1-IPV 마스크의 능력을 입증하기 위해, 시노몰구스 마카크에 항체의 10 및 20 mg/kg을 투여하였다. 테스트된 최고 용량인 20mg/kg은 혈액학 테스트에서 1 mg/kg의 hB6H12.3에서 관찰된 것과 같이 적혈구 질량 손실의 유사한 감소를 보였지만 20-배 더 낮은 용량에서 비-마스크된 hB6H12.3보다 증가된 내약성을 나타냈다(도 31). 유사하게, hB6H12.3의 마스크는 또한 MCP-1을 포함하는 순환 사이토카인의 감소를 나타냈고, 마스크되지 않은 hB6H12.3으로 달성된 것과 유사한 반응을 산출하기 위해 20-배의 마스크된 hB6H12.3의 용량을 필요로 한다(도 39b). Ve1-IPV-hB6H12.3을 투여한 동물은 치료와 관련된 임상 증상을 경험하지 못한 반면, 용혈과 관련된 임상 증상은 1 mg/kg에서 비-마스크된 hB6H12.3으로 관찰되었다. 제네릭 TAb ELISA를 사용한 약동학적 분석은 비-마스크된 hB6H12.3과 비교하여 개선된 약동학적 프로파일을 나타냈다(도 39c).

[0572] Ve1-IPV-hB6H12.3 대 SEA-Ve1-IPV-hB6H12.3

[0573] IgG1 마스크된 항-CD47 항체, Ve1-IPV-hB6H12.3의 활성을 추가로 향상시키기 위해, 향상된 효과기 기능을 갖는 당 조작된 항체, SEA, 비-푸코실화된 항체를 생산하기 위해 Seattle Genetics의 독점 기술을 이용하여 항체를 생산하였다(US 8,163,551). 푸코실화 및 비-푸코실화된 SEA hB6H12.3뿐만 아니라 Ve1-IPV-hB6H12.3 및 SEA-Ve1-IPV-hB6H12.3의 이중이식편 모델에서의 상대적 항종양 활성은 고(디트로이트562) 및 저(HT1080) 대식세포 모델에서 평가하였다. 코어 푸코실화 및 결과적인 SEA-hB6H12.3 및 SEA-Ve1-IPV-hB6H12.3의 제거는 어느 모델에서도 항종양 활성에 대한 이점의 증거를 제공하지 않았다(도 40a 및 40b). 이들 모델이 면역 불완전한 마우스에서 실행됨에 따라, SEA 백본으로 부여된 향상된 효과기 기능의 이점을 충분히 이용하지 못할 수 있으며, 무린 대응 항체 mIAP301은 또한 비-푸코실화되며 푸코실화 및 비-푸코실화된 ve1-IPV-mIAP301을 이용한 항-종양 활성은 고 활성 A20 동계 림프종 모델뿐만 아니라 저 활성 CT26 동계 모델에서 테스트하였다. SEA 항체를 생성하기 위한 코어 푸코스의 제거는 추가의 항-종양 이익을 부여하는 것으로 나타나지 않았다.

[0574] 다른 항체를 사용한 SEA 기술은 증가된 활성을 유발하지만, 항체가 마스크되는 경우, SEA 및 비-SEA 버전 둘 다는 혈액학적 분석에서 유사한 적혈구 질량 손실과 함께 테스트된 동일한 최대 용량 수준인 20 mg/kg에서 잘 용인된다(도 32). 어느 항체로도 처리하는 동안 유해한 임상 징후는 관찰되지 않았지만, 순환 MCP-1 사이토카인 수준은 SEA 항체에 대해 증가되었다(도 41a). 제네릭 TAb ELISA를 사용한 약동학적 분석은 SEA 및 비-SEA Ve1-IPV-hB6H12.3 항체 사이에서 일반적으로 유사한 약동학적 프로파일을 나타냈으며, 비-마스크된 hB6H12.3과 비교하여 둘 다 개선되었다(도 41b).

[0575] **실시예 6: 선택된 바이오마커를 이용한 대상체에서 종양의 치료**

[0576] 본 개시내용은 상기 대상체 내의 선택된 바이오마커에 기반하여 본 발명의 항-CD47 항체를 이용하여 종양을 갖는 대상체의 치료를 추가로 계획하였다. 본 발명의 항-CD47 항체를 이용한 치료를 위한 대상체의 선택은 1) 주

변 비-종양 조직에 비해 종양 조직 내의 MMP의 높은 수준 및 활성; 2) 주변 비-종양 조직에 비해 종양 조직에서 CD47의 더 높은 발현 수준; 및 3) 주변 비-종양 조직에 비해 종양 조직에서 더 높은 수준의 대식세포 침윤에 기반할 것이다.

[0577] 선택된 바이오마커의 수준 및 활성을 결정하는 방법은 면역조직화학 및 효소 분석을 포함한다. 예를 들어, 대식세포 침윤 수준은 마커로서 항-CD163 항체를 사용하여 면역조직화학에 의해 결정될 수 있다.

[0578] 종양 대 비-종양 조직 샘플에서 종양 침윤 대식세포를 검출하는 능력을 입증하기 위해, 유방암 코어 샘플 및 정상 유방 조직 샘플을 사용하였다. 항-CD163 항체를 사용하여 면역조직 화학을 수행하였다. 결과는 종양 침윤 대식세포가 비-종양 샘플에 비해 종양 샘플에서 용이하게 검출될 수 있음을 입증하였다(도 33).

[0579] **실시예 7: Ve1-IPV-hB6H12.3에 의한 CD47-양성 세포의 식세포작용 및 혈구응집반응**

[0580] 항체 기능성에 대한 마스킹의 영향을 평가하기 위해 CD47-양성 RBC의 식세포작용을 모니터링 하였다. 인간 적혈구를 형광성 적색 PKH 염료로 표지하였고 1 µg/mL의 마스킹되지 않은 hB6H12.3, 마스킹된 Ve1-IPV-hB6H12.3, 또는 MMP-활성화된 Ve1-IPV-hB6H12.3으로 30 분 동안 흡소닌화하였다. 적혈구를 세척한 다음 단핵구 대식세포와 함께 10 : 1 비율로 2 시간 동안 배양하였다. 이어서 샘플을 ACK 저장성 용해 완충제로 3 회 세척하였다. 식세포작용의 정도는 유세포 분석을 통해 인간 대식세포에 의해 형광-표지된 인간 RBC의 흡수를 모니터링함으로써 평가하였다.

[0581] 도 42에 도시된 바와 같이, 마스킹된 Ve1-IPV-hB6H12.3은 처리되지 않은 RBC의 배경 수준 초과의 식세포작용의 증가를 나타내지 않았지만, hB6H12.3 및 MMP-활성화된 Ve1-IPV-hB6H12.3은 모두 유사한 수준의 RBC 식세포작용을 나타냈다.

[0582] 마스킹된 Ab47 항체에 의한 인간 RBC의 혈구응집반응 촉진을 실시예 2에 기술된 바와 같이 테스트하였다. 인간 RBC를 37 °C에서 30 분 동안 증가하는 농도의 마스킹된 Ve1-IPV-Ab47 또는 MMP-절단된 Ve1-IPV-Ab47에 노출시켰다. 각 웰 내의 겔보기 스팟의 직경의 광학적 평가에 의해 혈구응집반응을 모니터링하였다.

[0583] 도 43에 도시된 바와 같이, Ab47이 마스킹될 때 혈구응집반응이 억제되었고, MMP에 의해 마스크가 제거될 때 혈구응집반응이 복구되었다.

[0584] **실시예 8: hB6H12.3은 아포토시스를 직접 유도한다**

[0585] 세포 표면 CD47 결합은 아포토시스를 유도할 수 있다. 항-CD47 mAb 클론 B6H12는 오직 표면에 고정된 경우에만 아포토시스를 유도할 수 있는 것으로 보고되나, hB6H12.3은 표면에 결합됨 없이 아포토시스 활성을 나타냈다. 8 개의 상이한 세포주(A431, HEK293, HeLa, HepG2, HPAF11, I540Cy, MCF7 및 THP1)를 각각 24 시간 동안 웰 당 50,000개의 세포로 플레이팅하였다. 세포를 5 내지 0.05 µg/mL의 hB6H12.3, 5F9 또는 IgG1 이소타입 대조군으로 18 시간 동안 처리하였다. 이어서, 세포를 수집하고, 2 회 세척하고, 아포토시스 마커 아넥신 V에 대해 염색하고, 아포토시스를 유세포 분석법을 사용하여 정량하였다.

[0586] 도 44에 도시된 바와 같이, 모든 8 개의 세포 유형에서, hB6H12.3으로 처리된 세포는 5F9 또는 IgG1 이소타입 대조군으로 처리된 동일한 유형의 세포보다 아넥신 염색의 상대 수준에 의해 결정된 바와 같이 더 큰 수준의 아포토시스를 나타냈다.

[0587] **실시예 9: 전혈 및 혈장에서의 hB6H12.3 안정성**

[0588] 다양한 유형의 암을 갖는 17 명의 환자(육종 10명, NSCLC 3명, 결장암 3명 및 흑색종 1명)로부터의 갓 수확된 전혈 샘플(4% 소듐 시트레이트)을 BioIVT로부터 획득하였다. hB6H12.3 및 마스킹된 Ve1-IPV-hB6H12.3 항체는 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)로 직접 표지하였다. 신선한 전혈의 샘플을 37 °C에서 20 시간 동안 증가하는 농도(최대 농도, 20 µg/ml)의 FITC 표지된 hB6H12.3 또는 FITC 표지된 마스킹된 Ve1-IPV-hB6H12.3과 함께 항온처리하였다. 혈액 세포에 대한 항체의 결합은 유세포 분석에 의해 특징화되었다.

[0589] 육종 전혈 샘플 각각의 일부를 사용하여 혈장을 추출하고, 20 µg/mL의 재조합 CD47을 혈장 샘플에 첨가하였다. 이어서 재조합 CD47을 함유하는 혈장 샘플을 37 °C에서 4 일 동안 20 µg/mL의 hB6H12.3 또는 마스킹된 Ve1-IPV-hB6H12.3과 함께 항온처리하였다. Ve1-IPV 마스크의 절단 정도는 실시예 2에 기술된 바와 같이 CD47 결합 ELISA를 사용하여 평가하였다. Ve1-IPV-hB6H12.3은 혈장 내로 스파이크된 농도(20 µg/mL)에서 재조합 CD47에 결합하지 않았다; 따라서, Ve1-IPV-hB6H12.3과 함께 항온처리된 혈장에서 검출된 임의의 항체-CD47 결합은 CD47에 대한 절단된 Ve1-IPV-hB6H12.3의 결합 때문이다.

- [0590] 테스트된 17 개의 혈액 샘플 중, 마스킹된 Ve1-IPV-hB6H12.3은 최고 농도에서 단지 하나의 아웃라이어 샘플(육종, 도 45b 참조)에서만 10% 초과와 결합을 나타냈다. 마스킹된 Ve1-IPV-hB6H12.3에 의한 결합은 다른 16 개 샘플 중 어느 것에서도 검출되지 않았다(도 45a에 도시된 대표 데이터). 도 45c에 도시된 바와 같이, 육종 환자로부터의 10 개의 혈장 샘플 중 마스킹된 Ve1-IPV-hB6H12.3의 2% 이하가 절단되었다.
- [0591] **실시예 10: hB6H12.3에 대한 사이토카인 생성**
- [0592] 암 환자(육종 10명, NSCLC 3명, 결장암 3명 및 흑색종 1명)로부터의 신선한 전혈 샘플을 증가하는 농도(최대 농도, 20 µg/ml)의 FITC 표지된 hB6H12.3 또는 FITC 표지된 Ve1-IPV-hB6H12.3, 또는 0.1 µg/mL LPS와 함께 37 °C에서 20 시간 동안 항온처리하였다. 사이토카인 수준은 38-플렉스 사이토카인 및 케모카인 자기 비드 패널을 사용하여 평가하였다.
- [0593] 테스트된 대부분의 환자 샘플에서, 보통 정도(modest)의 사이토카인 생성은 hB6H12.3에 의해 유도되었으나, 최소 사이토카인 생성은 Ve1-IPV-hB6H12.3에 의해 유도되었다. 사이토카인 IP-10, IL1-Ra, MIP-1α 및 MIP-1β는 hB6H12.3에 의해 가장 일반적으로 유도되었다. IL1-Ra(도 46b), MIP-1α 및 MIP-1β의 수준은 테스트된 hB6H12.3의 최대 농도에서 200 pg/mL 미만인 반면, IP-10 수준은 4000-5000 ng/mL에 도달하였다(도 46a). Ve1-IPV-hB6H12.3에 의해 생성된 사이토카인 수준은 모든 경우에 hB6H12.3에 의해 생성된 것보다 낮았으며, 전형적으로 100-1000 배 낮았다.
- [0594] **실시예 11: hB6H12.3은 생체 내 아폽토시스를 유도한다**
- [0595] 인간 HT1080 섬유육종 이종이식편을 보유한 누드 마우스에는 종양이 200 mm<sup>3</sup>에 도달할 때 5 mg/kg IP 용량의 hB6H12.3, Ve1-IPV-hB6H12.3 또는 hIgG1 이소타입 대조군을 투여하였다. 주어진 시점(24 및 96 시간)에, 마우스를 희생시키고 종양을 수집하였다. 종양을 균질화하고, 인간 HT1080 이종이식편 섬유육종 종양 세포를 1X 아넥신 V 염색 완충제(물에서 1:10으로 희석된 50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유하는 10x 염색 완충제 pH7.4)에 1 백만 세포/ml로 재현탁시켰다. 세포를 둥근 바닥 96 웰 플레이트(100 µL/웰)로 옮기고 5 µL의 FITC 아넥신 V 염색 시약 및 1 µL의 100 µg/ml 자외선 Live/Dead 염색 완충제를 각 웰에 첨가하였다. 세포를 실온에서 30 분 동안 염색하였다. 샘플을 1550 g에서 5 분 동안 회전시키고, 상청액을 제거하고, 세포를 1X 빙냉 아넥신 V 염색 완충제로 3X 세척하였다. 세포를 100 µL의 1X 아넥신 V 염색 완충제에 재현탁시켰다. 아폽토시스는 표면 포스파티딜 세린에 대한 아넥신 V 결합에 대해 양성인 세포의 백분율로서 LSRII 세포 측정기에서 유세포 분석에 의해 평가하였다. Live/Dead 염색에 의해 양성으로 염색된 세포는 분석으로부터 제외시켰다.
- [0596] 도 47에 도시된 바와 같이, hB6H12.3 및 Ve1-IPV-hB6H12.3 둘 다로 처리된 종양은 처리되지 않은 및 이소타입 대조군-처리된 종양 샘플과 비교할 때 처리 후 96 시간에 증가된 아넥신 V+ 아폽토시스 세포를 보였다.
- [0597] 특정 비-제한적인 실시양태
- [0598] 실시양태 1. 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 중쇄 가변 영역이
- [0599] 서열번호 16(GYGMS), 17(TITSGGTYTYPPDSVKG), 및 18(SLAGNAMDY)로서 제시된 CDR; 및
- [0600] 서열번호 88에 제시된 인간 IGHV3-23/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H44, H49, H82, H89, H91 및 H94가 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0601] 실시양태 2. 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 중쇄 가변 영역이
- [0602] 서열번호 16(GYGMS), 17(TITSGGTYTYPPDSVKG) 및 18(SLAGNAMDY)로서 제시된 CDR; 및
- [0603] 서열번호 89에 제시된 인간 IGHV3-48/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H49가 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0604] 실시양태 3. 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 중쇄 가변 영역이
- [0605] 서열번호 16(GYGMS), 17(TITSGGTYTYPPDSVKG) 및 18(SLAGNAMDY)로서 제시된 CDR; 및
- [0606] 서열번호 90에 제시된 인간 IGHV3-66/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H29,

H49 및 H82가 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

- [0607] 실시양태 4. 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 중쇄 가변 영역이
- [0608] 서열번호 16(GYGMS), 17(TITSGGTYTYPPDSVKG) 및 18(SLAGNAMDY)로서 제시된 CDR; 및
- [0609] 서열번호 91에 제시된 인간 IGHV3-74/HJ4 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 H49는 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0610] 실시양태 5. 실시양태 1-4 중 어느 하나에 있어서, 경쇄 가변 영역이 서열번호 31(RASQTISDY LH), 32(FASQSSIS) 및 33(QNGHGFPRT)로서 제시된 CDR; 및
- [0611] 서열번호 92에 제시된 인간 IGKV6-21/KJ2 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 L4, L21, L69 및 L85가 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0612] 실시양태 6. 실시양태 1-4 중 어느 하나에 있어서, 경쇄 가변 영역이 서열번호 31(RASQTISDY LH), 32(FASQSSIS) 및 33(QNGHGFPRT)로서 제시된 CDR; 및
- [0613] 서열번호 93에 제시된 인간 IGKV1-27/KJ2 프레임워크이되, 여기서, 카바트 넘버링에 따른 프레임워크 위치 L21, L49 및 L69가 공여자 잔기인, 프레임워크를 포함하는, 인간화 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0614] 실시양태 7. 실시양태 1-4 중 어느 하나에 있어서, H29가 F에 의해 점유되고, H44가 R 또는 G에 의해 점유되고, H49가 A에 의해 점유되고, H82가 M 또는 I에 의해 점유되고, H89가 I 또는 V에 의해 점유되고, H91이 F 또는 Y에 의해 점유되며, H94가 R에 의해 점유된, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0615] 실시양태 8. 실시양태 5에 있어서, 카바트 넘버링에 따른, L4가 M에 의해 점유되고, L21이 L에 의해 점유되고, L49가 K에 의해 점유되고, L69가 T 또는 S에 의해 점유되며, L85가 V 또는 T에 의해 점유되는, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0616] 실시양태 9. 실시양태 1-4 중 어느 하나에 있어서, 서열번호 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8 중 어느 하나에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(HCVR) 및 서열번호 10, 11, 12, 13, 14 및 15 중 어느 하나에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0617] 실시양태 10. 실시양태 5에 있어서, 카바트 넘버링에 따른 LCDR3에 G91A 돌연변이를 추가로 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0618] 실시양태 11. 실시양태 1-4 중 어느 하나에 있어서, 항체 또는 항원-결합 단편이 IgG1 이소타입인, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0619] 실시양태 12. 실시양태 1-4 중 어느 하나에 있어서, 모 항체와 비교하여 향상된 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 갖는, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0620] 실시양태 13. 실시양태 1-4 중 어느 하나에 있어서, 항체 또는 항원-결합 단편이 이의 모 항체와 비교하여 향상된 항체 의존성 세포성 식세포작용(ADCP)을 갖는, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0621] 실시양태 14. 실시양태 1-4 중 어느 하나에 있어서, 모 항체와 비교하여 감소된 코어 푸코실화를 갖는, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0622] 실시양태 15. 실시양태 1-4 중 어느 하나에 있어서, CD47과 SIRP $\alpha$  사이의 상호작용을 차단하는, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0623] 실시양태 16. 실시양태 1-4 중 어느 하나에 있어서, 모 항체와 비교하여 적혈구의 감소된 혈구응집반응을 갖는, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0624] 실시양태 17. 실시양태 1-4 중 어느 하나의 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 서열.
- [0625] 실시양태 18. 실시양태 1에 있어서, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv 단편, 디아바디, 단일-쇄 항체, scFv 단편 또는 scFv-Fc를 포함하는, 항원-결합 단편.
- [0626] 실시양태 19. 마스킹제를 포함하는 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법으로서, 마스킹제가, 마스킹제가 없는 항체 또는 이

의 항원-결합 단편과 비교하여 인간 CD47에 대한 항체 또는 항원-결합 단편의 결합 친화도를 감소시키는 하나 이상의 코일형 코일 펩티드를 포함하는 것인, 방법.

- [0627] 실시양태 20. 실시양태 19에 있어서, 프로테아제-절단가능한 링커가 마스킹제에 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 부착시키는 것인, 방법.
- [0628] 실시양태 21. 실시양태 20에 있어서, 프로테아제-절단가능한 링커가 IPVSLRSG(서열번호 73) 또는 GPLGVR(서열번호 57)을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 것인, 방법.
- [0629] 실시양태 22. 실시양태 20에 있어서, 프로테아제-절단가능한 링커가 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP) 절단 부위를 포함하는 것인, 방법.
- [0630] 실시양태 23. 실시양태 22에 있어서, MMP 절단 부위가 MMP2 절단 부위, MMP7 절단 부위, MMP9 절단 부위 및 MMP13 절단 부위로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [0631] 실시양태 24. 실시양태 22에 있어서, 마스킹제가 MMP에 의한 종양 미세환경에서 MMP 절단 부위의 절단 후에 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 방출되는 것인, 방법.
- [0632] 실시양태 25. 실시양태 24에 있어서, 절단된 항-CD47 항체가 MMP 절단 부위의 스테브 아미노산 램넨트를 갖는 것인, 방법.
- [0633] 실시양태 26. 실시양태 25에 있어서, 스테브 아미노산 램넨트가 항체의 N 말단에서 LRSG, SG 또는 VR의 서열을 포함하는 것인, 방법.
- [0634] 실시양태 27. 실시양태 19에 있어서, 하나 이상의 코일형 코일 펩티드가 서열번호 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 및 56으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하는 것인, 방법.
- [0635] 실시양태 28. 실시양태 19에 있어서, CD47에 대한 항체 또는 항원-결합 단편이 마스킹제가 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 약 100-배 이상 감소되는 것인, 방법.
- [0636] 실시양태 29. 실시양태 19에 있어서, CD47에 대한 항체 또는 항원-결합 단편이 마스킹제가 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 약 200-배 내지 약 1500-배 감소되는 것인, 방법.
- [0637] 실시양태 30. 실시양태 19에 있어서, CD47-발현 암이 고형암을 유발하는 혈액암인 것인, 방법.
- [0638] 실시양태 31. 실시양태 30에 있어서, 혈액암이 비-호지킨 림프종, B-림프모구성 림프종; B 세포 만성 림프구성 백혈병/소 림프구성 림프종, 리히터 증후군, 여포성 림프종, 다발성 골수종, 골수섬유증, 진성 다혈구증, 피부 T 세포 림프종, 의미 불명 단클론성 감마글로불린병증(MGUS), 골수이형성 증후군(MDS), 면역모구성 대세포 림프종, 전구 B 림프모구성 림프종, 급성 골수성 백혈병(AML) 및 역형성 대세포 림프종으로부터 선택된 것인, 방법.
- [0639] 실시양태 32. 실시양태 19에 있어서, CD47-발현 암이 고형 종양인 것인, 방법.
- [0640] 실시양태 33. 실시양태 32에 있어서, 고형 종양이 폐암, 췌장암, 유방암, 간암, 난소암, 고환암, 신장암, 방광암, 척수암, 뇌암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 결장/직장암, 항문암, 자궁 내막암, 식도암, 담낭암, 위장관암, 피부암, 전립선암, 뇌하수체암, 위암, 자궁암, 질암 및 갑상선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [0641] 실시양태 34. 실시양태 32에 있어서, 고형 종양이 폐암, 연조직 육종, 결장직장암, 두경부암 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [0642] 실시양태 35. 실시양태 19에 있어서, 대상체가 고형암을 겪는 인간인 것인, 방법.
- [0643] 실시양태 36. 실시양태 19에 있어서, 항-CD47 항체가 하나 이상의 프로그램된 세포 사멸 단백질 1(PD-1), 프로그램된 사멸-리간드 1(PD-L1), PD-L2, 세포독성 T 림프구-연관 단백질 4(CTLA-4), T 세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인 함유 3(TIM-3), 림프구 활성화 유전자 3(LAG-3), 암배아성 항원 관련 세포 부착 분자 1(CEACAM-1), CEACAM-5, T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제자(VISTA), B 및 T 림프구 약화인자(BTLA), Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT), 백혈구-연관 면역글로불린-유사 수용체 1(LAIR1), CD160, 2B4 또는 TGFR로부터 선택된 면역 체크포인트 분자의 억제제와 병용하여 투여되는 것인, 방법.
- [0644] 실시양태 37. 마스킹제를 포함하는 인간 CD47 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 여기서 마스킹제가 서열번호 95(QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLGS) 및/또는 서열번호

94(QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLS)의 서열을 포함하는 하나 이상의 코일형 코일 펩티드를 포함하며, 하나 이상의 코일형 코일 펩티드가 마스킹제가 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 인간 CD47 단백질에 대한 항체 또는 항원-결합 단편의 결합 친화도를 감소시키는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

- [0645] 실시양태 38. 실시양태 37에 있어서, 서열번호 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8 중 어느 하나에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(HCVR) 및 서열번호 10, 11, 12, 13, 14 및 15 중 어느 하나에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0646] 실시양태 39. 실시양태 37에 있어서, 마스킹제가 프로테아제-절단가능한 링커를 통해 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 부착되는, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0647] 실시양태 40. 실시양태 39에 있어서, 프로테아제-절단가능한 링커가 IPVSLRSG(서열번호 73) 또는 GPLGVR(서열번호 57)을 포함하는 아미노산 서열을 갖는, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0648] 실시양태 41. 실시양태 39에 있어서, 프로테아제-절단가능한 링커가 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP) 절단 부위를 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0649] 실시양태 42. 실시양태 41에 있어서, MMP 절단 부위가 MMP2 절단 부위, MMP7 절단 부위, MMP9 절단 부위 및 MMP13 절단 부위로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0650] 실시양태 43. 실시양태 37에 있어서, 마스킹제가 MMP에 의한 MMP 절단 부위의 절단 후 항-CD47 항체로부터 제거되는, 항체.
- [0651] 실시양태 44. 실시양태 43에 있어서, 항-CD47 항체가 MMP에 의한 MMP 절단 부위의 절단 후 MMP 절단 부위의 스테르브 아미노산 램넨트를 갖는, 항체.
- [0652] 실시양태 45. 실시양태 44에 있어서, 스테르브 아미노산 램넨트가 항체의 N 말단에서 LRSR, SR 또는 VR의 서열을 포함하는, 항체.
- [0653] 실시양태 46. 실시양태 37에 있어서, 결합이, 마스킹제가 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 약 100-배 이상 감소된, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0654] 실시양태 47. 실시양태 37에 있어서, 결합이, 마스킹제가 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 약 200-배 내지 약 1500-배 감소된, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0655] 실시양태 48. 실시양태 37에 있어서, 서열번호 42의 중쇄 서열 및 서열번호 43의 경쇄 서열을 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0656] 실시양태 49. 실시양태 37-48 중 어느 하나에 있어서, ADCC 및/또는 CDC 활성으로부터 선택된 향상된 효과기 기능을 부여하는 변이체 Fc 영역을 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0657] 실시양태 50. 실시양태 49에 있어서, 어푸코실화된, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0658] 실시양태 51. 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 항체가 IgG1 이소타입인, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0659] 실시양태 52. 실시양태 51에 있어서, 향상된 ADCC, 향상된 ADCP 및/또는 향상된 CDC 활성을 포함하는, 항체.
- [0660] 실시양태 53. 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법으로서,
- [0661] a) 대상체를 주변 비-암 조직에 비해 암에서 MMP의 상승된 수준을 갖는 것으로서 식별하는 단계; 및
- [0662] b) 마스킹제를 포함하는 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계이 되, 여기서, 마스킹제는, 대상체가 주변 비-암 조직에 비해 암에서 MMP의 상승된 수준을 갖는 경우 마스킹제가 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 인간 CD47에 대한 항체 또는 항원-결합 단편의 결합 친화도를 감소시키는 코일형 코일 펩티드를 포함하는, 단계를 포함하는, 방법.
- [0663] 실시양태 54. 실시양태 53에 있어서, MMP가 MMP2, MMP7, MMP9 및 MMP13으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [0664] 실시양태 55. 실시양태 53에 있어서, 단계 a)가
- [0665] i) 대상체로부터 암 조직 및 비-암 조직을 분리하는 단계;

- [0666] ii) 단리된 암 조직 및 비-암 조직에서 MMP를 검출하는 단계; 및
- [0667] iii) 비-암 조직에 대한 암 조직의 염색 양을 비교하는 단계를 포함하는 것인, 방법.
- [0668] 실시양태 56. 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법으로서,
- [0669] a) 대상체를 주변 비-암 조직에 비해 암에서 CD47의 상승된 수준을 갖는 것으로서 식별하는 단계; 및
- [0670] b) 마스킹제를 포함하는 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계이 되, 여기서, 마스킹제는, 대상체가 주변 비-암 조직에 비해 암에서 CD47의 상승된 수준을 갖는 경우 마스킹제가 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 인간 CD47에 대한 항체 또는 항원-결합 단편의 결합 친화도를 감소시키는 코일형 코일 펩티드를 포함하는, 단계를 포함하는, 방법.
- [0671] 실시양태 57. 실시양태 56에 있어서, 단계 a)가
- [0672] i) 대상체로부터 암 조직 및 주변 비-암 조직을 단리하는 단계;
- [0673] ii) 단리된 암 조직 및 주변 비-암 조직에서 CD47을 검출하는 단계; 및
- [0674] iii) CD47 염색 비-암 조직에 비해 암 조직에서 CD47 염색의 양을 비교하는 단계를 포함하는 것인, 방법.
- [0675] 실시양태 58. 대상체에서 CD47-발현 암의 치료 방법으로서,
- [0676] a) 대상체를 비-암 조직에 비해 암 조직에서 대식세포 침윤의 상승된 수준을 갖는 것으로서 식별하는 단계; 및
- [0677] b) 마스킹제를 포함하는 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 단계이 되, 여기서, 마스킹제는, 대상체가 비-암 조직에 비해 암에서 대식세포 침윤의 상승된 수준을 갖는 경우 마스킹제가 없는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 비교하여 인간 CD47에 대한 항체 또는 항원-결합 단편의 결합 친화도를 감소시키는 하나 이상의 코일형 코일 펩티드를 포함하는, 단계를 포함하는, 방법.
- [0678] 실시양태 59. 실시양태 58에 있어서, 단계 a)가
- [0679] i) 대상체로부터 암 조직 및 주변 비-암 조직을 단리하는 단계;
- [0680] ii) 단리된 암 조직 및 비-암 조직에서 대식세포를 검출하는 단계; 및
- [0681] iii) 비-암 조직에 대한 암 조직의 염색 양을 비교하는 단계를 포함하는 것인, 방법.
- [0682] 실시양태 60. 실시양태 58에 있어서, 대식세포 염색이 항-CD163 항체로 수행되는 것인, 방법.
- [0683] 실시양태 61. 서열번호 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8 중 어느 하나에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(HCVR) 및 서열번호 10, 11, 12, 13, 14 및 15 중 어느 하나에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함하는, 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 여기서 항체가 HCVR 및/또는 LCVR의 N 말단에서 서열 LRSG, SG 또는 VR을 추가로 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0684] 실시양태 62. 실시양태 37의 마스킹된 CD47 항체와 작용성 CD40 항체의 조합을 투여함으로써 암을 치료하는 방법.
- [0685] 실시양태 63. 실시양태 62에 있어서, 작용성 CD40 항체, 예컨대, SEA-CD40 항체가 낮은 푸코실화 수준을 갖는 것인, 방법.
- [0686] 실시양태 64. 실시양태 37의 마스킹된 CD47 항체와 항체 약물 접합체(ADC)의 조합을 투여함으로써 암을 치료하는 방법으로서, 여기서, ADC의 항체가 암 세포의 세포 외 표면에서 발현되는 단백질에 특이적으로 결합하며 항체가 세포독성제를 포함하는 약물-링커에 접합되는, 방법.
- [0687] 실시양태 65. 실시양태 64에 있어서, 세포독성제가 아우리스타틴인 것인, 방법.
- [0688] 실시양태 66. 실시양태 64에 있어서, ADC의 항체가 vcMMAE 및 mcMMAF로 이루어진 군으로부터 선택된 약물 링커에 접합되는 것인, 방법.

도면

도면1a

```

          10      20      30      40      50      60
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
Mu B6H12 vH EVQLVESGGDLVLPKPGGSLKLSCAASGFTFSGYGMSWVRQTPDKRLEWVATITSGGTYTYPDSVKGRFTI
Hu IGHV3-23/HJ4 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTI
hvH1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGMSWVRQAPGKLEWVATITSGGTYTYPDSVKGRFTI
hvH2 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVATITSGGTYTYPADSVKGRFTI
hvH3 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVATITSGGTYTYPADSVKGRFTI
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++++

          70      80      90      100     110
      |....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
Mu B6H12 vH SRDIAKNTLYLQIDSLKSEDTAIYFCARSLAGNAMYWGQGTSVTVSS (서열번호: 1)
Hu IGHV3-23/HJ4 SRDIAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAK----YFDYWGGTLVTVSS (서열번호: 88)
hvH1 SRDIAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYFCARSLAGNAMYWGQGTSVTVSS (서열번호: 3)
hvH2 SRDIAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYFCARSLAGNAMYWGQGTSVTVSS (서열번호: 4)
hvH3 SRDIAKNTLYLQINLSRAEDTAVYYFCARSLAGNAMYWGQGTSVTVSS (서열번호: 5)
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++++
    
```

도면1b

```

          10      20      30      40      50      60
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
Mu B6H12 vH EVQLVESGGDLVLPKPGGSLKLSCAASGFTFSGYGMSWVRQTPDKRLEWVATITSGGTYTYPDSVKGRFTI
Hu IGHV3-48/HJ4 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKLEWVSYISGGSTIYYADSVKGRFTI
hvH4 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMNWVRQAPGKLEWVATITSGGTYIYYADSVKGRFTI
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++++

          70      80      90      100     110
      |....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
Mu B6H12 vH SRDIAKNTLYLQIDSLKSEDTAIYFCARSLAGNAMYWGQGTSVTVSS (서열번호: 1)
Hu IGHV3-48/HJ4 SRDIAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR----YFDYWGGTLVTVSS (서열번호: 89)
hvH4 SRDIAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARSLAGNAMYWGQGTSVTVSS (서열번호: 6)
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++++
    
```

도면1c

```

          10      20      30      40      50      60
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
Mu B6H12 vH EVQLVESGGDLVLPKPGGSLKLSCAASGFTFSGYGMSWVRQTPDKRLEWVATITSGGTYTYPDSVKGRFTI
Hu IGHV3-66/HJ4 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKLEWVSVIYSGGS-TYYADSVKGRFTI
hvH5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMNWVRQAPGKLEWVATITSGGTYTYPADSVKGRFTI
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++++

          70      80      90      100     110
      |....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
Mu B6H12 vH SRDIAKNTLYLQIDSLKSEDTAIYFCARSLAGNAMYWGQGTSVTVSS (서열번호: 1)
Hu IGHV3-66/HJ4 SRDIAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR----YFDYWGGTLVTVSS (서열번호: 90)
hvH5 SRDIAKNTLYLQINLSRAEDTAVYYFCARSLAGNAMYWGQGTSVTVSS (서열번호: 7)
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++++
    
```

도면1d

```

          10      20      30      40      50      60
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
Mu B6H12 vH EVQLVESGGDLVLPKPGGSLKLSCAASGFTFSGYGMSWVRQTPDKRLEWVATITSGGTYTYPDSVKGRFTI
Hu IGHV3-74/HJ4 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKLVVSRINSDGSSYADSVKGRFTI
hvH6 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLVVWVATITSGGTYTYSYADSVKGRFTI
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++++

          70      80      90      100     110
      |....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
Mu B6H12 vH SRDIAKNTLYLQIDSLKSEDTAIYFCARSLAGNAMYWGQGTSVTVSS (서열번호: 1)
Hu IGHV3-74/HJ4 SRDIAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR----YFDYWGGTLVTVSS (서열번호: 91)
hvH6 SRDIAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYFCARSLAGNAMYWGQGTSVTVSS (서열번호: 8)
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++++
    
```

도면1e

```

10      20      30      40      50      60
hvH1    EVQLLES...
hvH2    EVQLLES...
hvH3    EVQLLES...
hvH4    EVQLVES...
hvH5    EVQLVES...
hvH6    EVQLVES...
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++++

70      80      90      100     110
hvH1    SRDNSKNTLYLQMN... (서열번호: 3)
hvH2    SRDNSKNTLYLQMN... (서열번호: 4)
hvH3    SRDNSKNTLYLQMN... (서열번호: 5)
hvH4    SRDNAKNSLYLQMN... (서열번호: 6)
hvH5    SRDNSKNTLYLQMN... (서열번호: 7)
hvH6    SRDNAKNTLYLQMN... (서열번호: 8)
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++++

```

도면1f

```

10      20      30      40      50      60
hB6H12.3 vH (hvH1) EVQLLES...
Mu B6H12 vH    EVQLVES...
Ab47 vH        EVQLVES...
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++++

70      80      90      100     110
hB6H12.3 vH (hvH1) SRDNSKNTLYLQMN... (서열번호: 3)
Mu B6H12 vH    SRDNAKNTLYLQIDSLK... (서열번호: 1)
Ab47 vH        SRDNAKNSLYLQMN... (서열번호: 2)
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++++

```

도면1g

```

10      20      30      40      50      60      70
Mu B6H12 vK    DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQTISDYLHWYQQKSHESPRLLIKFASQ...
Hu IGKV6-21/KJ2 EIVLTQSPDFQSVTPPEKVVITPCRASQISGSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQ...
hvK1           EIVMTQSPDFQSVTPPEKVVITPCRASQTIISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQ...
hvK2           EIVMTQSPDFQSVTPPEKVVITPCRASQTIISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQ...
hvK3           EIVMTQSPDFQSVTPPEKVVITPCRASQTIISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQ...
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++

80      90      100
Mu B6H12 vK    FTLSINSVEPEDVGVYVCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKR (서열번호: 9)
Hu IGKV6-21/KJ2 FTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLP-TFGQGTKLEIKR (서열번호: 92)
hvK1           FTLTINSLEAEDAATYYCQNGHGFPRTFGQGTKLEIKR (서열번호: 11)
hvK2           FTLTINSLEAEDAATYYCQNGHGFPRTFGQGTKLEIKR (서열번호: 12)
hvK3           FTLTINSLEAEDAATYYCQNGHGFPRTFGQGTKLEIKR (서열번호: 13)
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++++

```

도면1h

```

                10      20      30      40      50      60      70
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mu B6H12 vK      DIVMTQSPATLSVTPGDRVLSLSCRASQTISDYLHWYQQKSHESPRLLIKFASQSIGIPSRFSGSGSGSD
Hu IGKV1-27/KJ2  DIQMTQSPSSLSASVGDRTVLTTCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGSD
hvK4             DIQMTQSPSSLSASVGDRTVLTTCRASQTISNYLAWYQQKPGKVPKLLIKFASTLQSGVPSRFSGSGSGSD
Kabat CDRs      *****
IMGT CDRs      ++++++          +++

                80      90      100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mu B6H12 vK      FTLSINSVEPEDVGVIYCYQNGHGFPRTFGGQTKLEIKR (서열번호: 9)
Hu IGKV1-27/KJ2  FTLTISLQPEDVATYYCQKYNAP-TFGQGTKEIKR (서열번호: 93)
hvK4             FTLTISLQPEDVATYYCQNGHGFPRTFGQGTKEIKR (서열번호: 14)
Kabat CDRs      *****
IMGT CDRs      ++++++++
    
```

도면1i

```

                10      20      30      40      50      60      70
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
hvK1             EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLTTCRASQTISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQSIGVPSRFSGSGSGSD
hvK2             EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLTTCRASQTISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQSIGVPSRFSGSGSGSD
hvK3             EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLTTCRASQTISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQSIGVPSRFSGSGSGSD
hvK4             DIQMTQSPSSLSASVGDRTVLTTCRASQTISNYLAWYQQKPGKVPKLLIKFASTLQSGVPSRFSGSGSGSD
Kabat CDRs      *****
IMGT CDRs      ++++++          +++

                80      90      100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
hvK1             FTLTINSLEAEDAAYCYQNGHGFPRTFGQGTKEIKR (서열번호: 11)
hvK2             FTLTINSLEAEDAATYYCQNGHGFPRTFGQGTKEIKR (서열번호: 12)
hvK3             FTLTINSLEAEDAATYYCQNGHGFPRTFGQGTKEIKR (서열번호: 13)
hvK4             FTLTISLQPEDVATYYCQNGHGFPRTFGQGTKEIKR (서열번호: 14)
Kabat CDRs      *****
IMGT CDRs      ++++++++
    
```

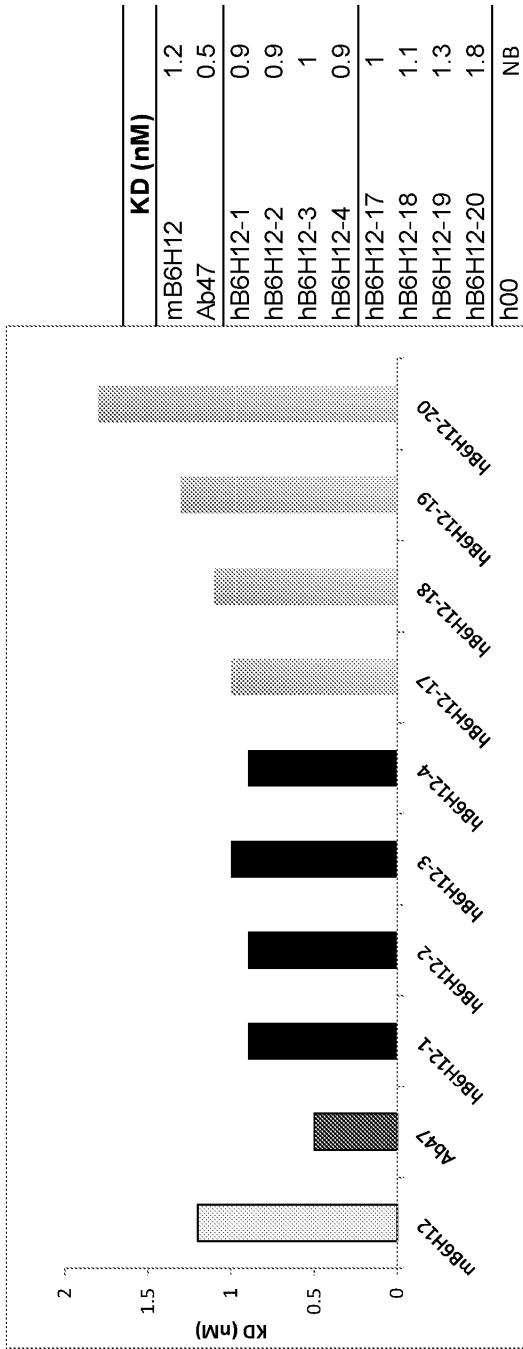
도면1j

```

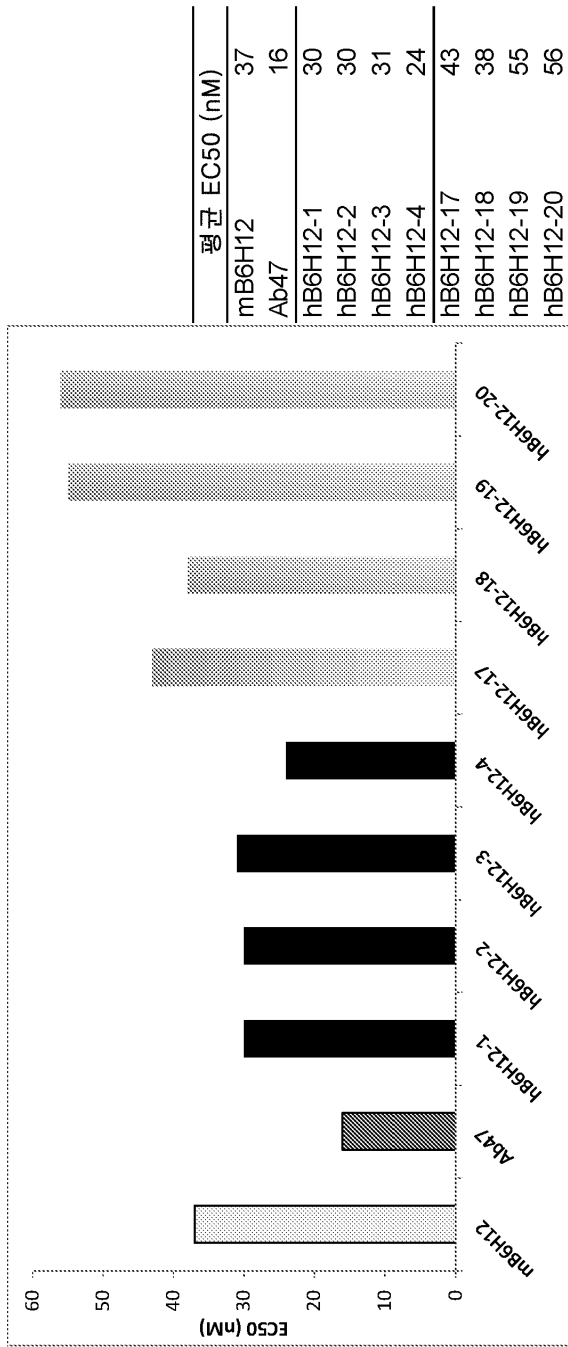
                10      20      30      40      50      60      70
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
hB6H12.3 vK (hvK3) EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLTTCRASQTISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQSIGVPSRFSGSGSGSD
Mu B6H12 vK      DIVMTQSPATLSVTPGDRVLSLSCRASQTISDYLHWYQQKSHESPRLLIKFASQSIGIPSRFSGSGSGSD
Ab47 vK         EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTISDYLHWYQQKPGQAPRLLIKFASQSIGIPARFSGSGSGSD
Kabat CDRs      *****
IMGT CDRs      ++++++          +++

                80      90      100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
hB6H12.3 vK (hvK3) FTLTINSLEAEDAATYYCQNGHGFPRTFGQGTKEIKR (서열번호: 13)
Mu B6H12 vK      FTLSINSVEPEDVGVIYCYQNGHGFPRTFGGQTKLEIKR (서열번호: 9)
Ab47 vK         FTLTISLEPEDFAVIYCYQNGHGFPRTFGQGTKEIKR (서열번호: 10)
Kabat CDRs      *****
IMGT CDRs      ++++++++
    
```

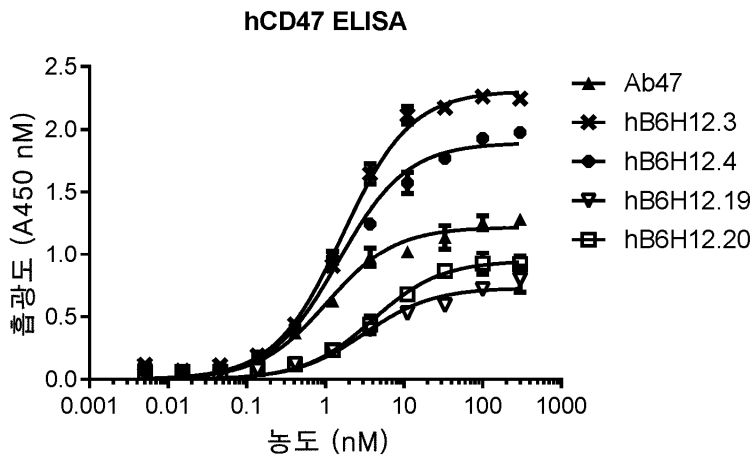
도면2a



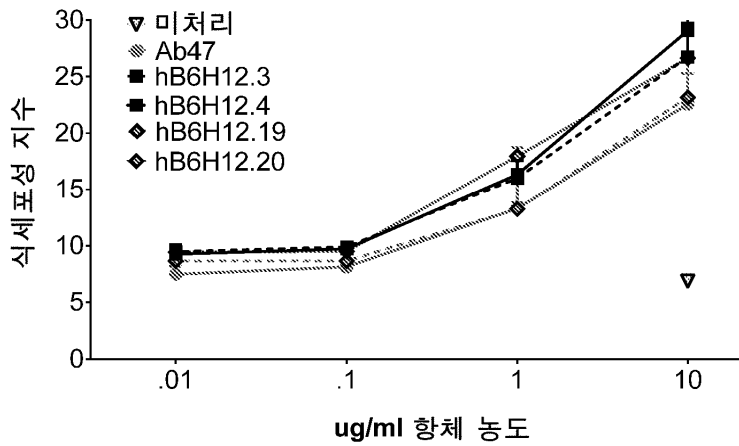
도면2b



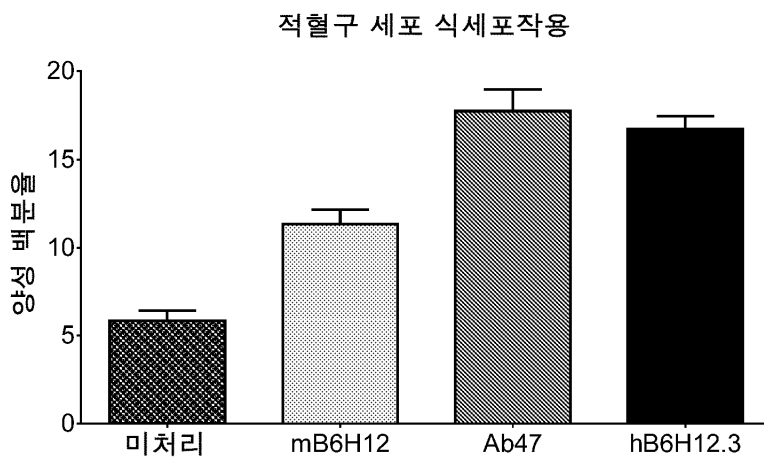
도면2c



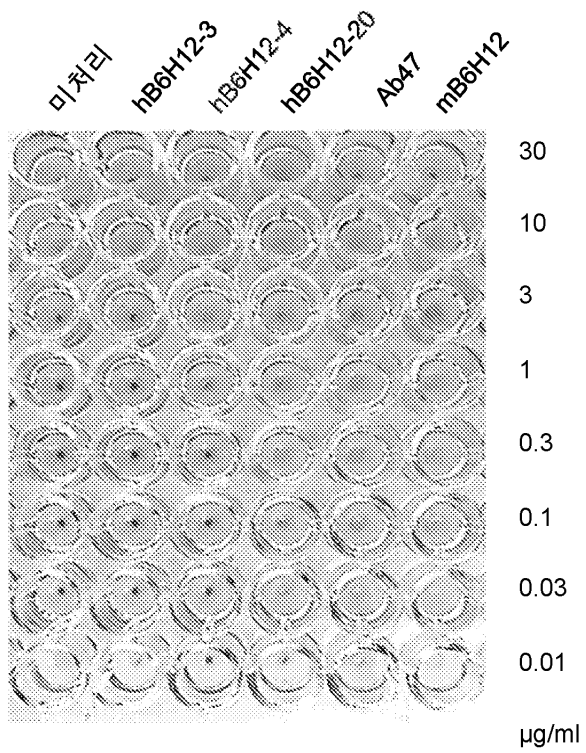
도면3a



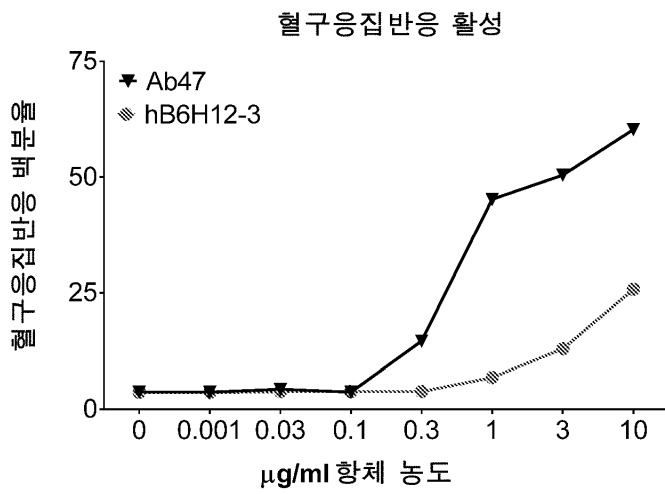
도면3b



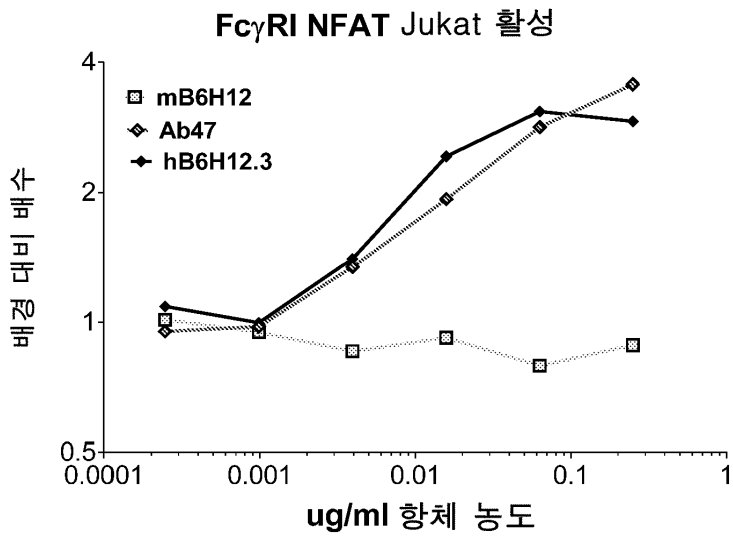
도면4a



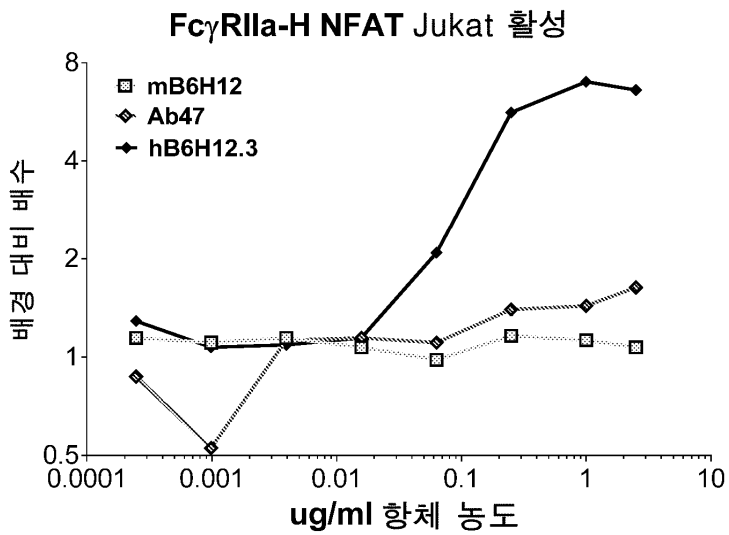
도면4b



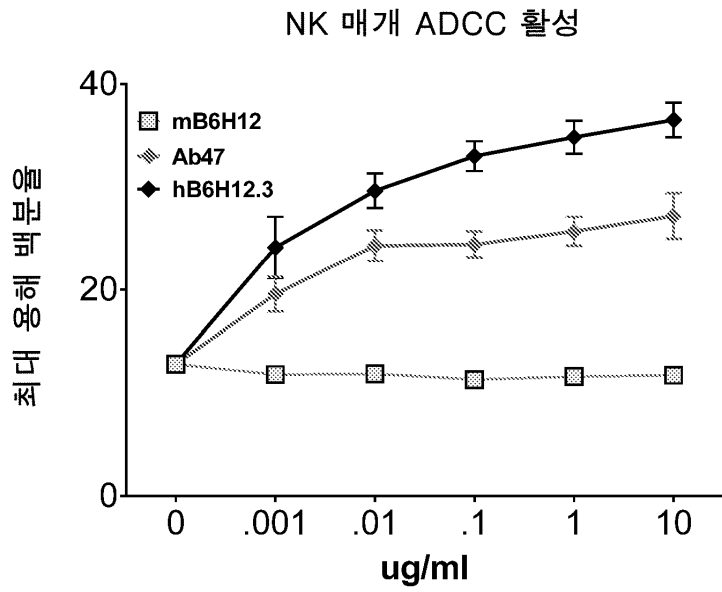
도면5a



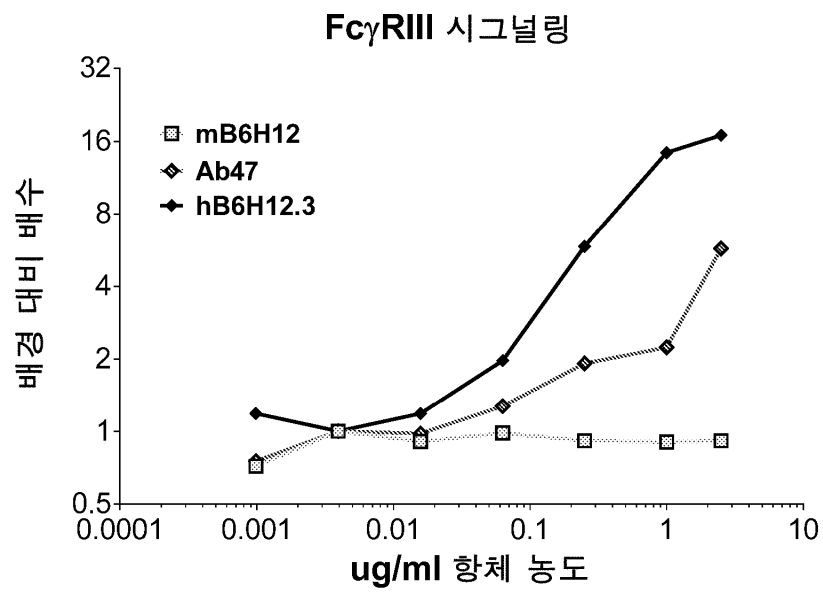
도면5b



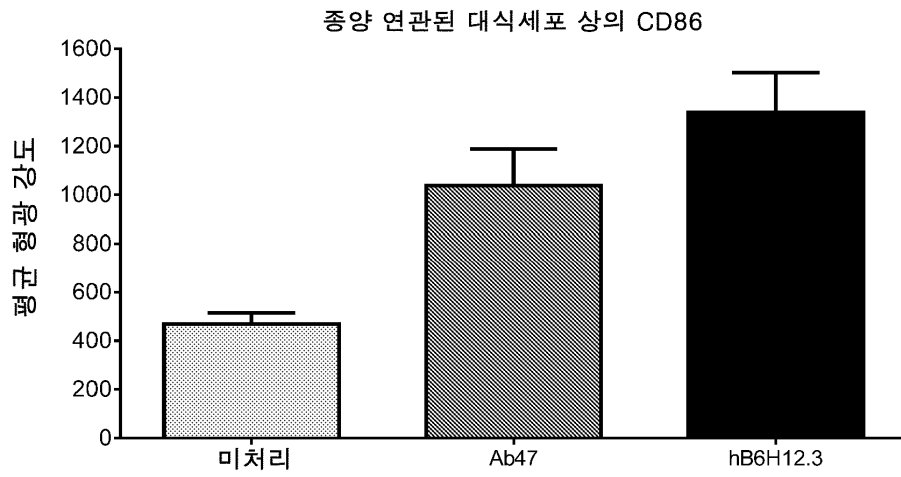
도면6a



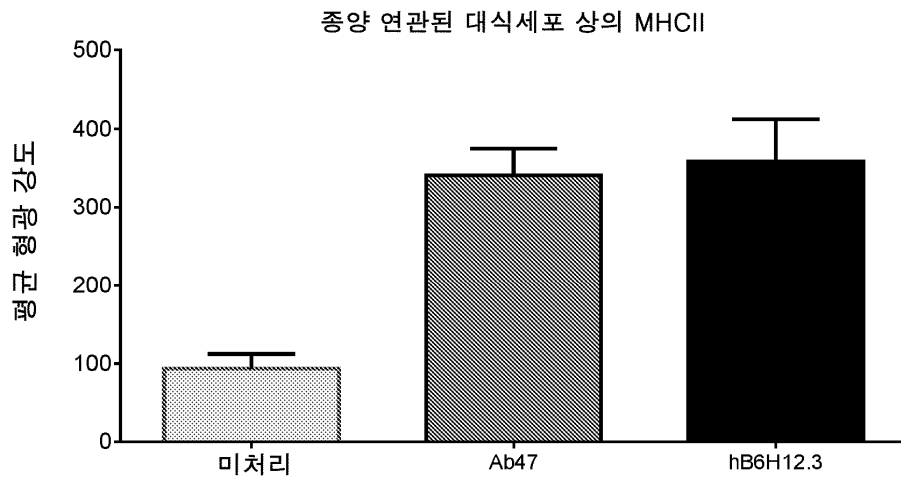
도면6b



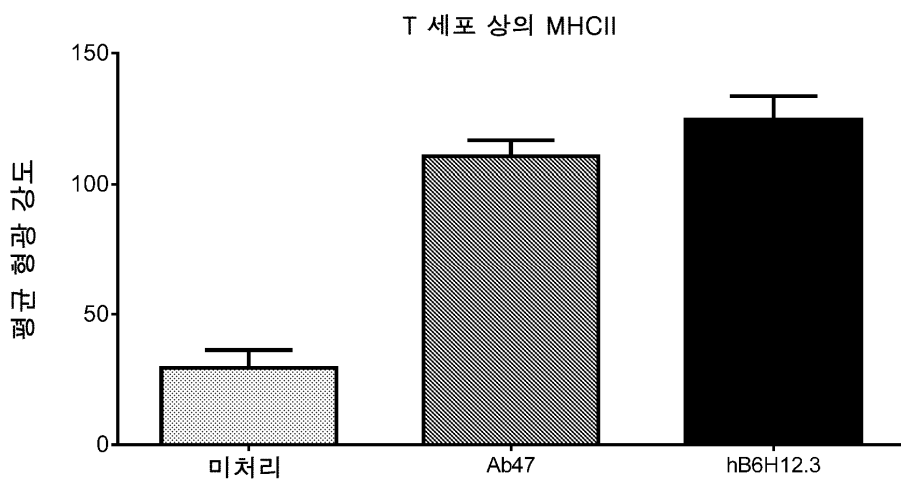
도면7a



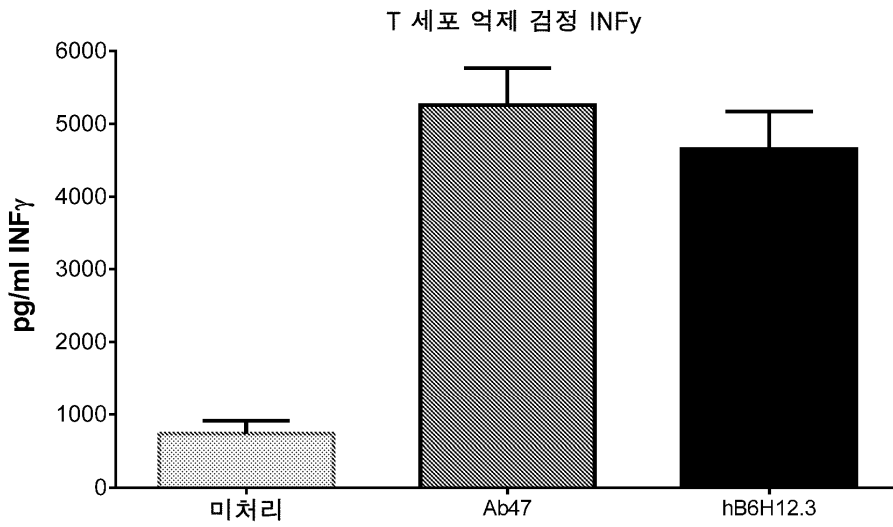
도면7b



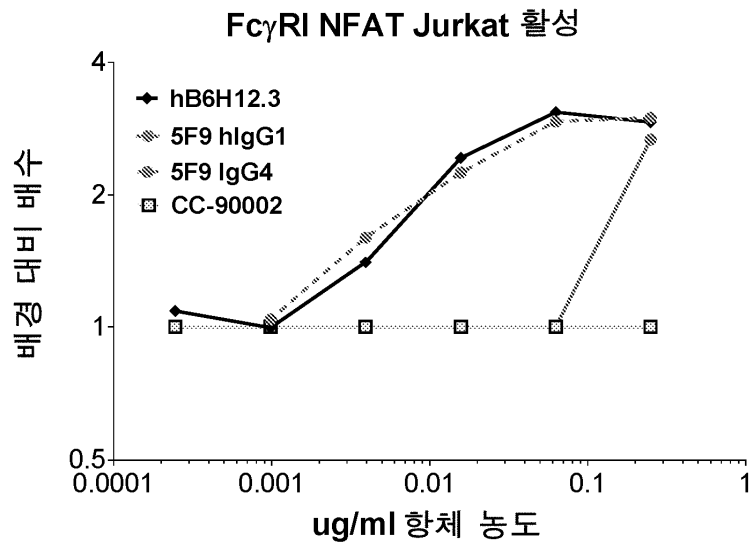
도면7c



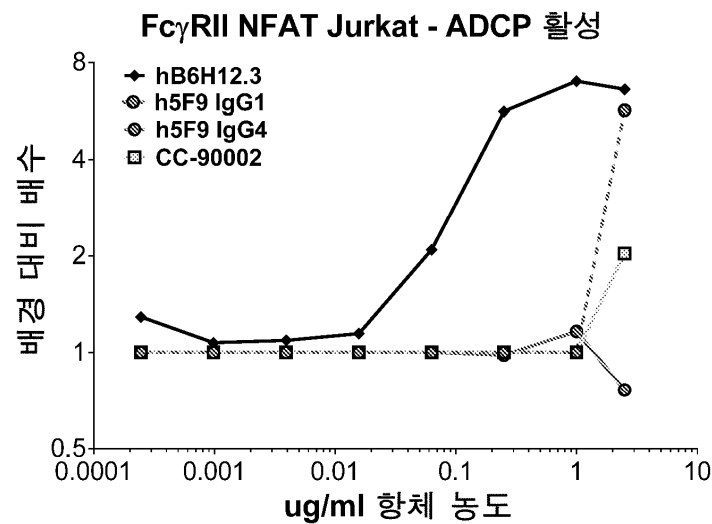
도면7d



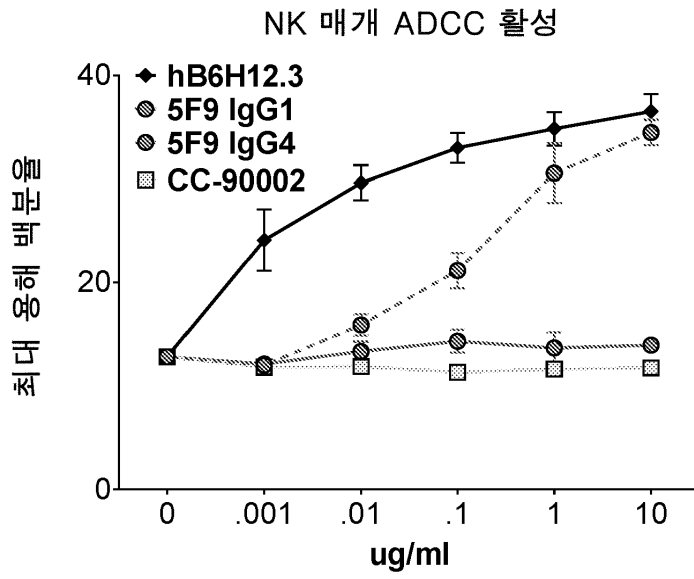
도면8a



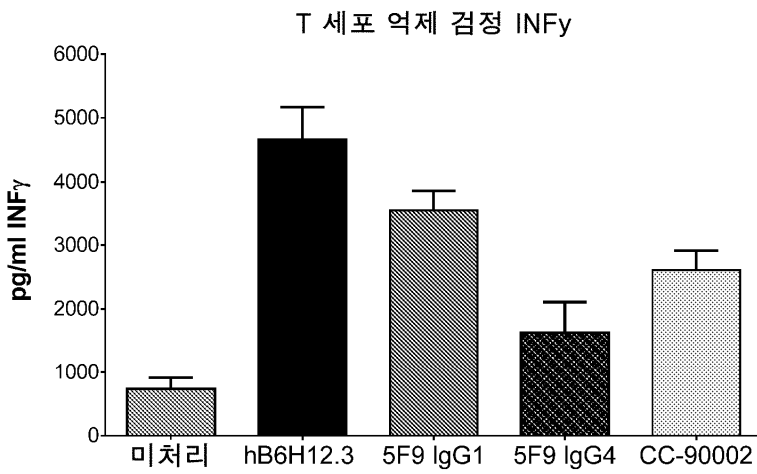
도면8b



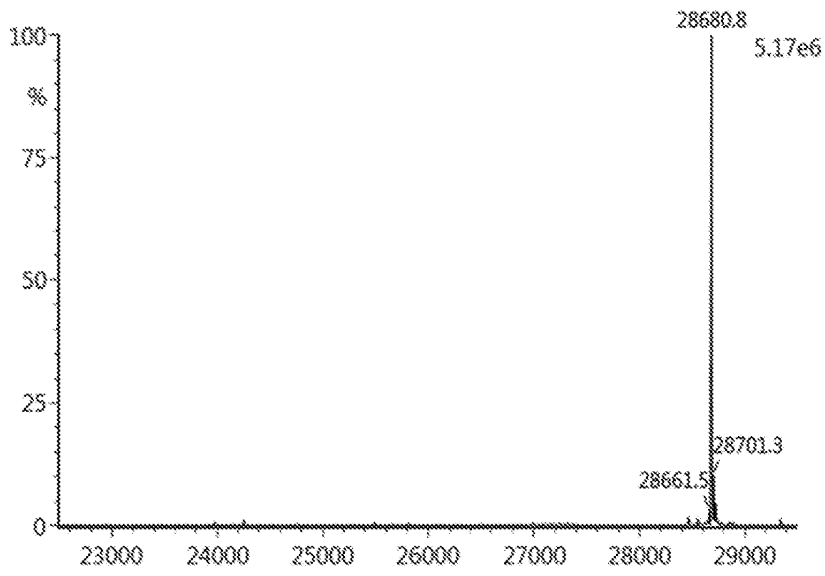
도면8c



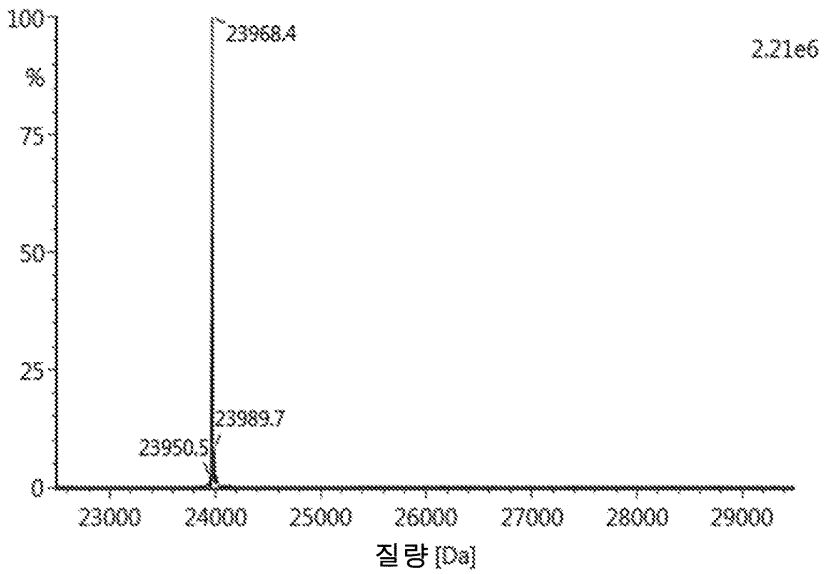
도면8d



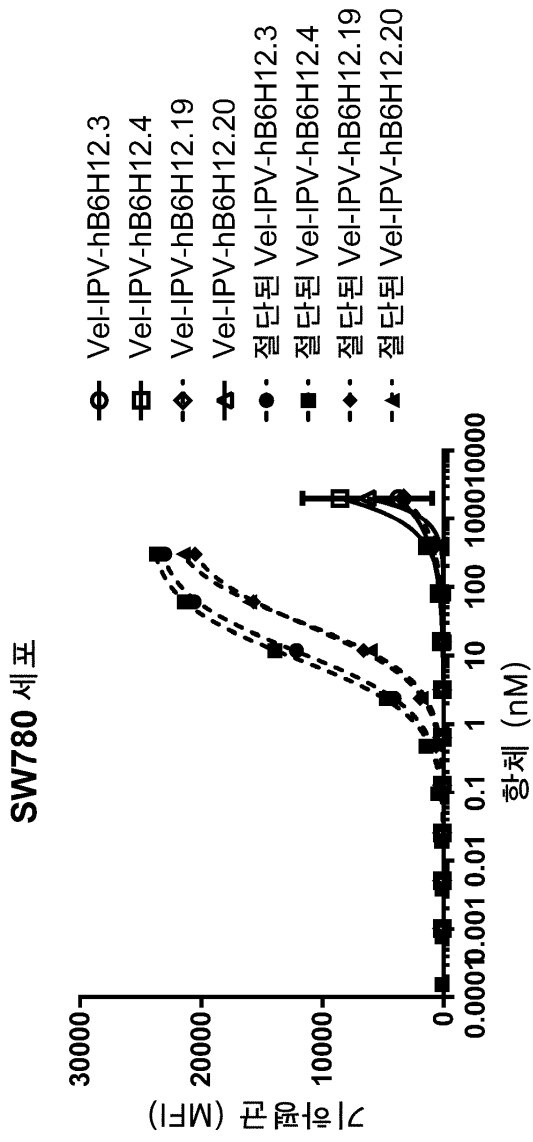
도면9a



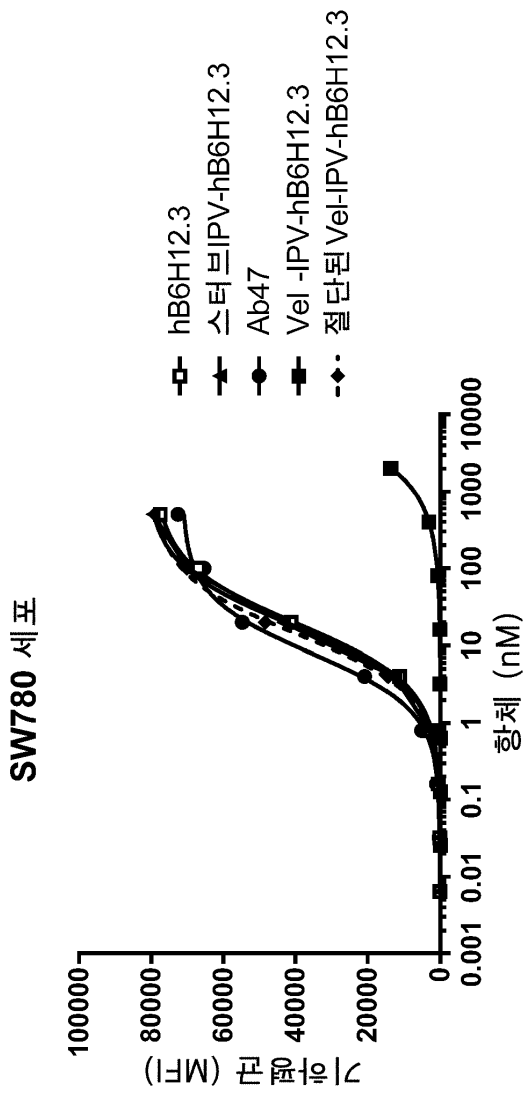
도면9b



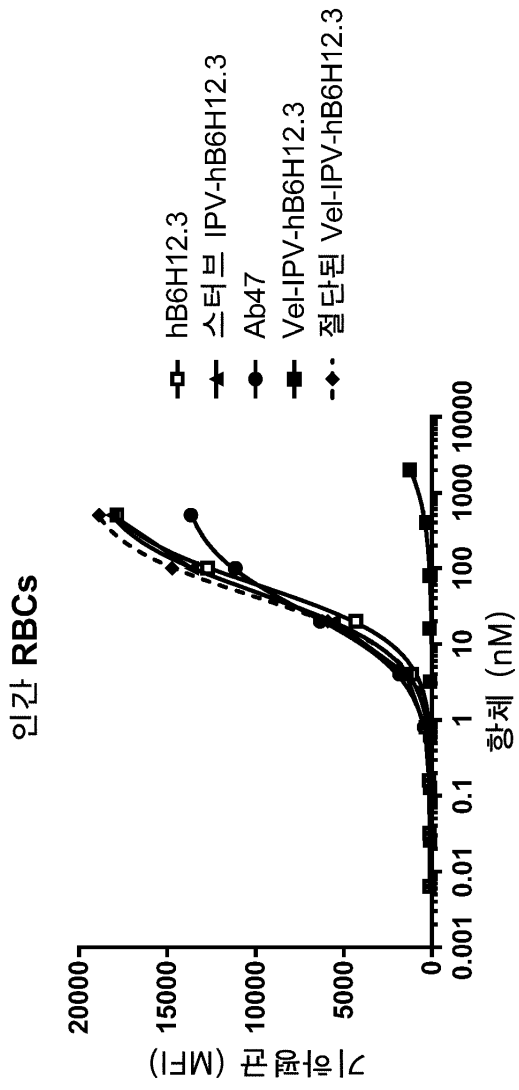
도면10



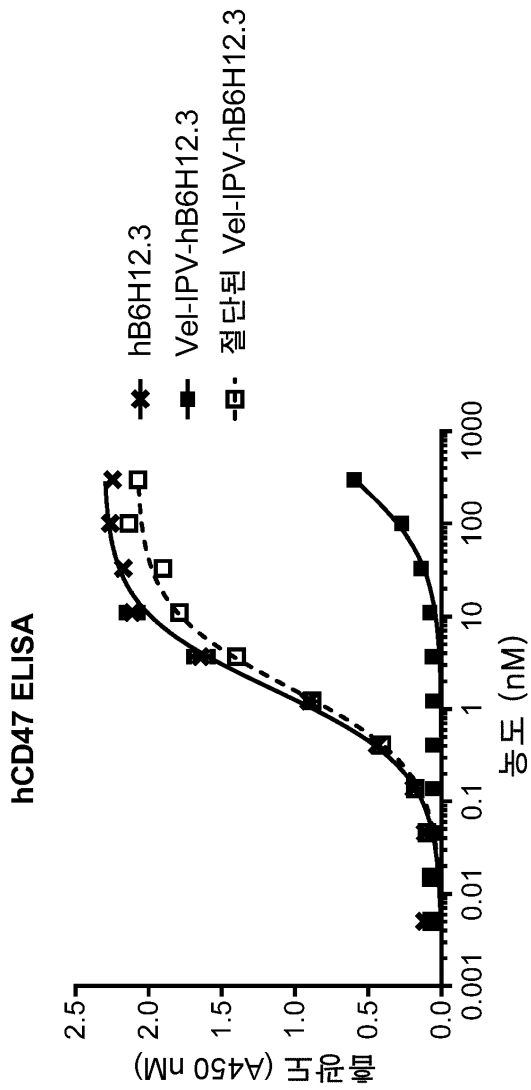
도면11



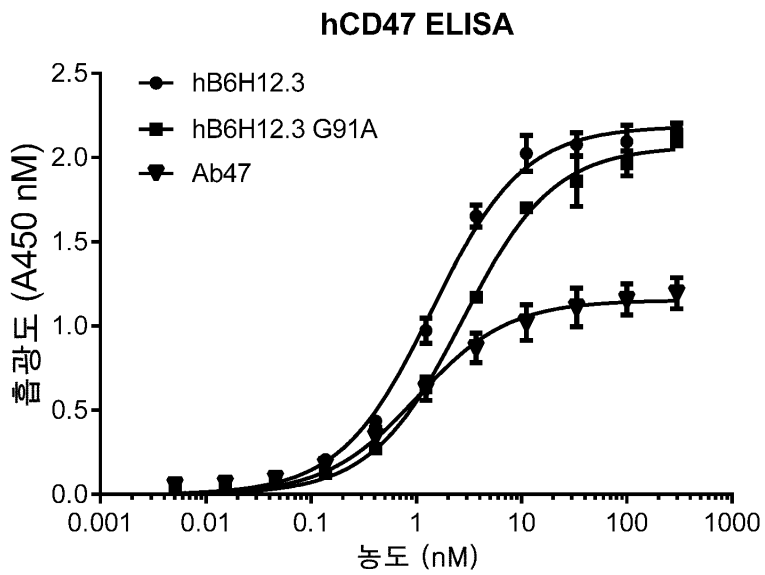
도면12



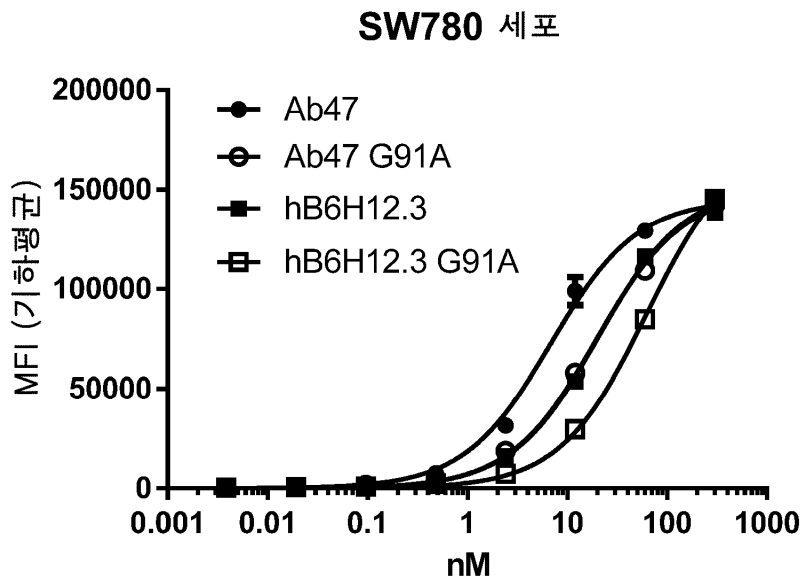
도면13



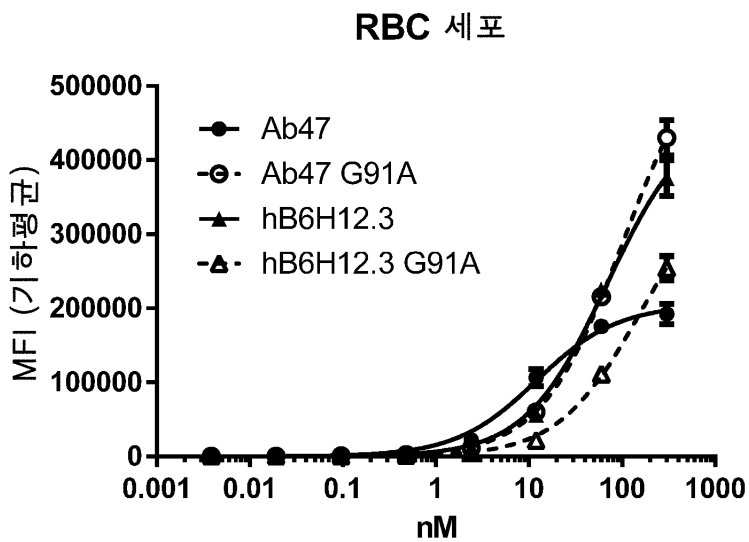
도면14



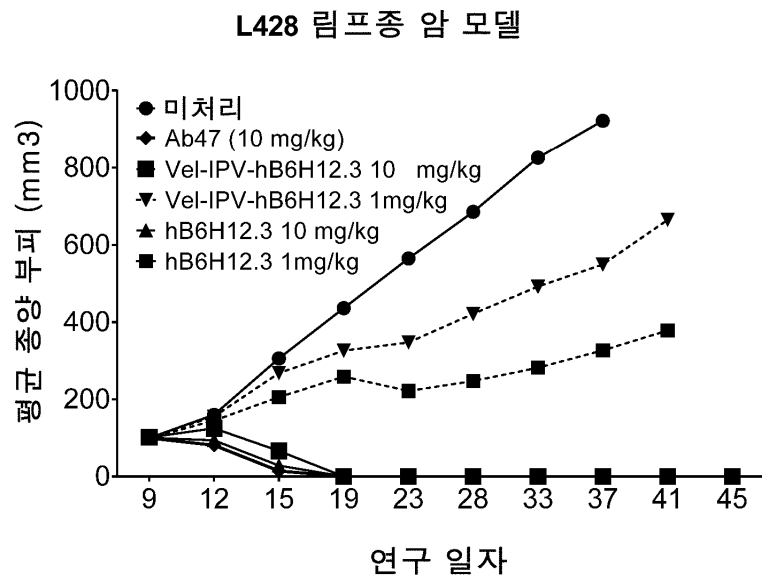
도면15



도면16

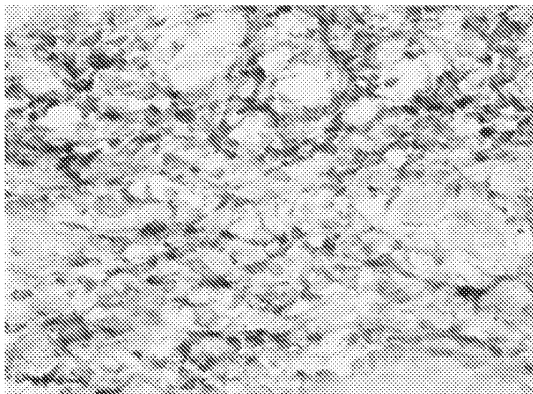


도면17a



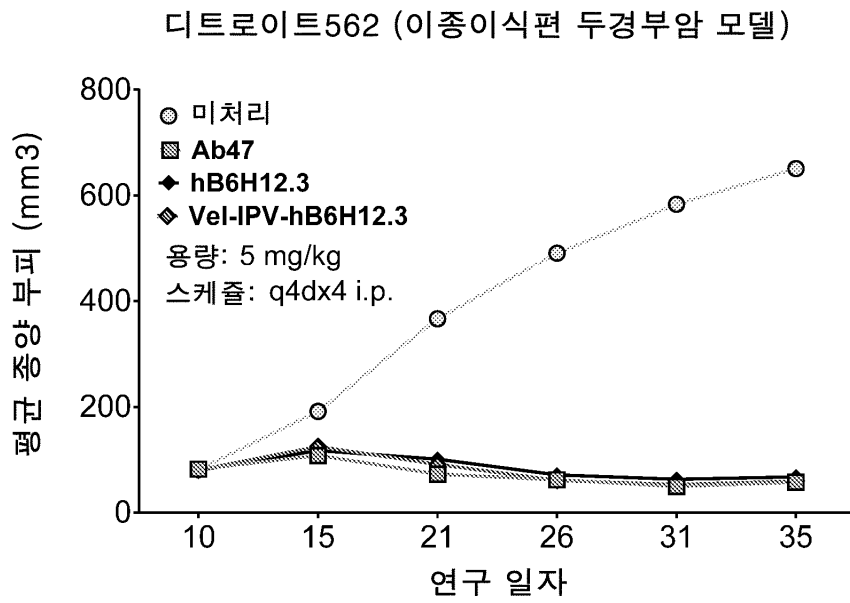
도면17b

L-428



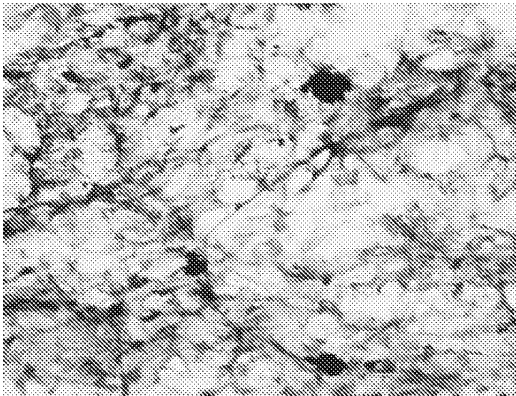
F4/80 마우스 대식세포

도면18a



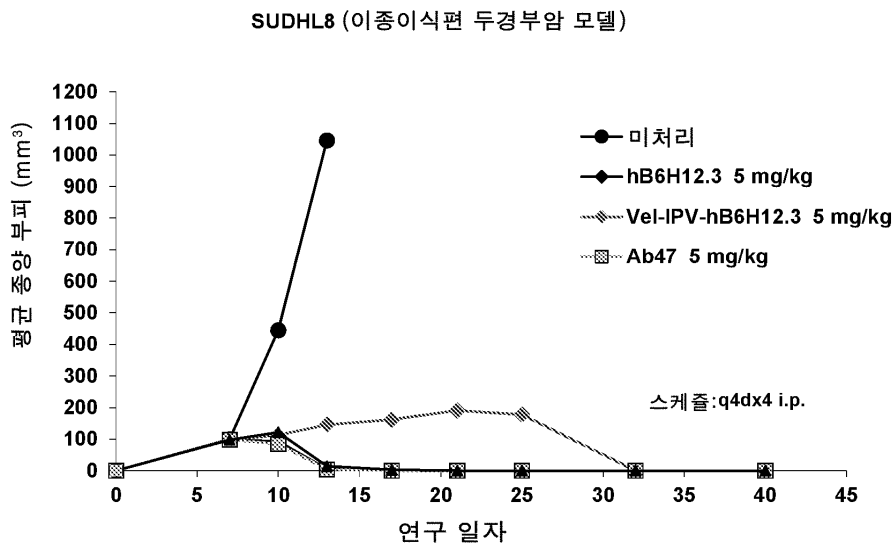
도면18b

디트로이트 562

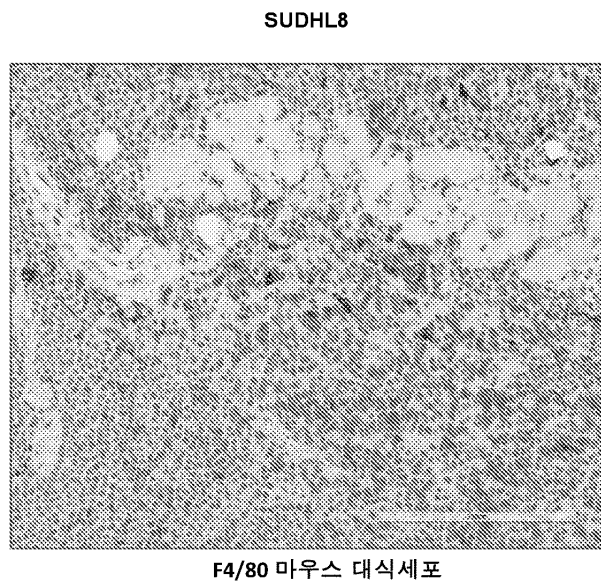


F4/80 마우스 대식세포

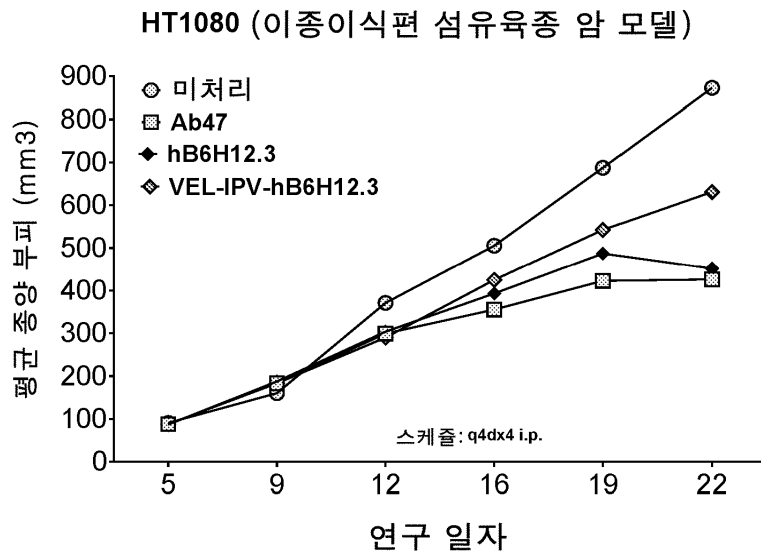
도면18c



도면18d

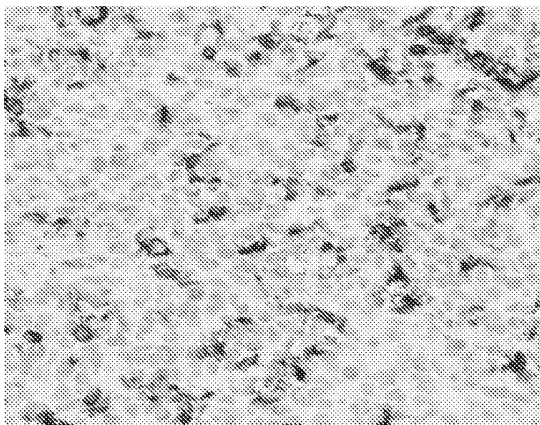


도면19a



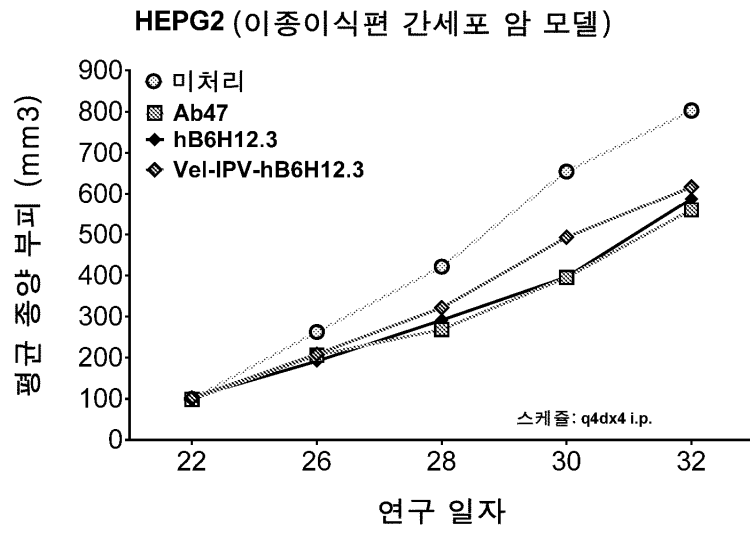
도면19b

HT1080



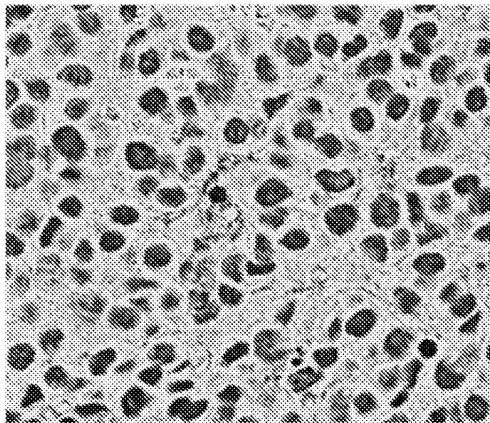
F4/80 마우스 대식세포

도면19c



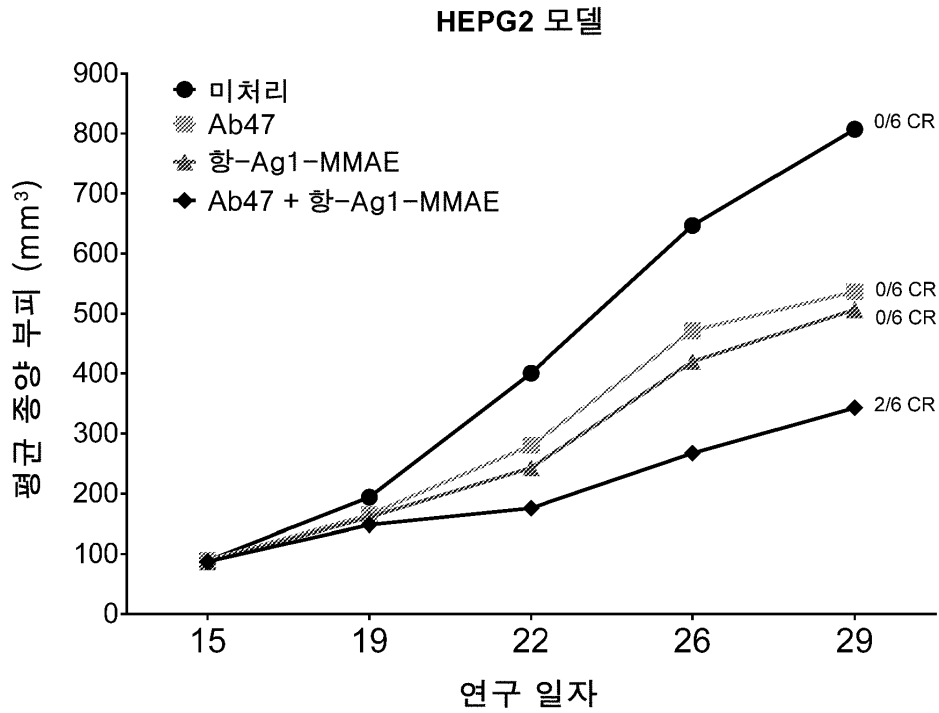
도면19d

**HepG2**

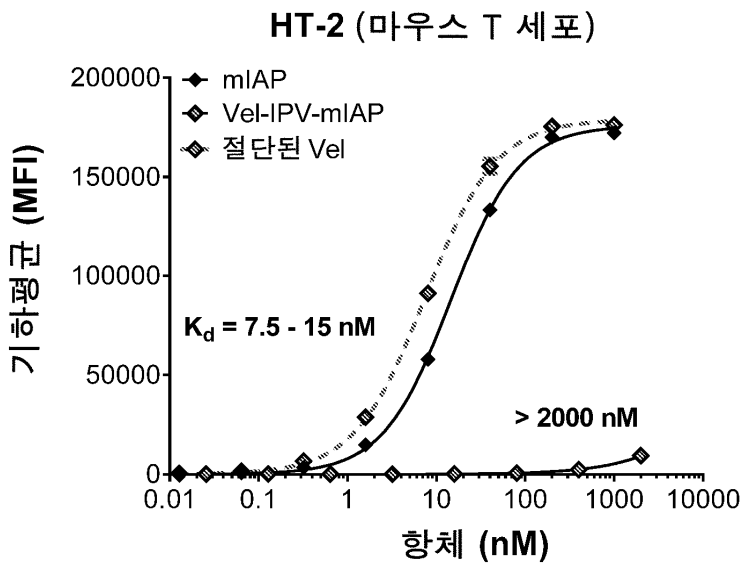


F4/80 마우스 대식세포

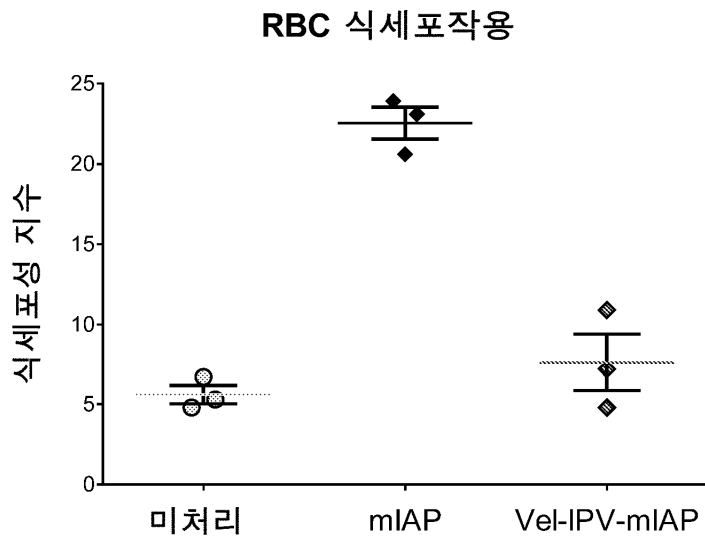
도면20



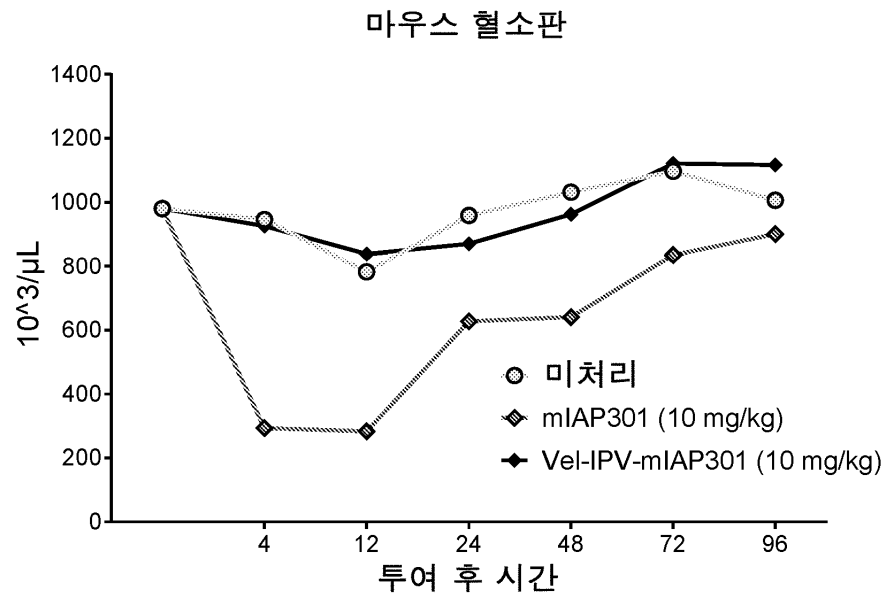
도면21a



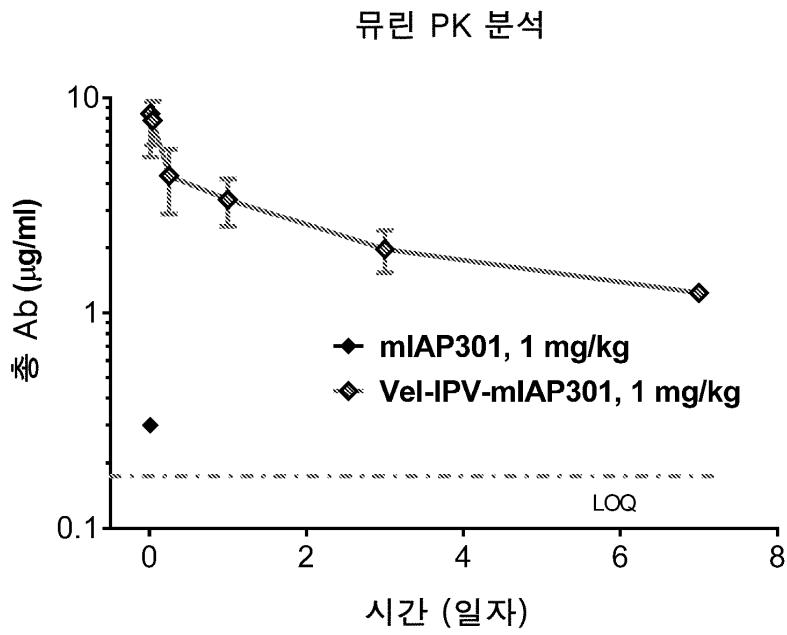
도면21b



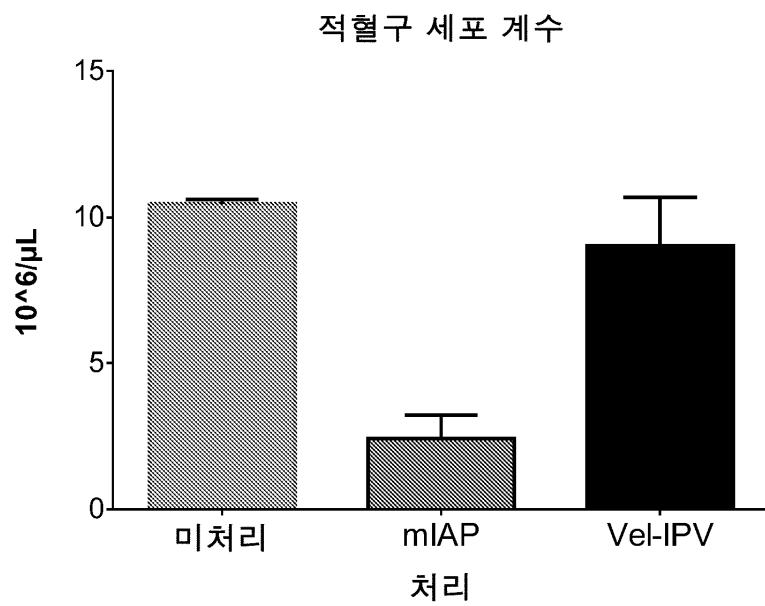
도면22a



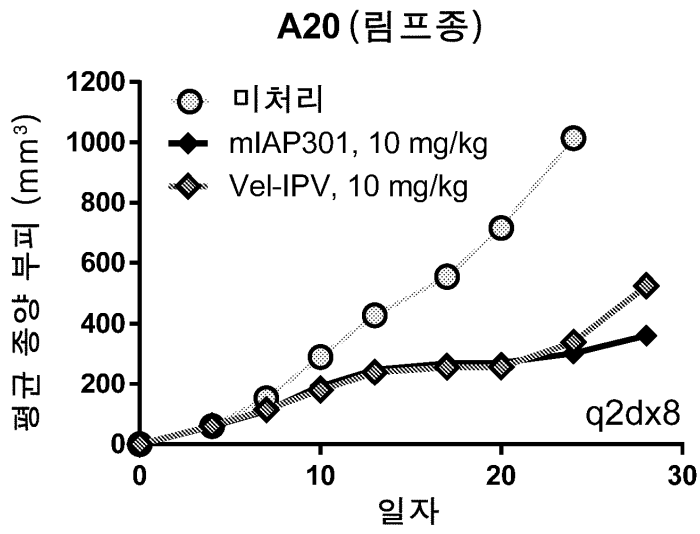
도면22b



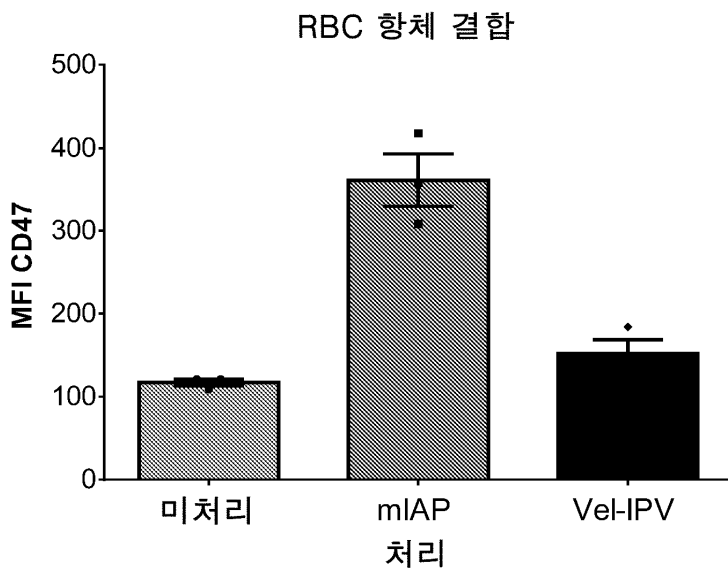
도면23a



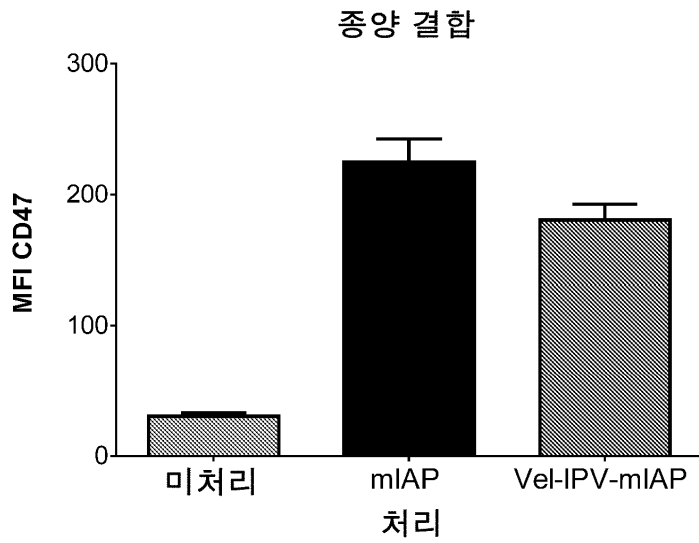
도면23b



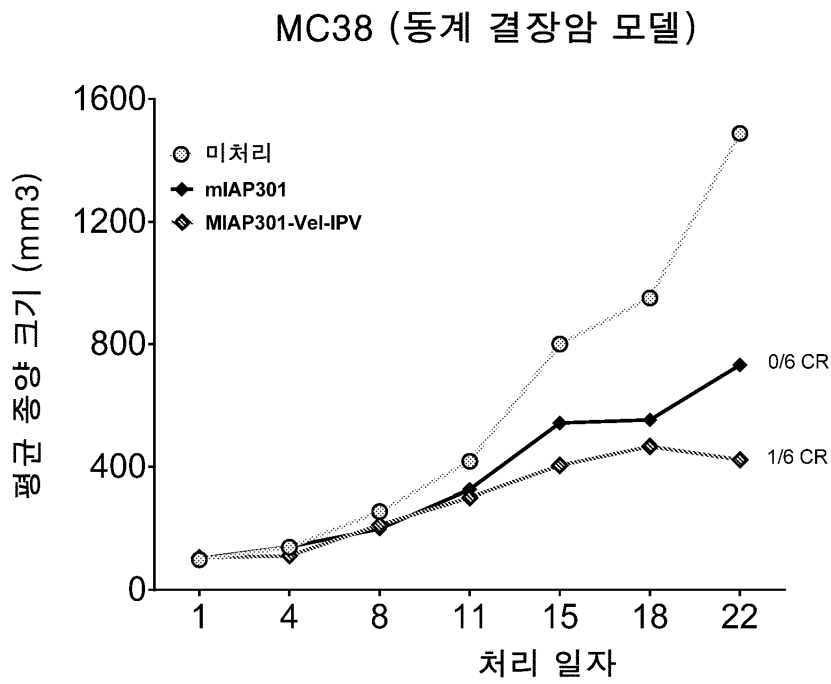
도면23c



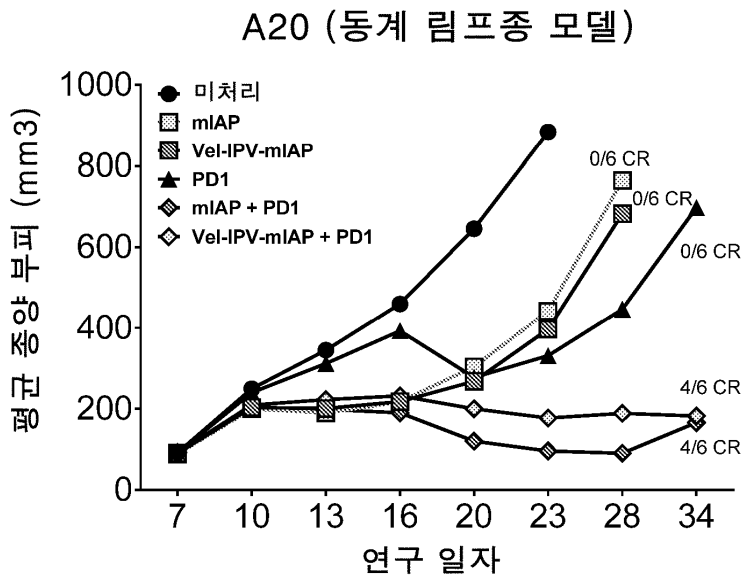
도면23d



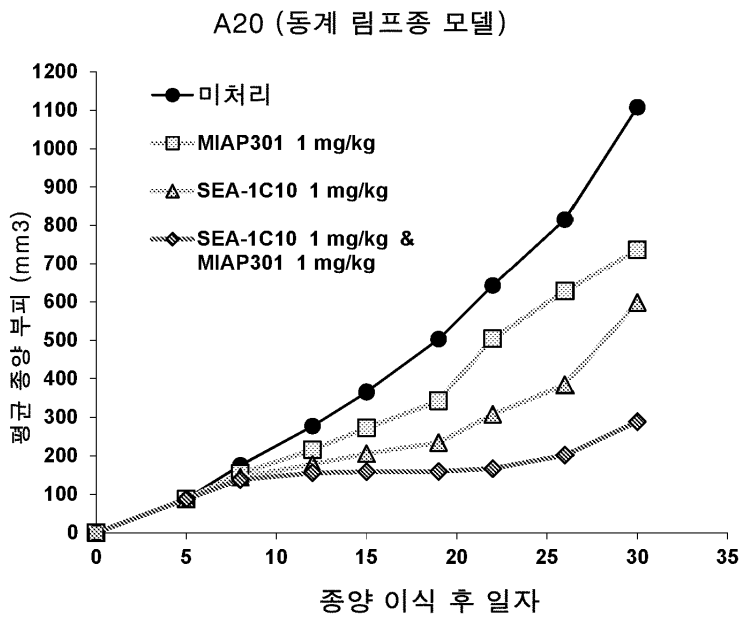
도면24



도면25a



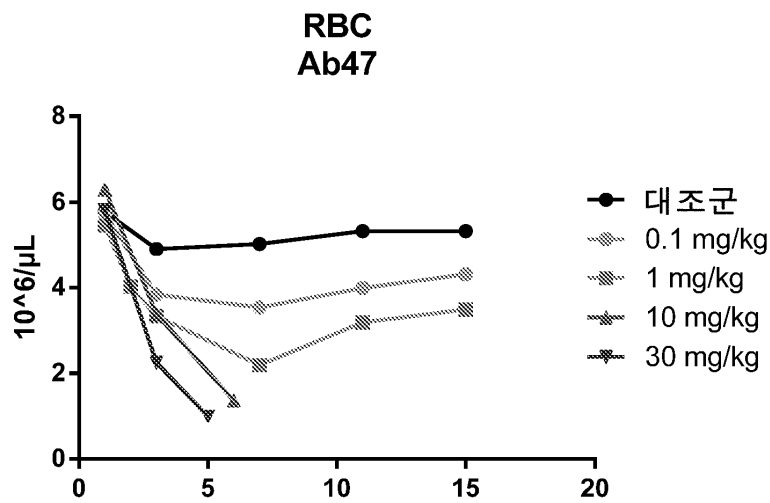
도면25b



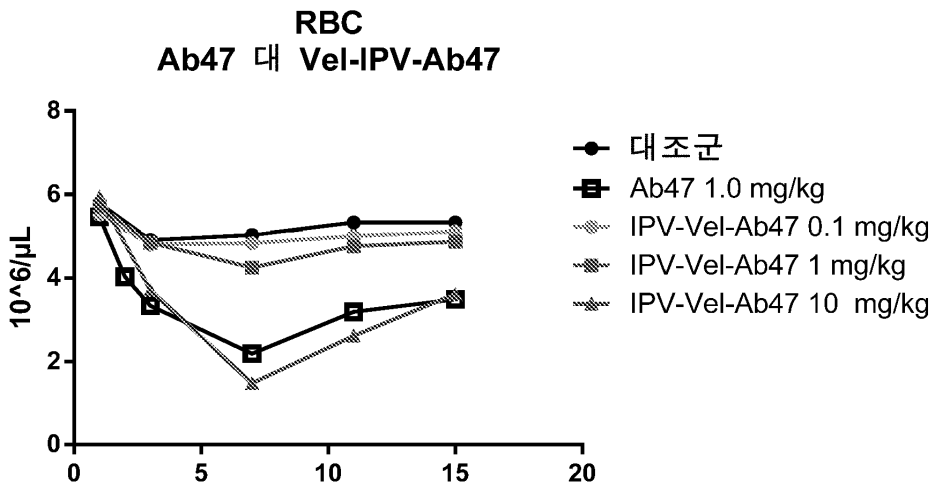
도면26



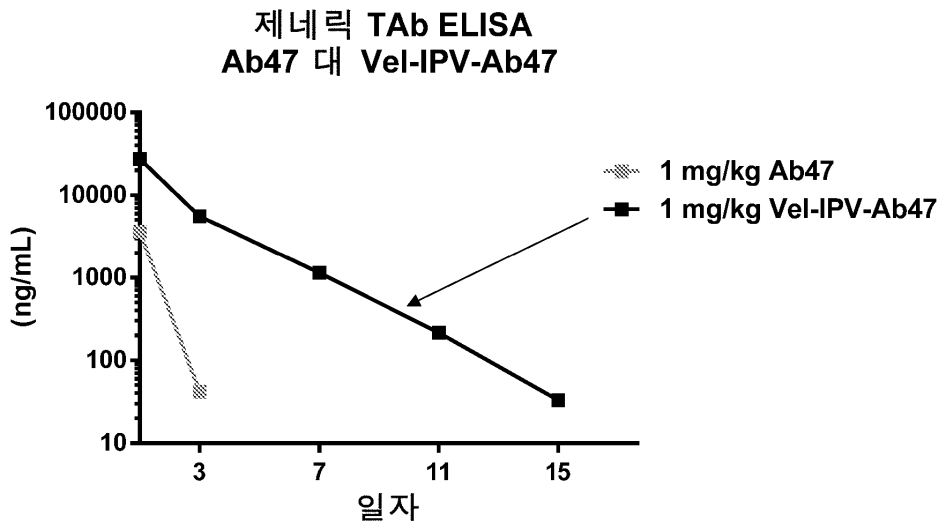
도면27a



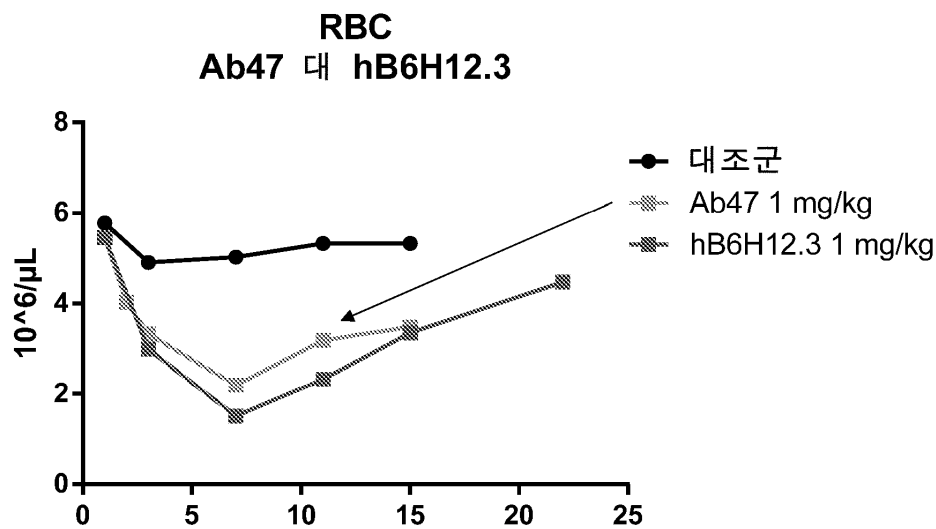
도면27b



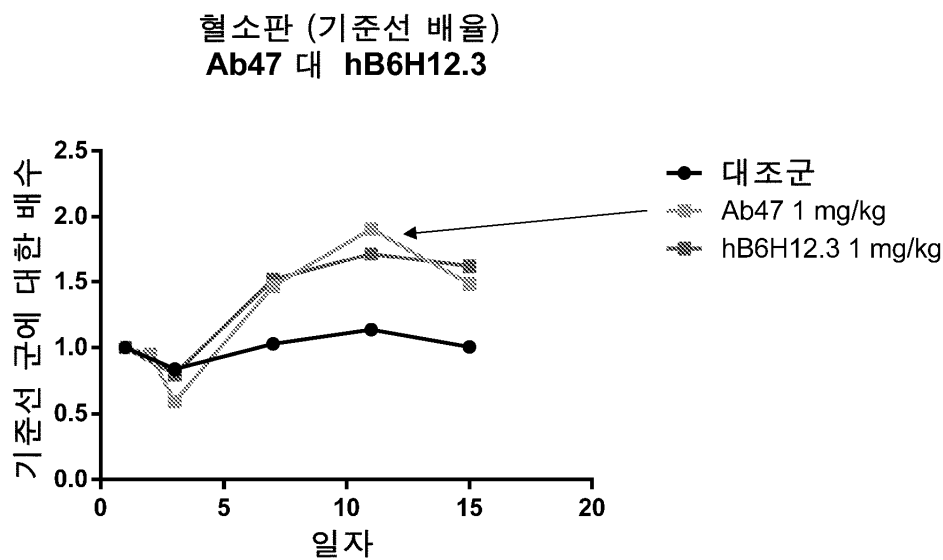
도면28



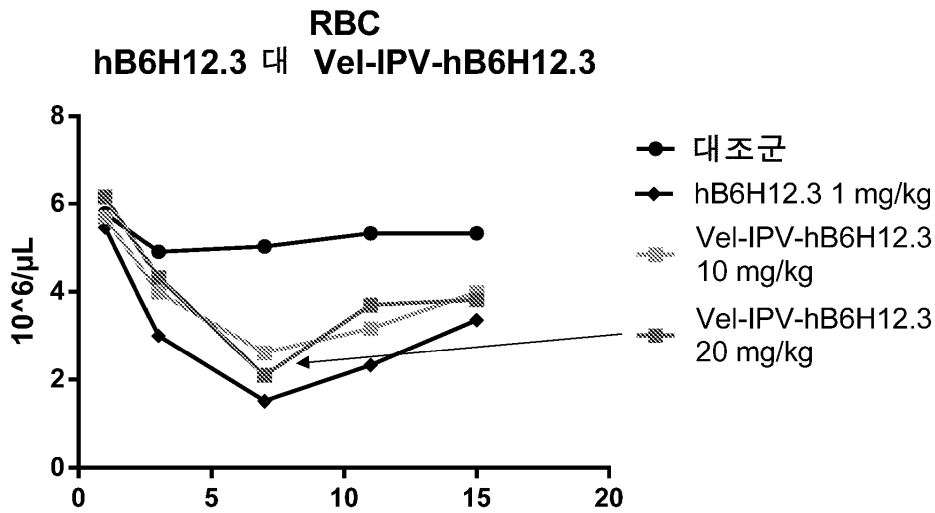
도면29



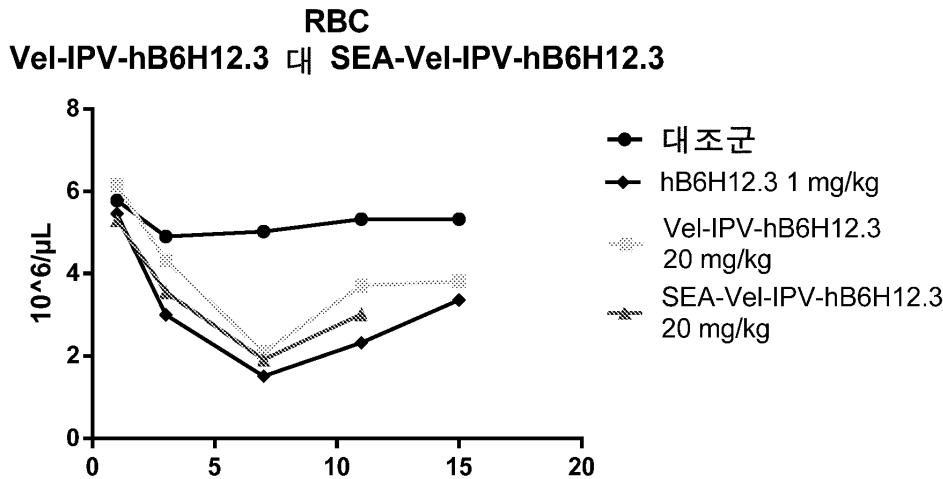
도면30



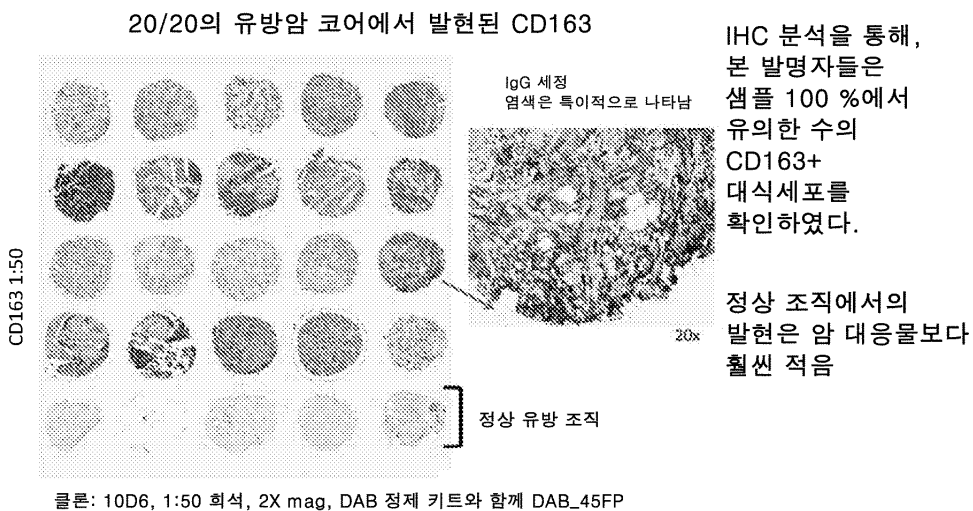
도면31



도면32



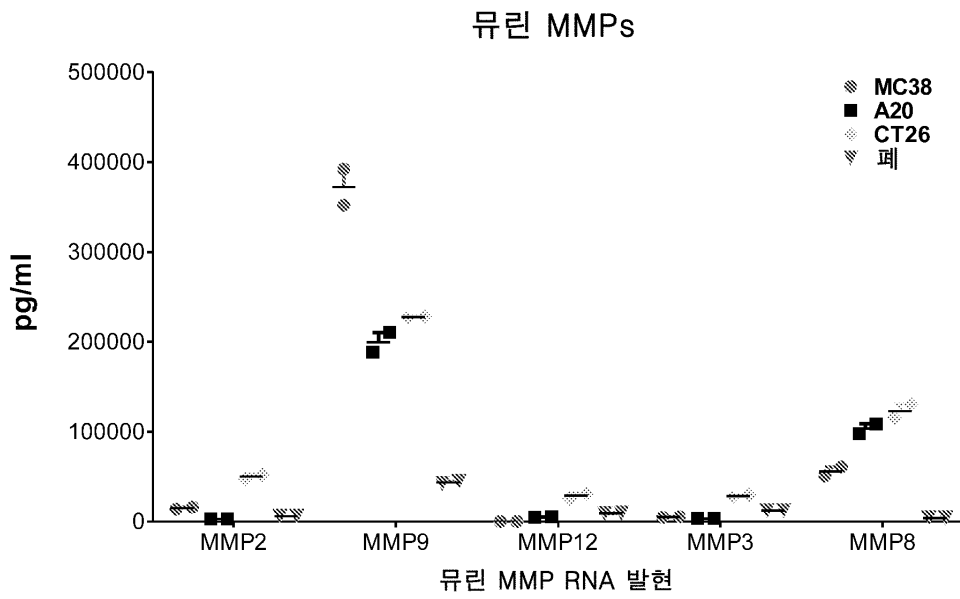
도면33



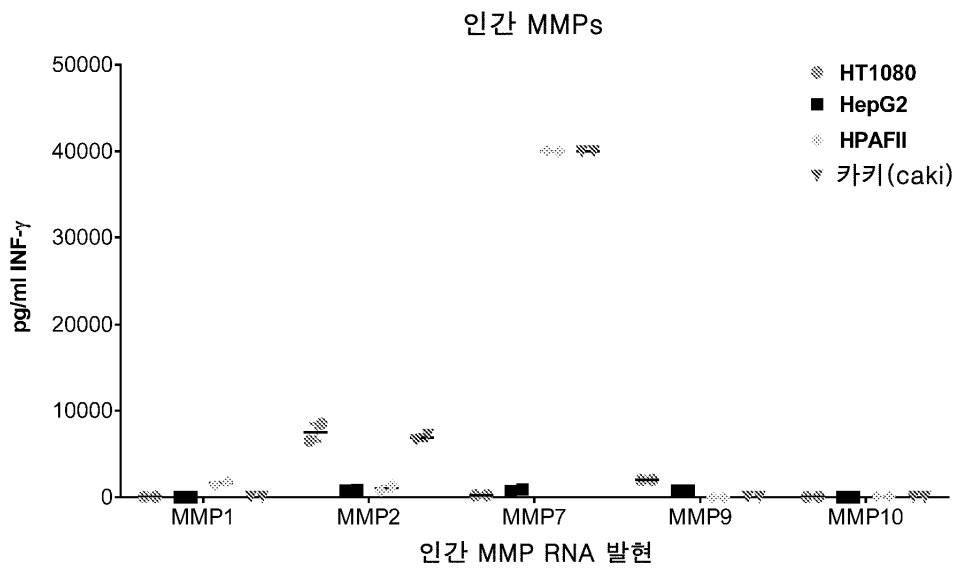
도면34

M11 CC	<p style="text-align: center;">MMP2 서열</p> <p>경쇄 -LEIRAAFLRQRTALRTEVAELEQEVQRLENEVSQYETRYSGGGGGLG*VRGGGGGS (서열번호: 47)                  중쇄 -LEIEAAFLERENTALETRVAELRQRVQRARNRVSQYRTRYSGGGGGLG*VRGGGGGS (서열번호: 46)</p>
M15 CC	<p style="text-align: center;">MMP2 서열</p> <p>경쇄 -LEIEAAFLERENTALETEVAELEQEVQRLENEVSQYETRYSGGGGGLG*VRGGGGGS (서열번호: 49)                  중쇄 -LEIRAAFLRRRNTALRTRVAELRQRVQRARNRVSQYETRYSGGGGGLG*VRGGGGGS (서열번호: 48)</p>
Vel CC	<p style="text-align: center;">MMP2 서열 (IPV)</p> <p>경쇄 -GASTTVAQLEEKVKTILRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGSIPIVS*LRSG (서열번호: 51)                  중쇄 -GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPIVS*LRSG (서열번호: 50)</p>

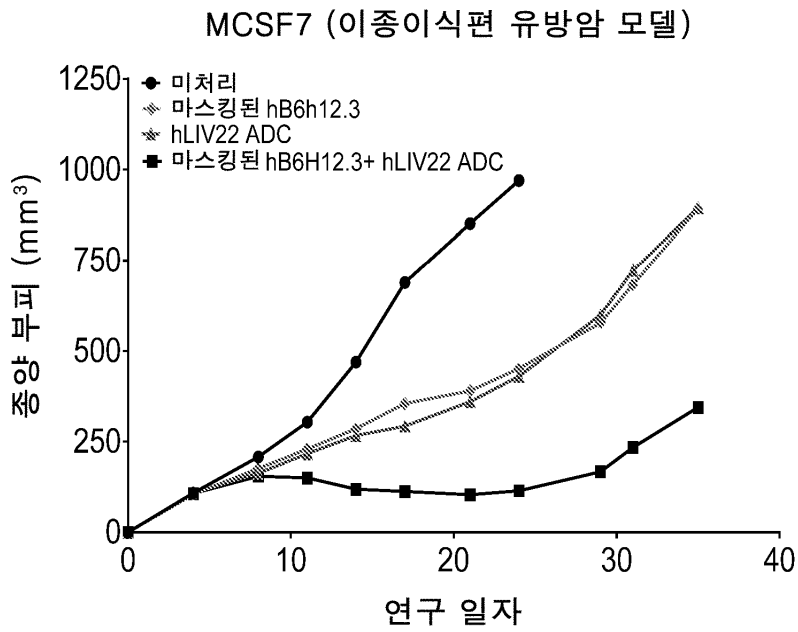
도면35a



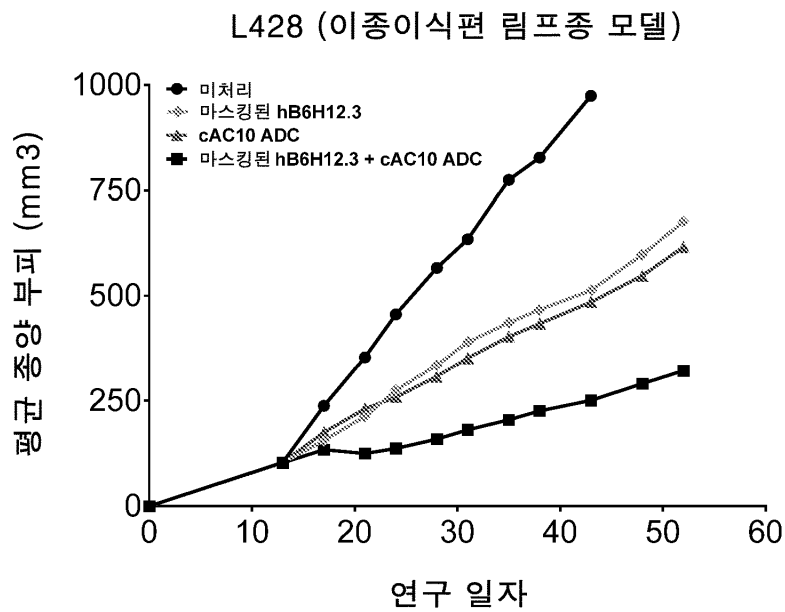
도면35b



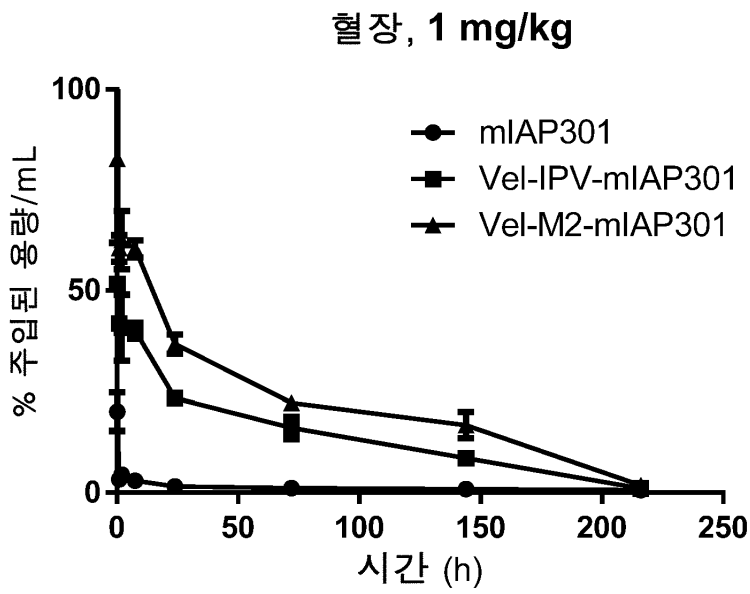
도면36a



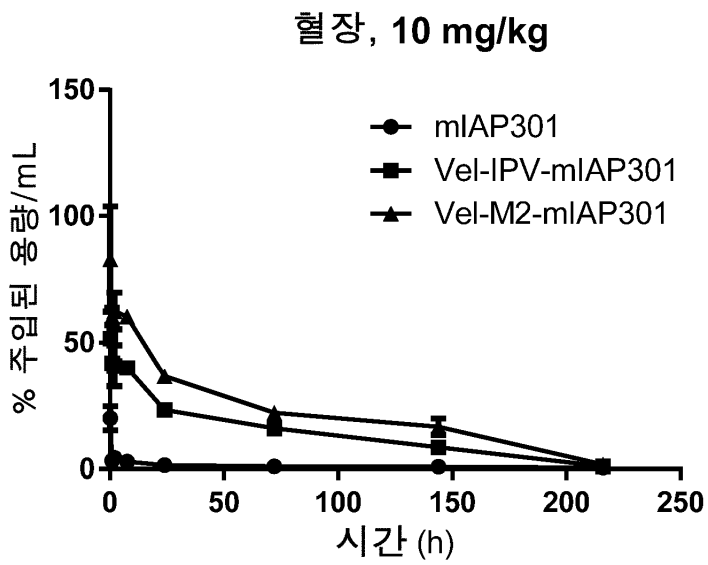
도면36b



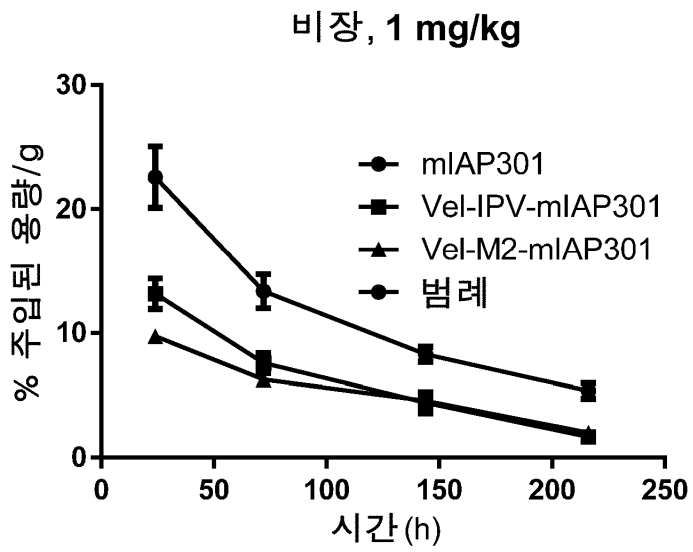
도면37a



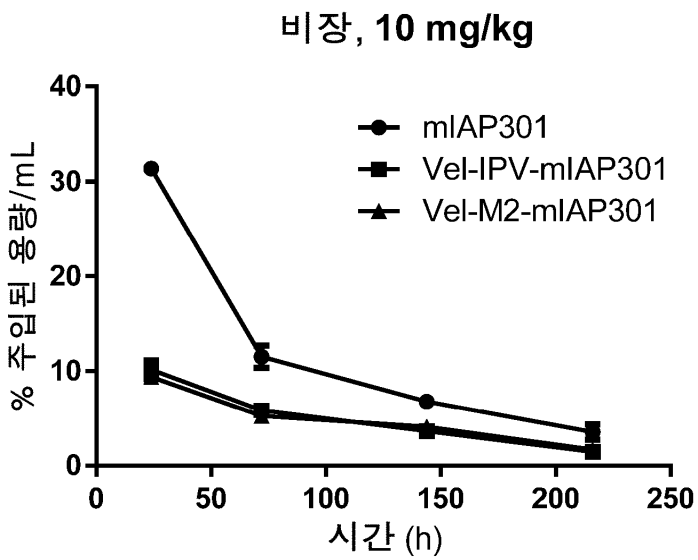
도면37b



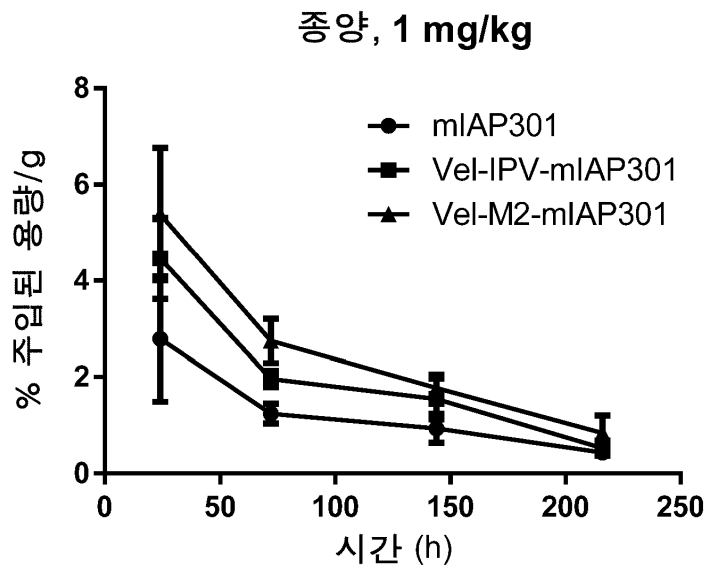
도면37c



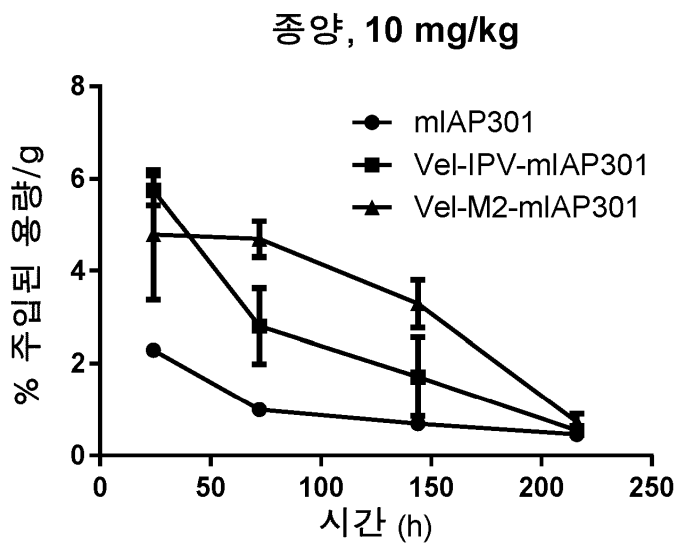
도면37d



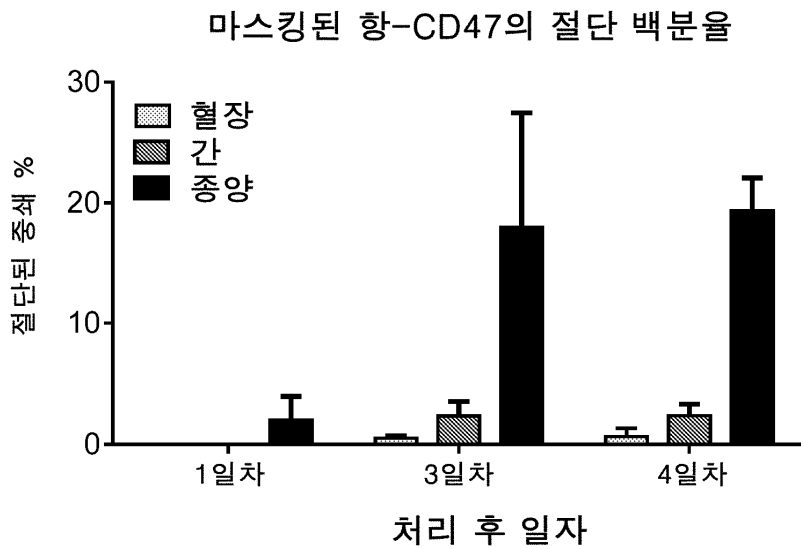
도면37e



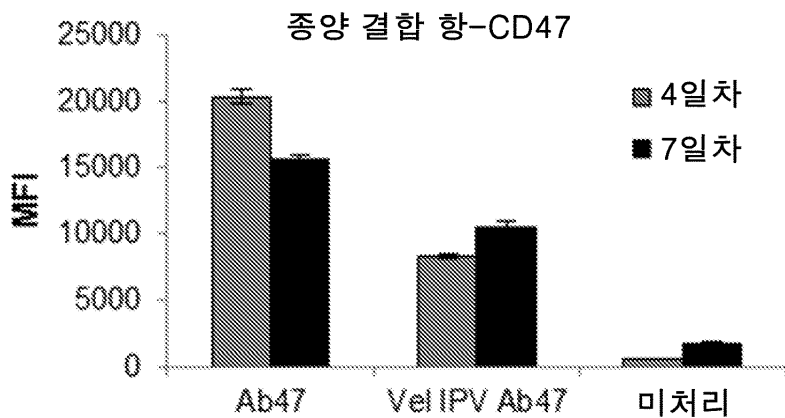
도면37f



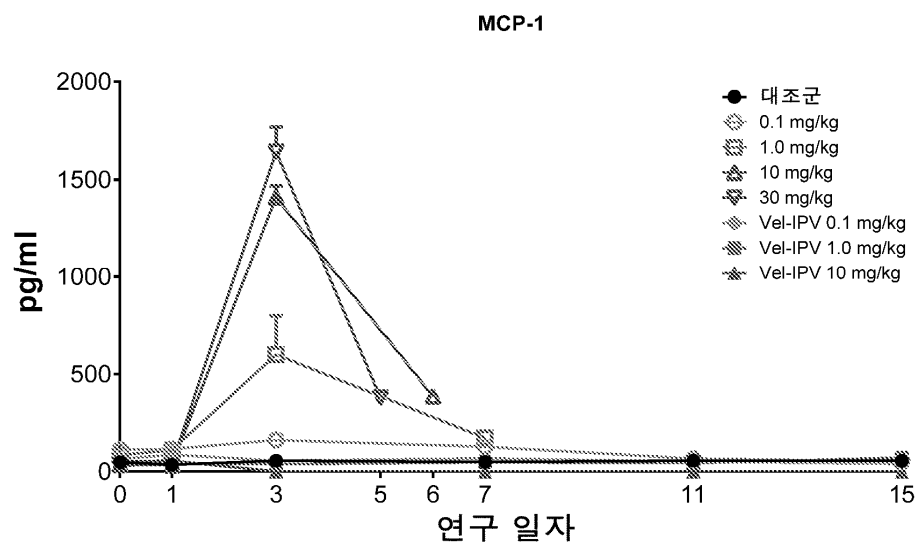
도면38a



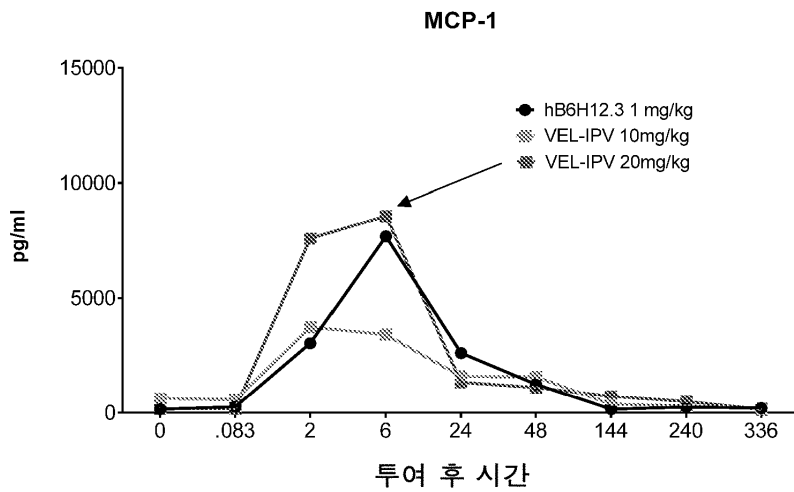
도면38b



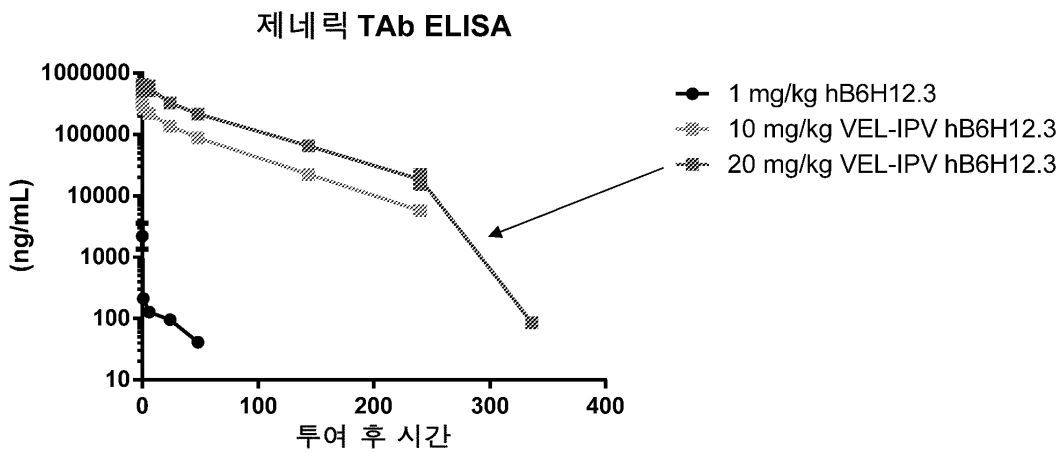
도면39a



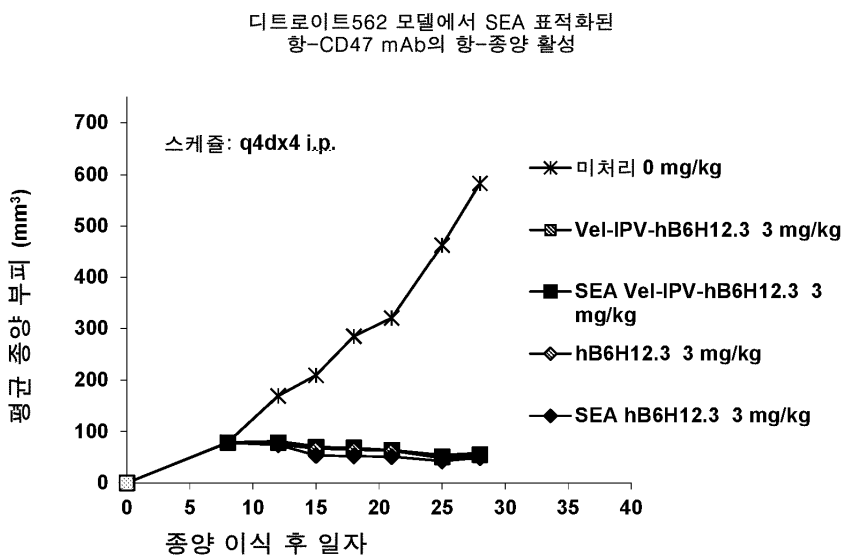
도면39b



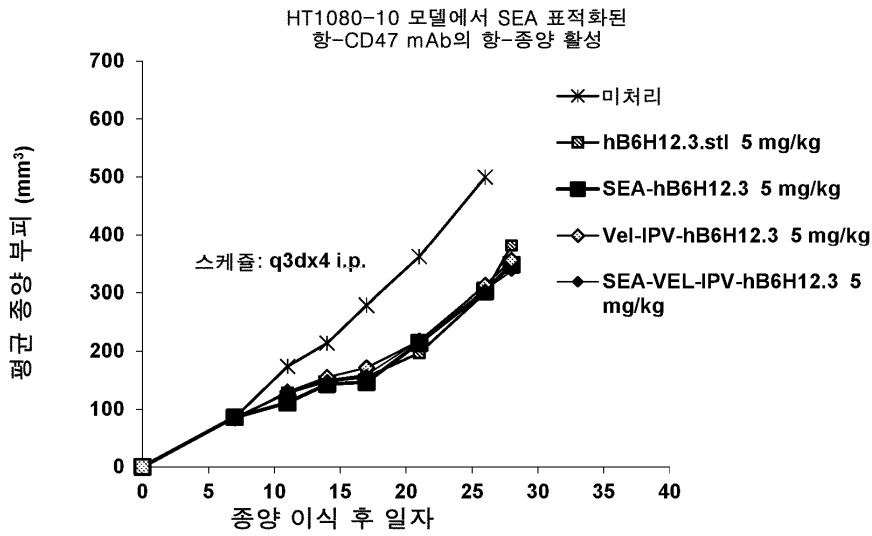
도면39c



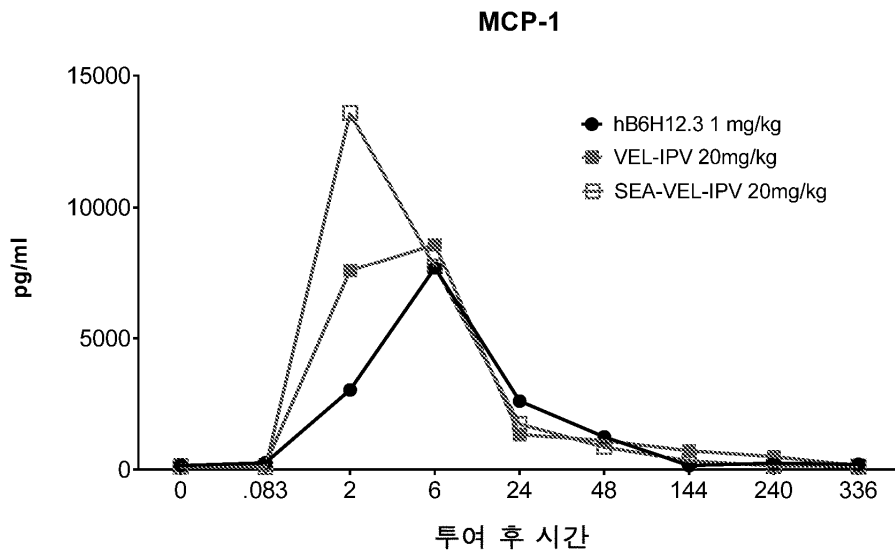
도면40a



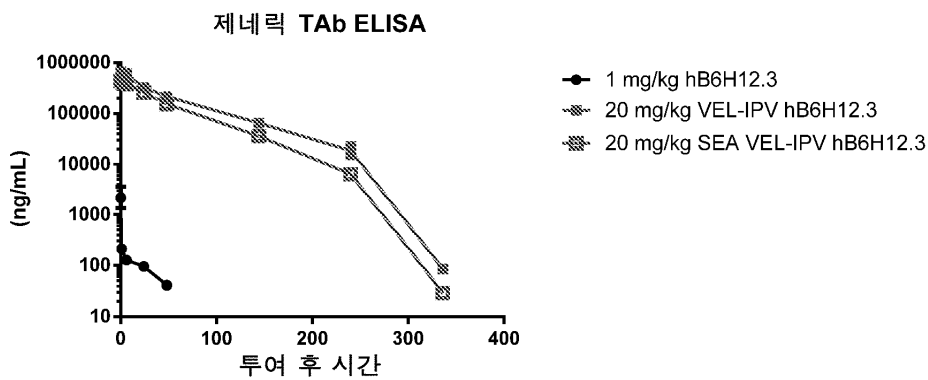
도면40b



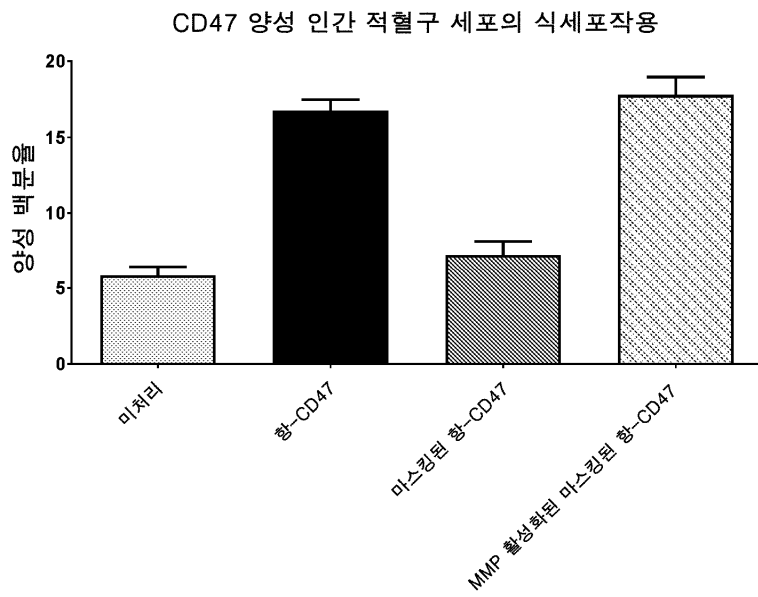
도면41a



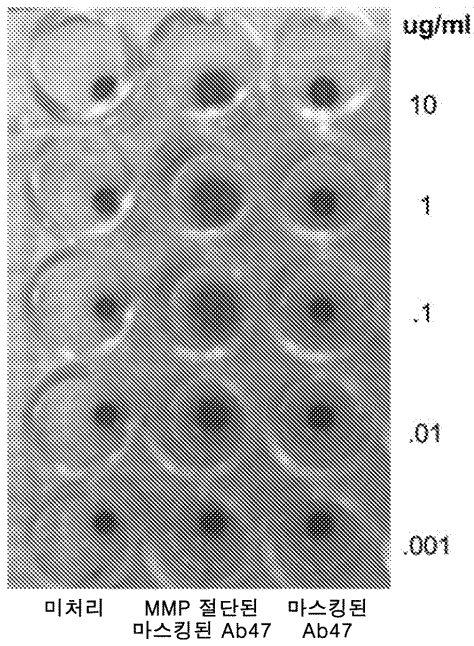
도면41b



도면42

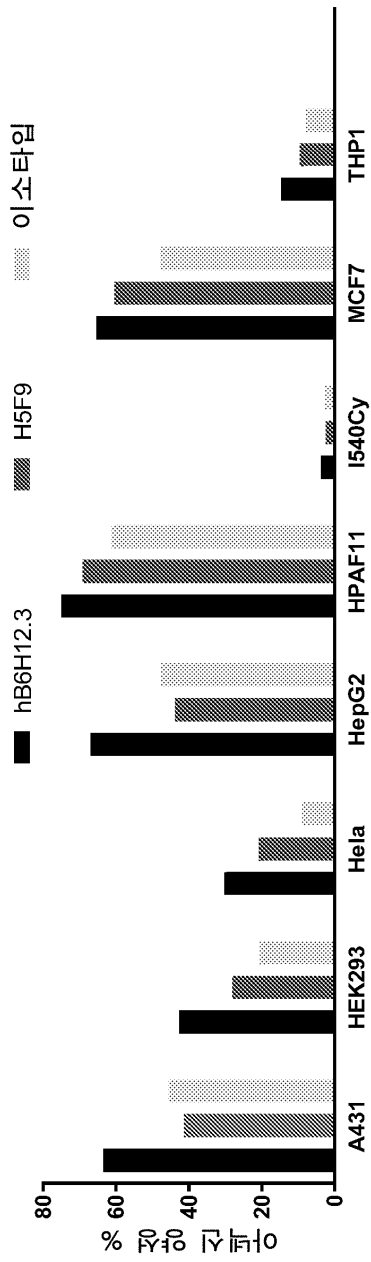


도면43

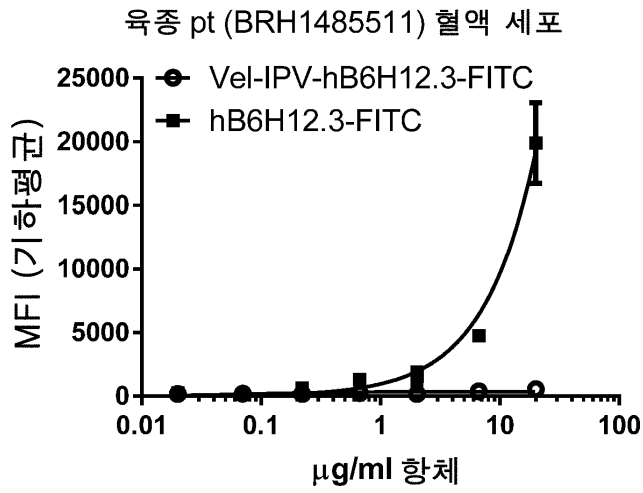


도면44

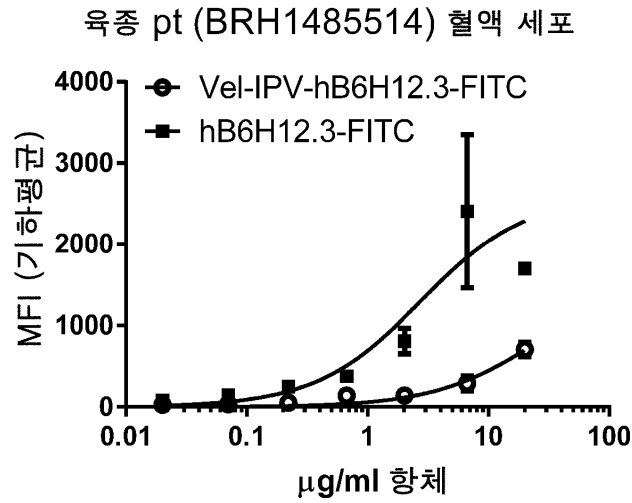
처리된 세포의 아넥신 V 염색



도면45a

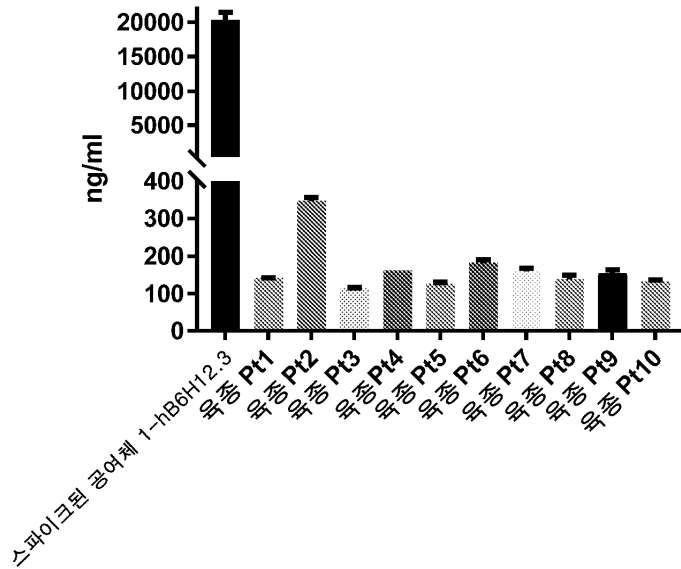


도면45b



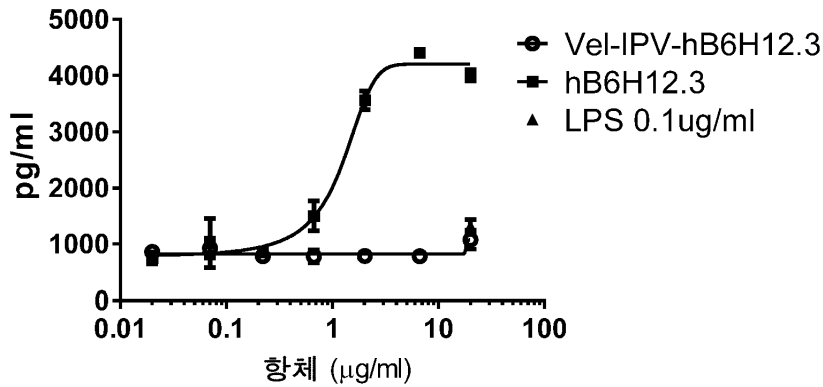
도면45c

절단된 Ab(37C에서 4일)  
 환자 혈장에서 스파이크된 Vel-IPV-hB6H12.3의 20 ug/ml



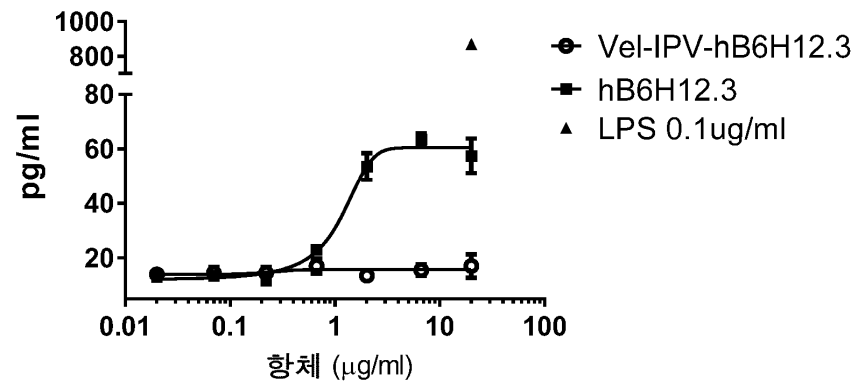
도면46a

IP-10 (pt 050218-4)

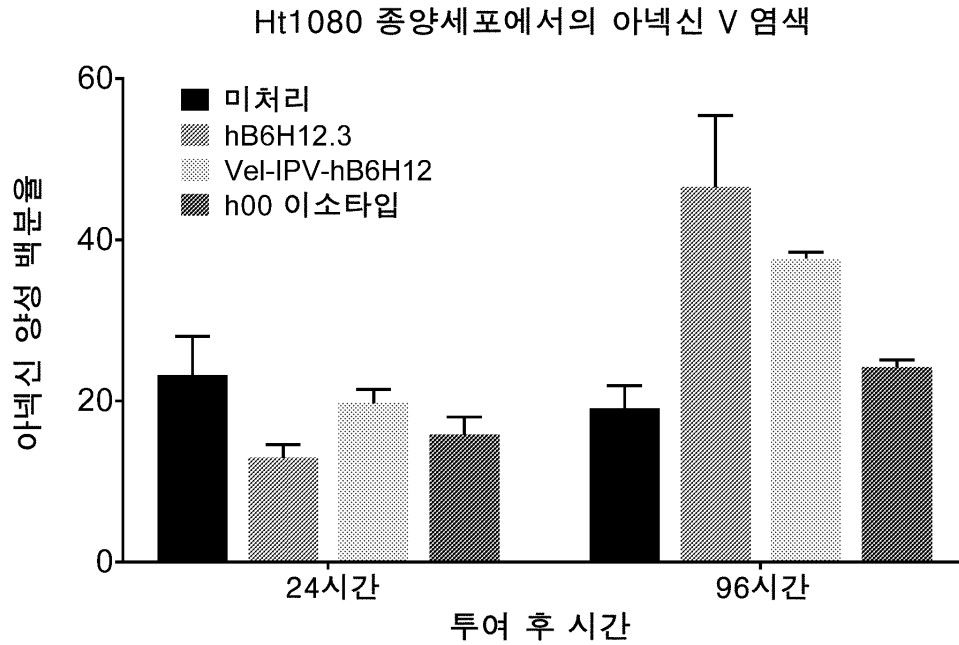


도면46b

IL-1RA (BRH1485516)



도면47



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Seattle Genetics, Inc.

<120> CD47 ANTIBODIES AND USES THEREOF FOR TREATING CANCER

<130> 01218-0002-00PCT

<150> US 62/593,712

<151> 2017-12-01

<160> 95

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> unknown

<220><223> Murine

<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> Artificial Sequence  
 <220><223> Humanized heavy chain variable region  
 <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> Artificial Sequence

<220><223> Humanized heavy chain variable region

<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> Artificial Sequence

<220><223> Humanized heavy chain variable region

<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> Artificial Sequence

<220><223> Humanized heavy chain variable region

<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> Artificial Sequence

<220><223> Humanized heavy chain variable region

<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> Artificial Sequence

<220><223> Humanized heavy chain variable region

<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> Artificial Sequence

<220><223> Humanized heavy chain variable region

<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> unknown

<220><223> Murine

<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> Artificial Sequence

<220><223> Humanized light chain variable region

<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> Artificial Sequence  
 <220><223> Humanized light chain variable region  
 <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> Artificial Sequence

<220><223> Humanized light chain variable region

<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> Artificial Sequence

<220><223> Humanized light chain variable region

<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> Artificial Sequence

<220><223> Humanized light chain variable region

<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> Artificial Sequence  
 <220><223> Humanized light chain variable region  
 <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> Artificial Sequence  
 <220><223> Heavy chain CDR sequence  
 <400> 16

Gly Tyr Gly Met Ser  
 1                    5

<210> 17  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Heavy chain CDR sequence  
 <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>

> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR sequence

<400> 18

Ser Leu Ala Gly Asn Ala Met Asp Tyr

1                    5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR sequence

<400> 19

Ser Tyr Ala Met Ser

1                    5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR sequence

<400> 21

Ser Tyr Gly Met Asn

1                    5

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR sequence

<400> 23

Ser Tyr Gly Met His

1                    5

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR sequence

<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> Artificial Sequence  
<220><223> Heavy chain CDR sequence  
<400> 25

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly

1                    5

<210> 26

<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Heavy chain CDR sequence  
<400> 26

Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Thr

1                    5

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence  
<220><223> Heavy chain CDR sequence  
<400> 27  
Ala Arg Ser Leu Ala Gly Asn Ala Met Asp Tyr

1                    5                    10

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence  
<220><223> Heavy chain CDR sequence  
<400> 28  
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1                    5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR sequence

<400> 29

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1                    5

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR sequence

<400> 30

Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Ile

1                    5

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR sequence

<400>

> 31

Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr Leu His

1                    5                    10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR sequence

<400> 32

Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser

1                    5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR sequence

<400> 33

Gln Asn Gly His Gly Phe Pro Arg Thr

1                    5

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR sequence

<400> 34

Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asn Tyr Leu Ala

1                    5                    10

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR sequence

<400> 35

Phe Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1                    5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR sequence

<400> 36

Gln Asn Ala His Gly Phe Pro Arg Thr

1                    5

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR sequence

<400> 37

Gln Thr Ile Ser Asp Tyr

1                    5

<210> 38

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR sequence

<400> 38

Phe Ala Ser

1

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR sequence

<400> 39

Gln Asn Gly His Gly Phe Pro Arg Thr

1                    5

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR sequence

<400> 40

Gln Thr Ile Ser Asn Tyr

1                    5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR sequence

<400> 41

Gln Asn Ala His Gly Phe Pro Arg Thr



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



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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence  
 <220><223> Masking domain sequence  
 <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> Artificial Sequence  
 <220><223> Masking domain sequence  
 <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> Artificial Sequence  
 <220><223> Masking domain sequence  
 <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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Protease cleavage sequence

<400> 57

Gly Pro Leu Gly Val Arg

1 5

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protease cleavage sequence

<400> 58

Ile Pro Val Ser Leu Arg Ser Gly

1 5

<210> 59

<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223>  
> exemplary linker  
<400> 59  
Gly Ser Gly Gly Ser  
1                    5  
<210> 60  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> exemplary linker  
<400> 60  
Gly Gly Gly Ser  
1  
<210> 61  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> exemplary linker  
<400> 61  
Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser  
1                    5                    10  
<210> 62  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> exemplary linker  
  
<400> 62  
Gly Gly Ala Ala  
1  
<210> 63  
<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> exemplary linker

<400> 63

Gly Gly Gly Gly Ser

1                    5

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> exemplary linker

<400> 64

Leu Ala Ala Ala Ala

1                    5

<210> 65

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> exemplary linker

<400> 65

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 66

<

211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> exemplary linker

<400> 66

Gly Gly Ser Gly Gly

1                    5

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> exemplary linker

<400> 67

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> exemplary linker

<400> 68

Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> exemplary linker

<400> 69

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> exemplary linker

<400> 70

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 71

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> exemplary protease site

<220><221> misc\_feature

<222> (4)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 71

Pro Leu Gly Xaa Xaa Xaa

1                    5

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> exemplary protease site

<400> 72

Pro Leu Gly Val Arg

1                    5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> exemplary protease site

<400> 73

Ile Pro Val Ser Leu Arg Ser Gly

1                    5

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> exemplary protease site

<400> 74

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Tyr

1                    5

<210> 75

<211> 57

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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 Gly Pro

                  35                    40                    45

Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser

                  50                    55

<210> 76

<211> 57

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence  
 <220><223> Masking domain sequence  
 <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> Artificial Sequence  
 <220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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



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> Artificial Sequence

<220><223> Masking domain sequence

<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