



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월21일

(11) 등록번호 10-2757177

(24) 등록일자 2025년01월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) **A61K 31/17** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) **A61K 45/06** (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 31/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7036583
- (22) 출원일자(국제) 2018년06월21일
 심사청구일자 2021년06월17일
- (85) 번역문제출일자 2019년12월11일
- (65) 공개번호 10-2020-0019619
- (43) 공개일자 2020년02월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/038798
- (87) 국제공개번호 WO 2018/237168
 국제공개일자 2018년12월27일
- (30) 우선권주장
 62/523,182 2017년06월21일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 US20160008429 A1*
 May Kung Sutherland et al., mAbs, 2010, vol. 2, no. 4, pp.440-448
 Jie Liu et al., PLOS ONE, vol. 10, no. 9, e0137345, pp.1-23(2025.09.21. 공개)
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 더 보드 어브 트러스티스 어브 더 리랜드 스탠포드 주니어 유니버시티
 미국 94305-2038 캘리포니아주 스탠포드 피오 박스 20386 메인 쿼드 빌딩 170 3층 오피스 오브 더 체너럴 카운셀
 포티 세븐, 엘엘씨
 미국, 캘리포니아 94404, 포스터 시티, 레이크사이드 드라이브 333
- (72) 발명자
 마제티, 라빈드라
 미국 캘리포니아 94303 팔로 알토 뉴웰 플레이스 861
 차오, 마크 피.
 미국 캘리포니아 94040 마운틴 뷰 샤워스 드라이브 2001
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 6 항

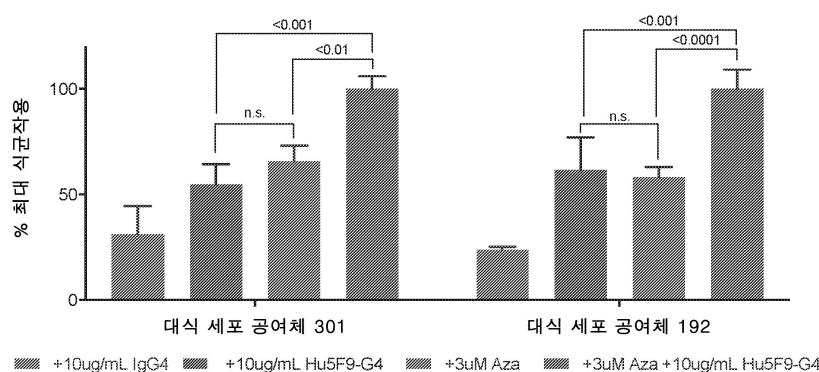
심사관 : 최홍석

(54) 발명의 명칭 혈액성 악성종양에 대한 CD47 표적 요법을 위한 투약 파라미터

(57) 요약

임상적으로 효과적인 기간에 치료 수준을 달성하면서 용량의 안전한 단계적 확대를 제공하는 스케줄로, 치료적 항-CD47 제제의 최적화된 투약을 결정하고 실시하기 위한 방법이 본원에 제공된다. 상기 방법은 청소, 단계적 확대, 및 유지의 단계들을 포함할 수 있다. 일 구현 예에서, 상기 투약 용법은 후속적인 치료를 위해 순환하는 중 (뒷면에 계속)

대표도



양 세포의 안전한 수준을 달성하기 위해 초기(i) 치료 이하 용량의 항-CD47 제제 또는 (ii) 세포감퇴 요법을 투여하는 단계(청소); 치료적 용량이 도달될 때까지 항-CD47 제제의 용량을 상승시키는 단계(단계적 확대); 및 상기 환자의 골수에서 종양 세포를 감소시키기에 충분한 기간 동안 치료적 용량을 유지하는 단계(유지)를 시행한다. 대안적인 투약 용법의 경우, 순환하는 종양 세포가 진술 시 안전한 수준으로 판명된 환자는 초기 청소 없이 단계적 확대 및 유지의 단계에 의해 치료된다.

(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

C07K 16/28 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

(72) 발명자

리우, 지에

미국 캘리포니아 94303 팔로 알토 스톡턴 플레이스
3119

볼크메어, 옌스-피터

미국 캘리포니아 94025 멘로 파크 아파트먼트 4 라
이브 오크 애비뉴 752

와이즈먼, 어빙 엘.

미국 캘리포니아 94305 스탠포드 산타 이네즈 스트리트 747

명세서

청구범위

청구항 1

Hu5F9-G4를 포함하는, 급성 골수성 백혈병(AML) 또는 골수이형성 증후군(MDS) 환자를 치료하는 방법에 사용하기 위한 제약 조성물로서,

방법은 Hu5F9-G4 및 아자시티딘의 투여를 포함하는 것인, 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, Hu5F9-G4가 1 mg/kg/용량의 초기 용량으로 투여되는 것인, 제약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, Hu5F9-G4가 10 mg/kg 내지 30 mg/kg 범위의 치료적으로 효과적인 용량으로 투여되는 것인, 제약 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, Hu5F9-G4가 40 μ g/ml 내지 300 μ g/ml 범위의 Hu5F9-G4의 지속적인 혈청 수준을 야기하는 치료적으로 효과적인 용량으로 투여되는 것인, 제약 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, Hu5F9-G4의 유지 용량이 30 mg/kg인, 제약 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, Hu5F9-G4 용량이 주2회 내지 격주로 확대되는 것인, 제약 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 교차 참조

[0002] 본원은 하기 특허의 이점을 주장한다: 2017년 6월 21에 출원된 미국 가출원 제62/523,182호(상기 출원은 전체적으로 본 명세서에 참고로 편입됨).

배경 기술

[0003] CD47은 단일 Ig-유사 도메인 한 개와 막 관통 영역 5개를 구비한 광범위하게 발현된 막관통 당단백질로, 이것은

SIRP α 의 NH₂-말단 V-유사 도메인을 통해 매개된 결합을 갖는 SIRP α 에 대한 세포 리간드로서 기능한다. SIRP α 는 골수 세포, 예컨대 대식세포, 과립구, 골수성 수지상 세포(DCs), 비만 세포, 및 그들의 전구체, 예컨대 조혈 줄기 세포 상에 주로 발현된다. CD47은 다양한 생물학적 과정, 예컨대 백혈구 접착 및 이동, T-세포 활성화, 세포자멸사 및 식균작용을 매개한다.

[0004] SIRP α 는 대식세포에 의한 숙주세포의 식균작용을 억제하는 데, 여기서 숙주 표적 세포 상에 발현된 CD47에 의한 대식세포 상의 SIRP α 의 결합은 식균작용을 부정적으로 조절하는 SHP-1에 의해 매개된 억제성 신호를 생성한다. SIRP α 는 "자신(self)"에 의해 제공된 신호를 검출하여 이들 세포에 대항하는 타고난 면역 효과기 기능을 부정적으로 제어하도록 작용한다.

선행기술문헌

특허문헌

(특허문헌 0001) US 2016/0008429 A1

(특허문헌 0002) WO 2016/094698 A1

(특허문헌 0003) US 2017/0081407 A1

(특허문헌 0004) US 2010/0080769 A1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] CD47은 또한 수많은 암, 예컨대 백혈병에서 구성적으로 상향조절된다. CD47의 과발현은 상기 암세포가 식균작용을 피하도록 함으로써 병원성을 증가시킨다. CD47 표적화가 암의 치료를 위한 독특한 작용 기전을 대표하지만, CD47의 광범위한 발현은 치료차원의 난제를 제시한다. 또한, 백혈병 및 관련된 혈액성 장애의 치료는 특별한 문제, 예컨대 골수 및 혈액성 기능에 암이 미치는 역효과 및 종양 용해 증후군의 합병증을 제시한다. 본원에 제공된 방법은 이러한 난제들에 답을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0006] 혈액성 악성종양, 예컨대 비제한적으로 백혈병 예컨대 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 다발성 골수종 등은 효과적인 요법에 대한 일련의 독특한 문제를 제기한다. 백혈병과 종종 연관되는 순환하는 종양 세포는, 비록 빠르게 사멸되지만, 이들의 높은 부담이 환자에게 독성이 될 수 있다. 이것은 항-CD47 제제의 용량을 너무 빠르게 상승시킬 경우의 위험일 수 있다. 동시에, 치료적 이점을 제공하기 위해서는 환자를 제제의 치료 수준까지 빠르게 끌어올리는 것이 바람직하다.

[0007] 임상적으로 효과적인 기간에 치료 수준을 달성하면서 용량의 안전한 단계적 확대를 제공하는 스케줄로, 치료적 항-CD47 제제의 최적화된 투약을 결정하고 실시하기 위한 방법이 본원에 제공된다. 상기 방법은 청소, 단계적 확대, 및 유지의 단계들을 포함할 수 있다. 일 구현 예에서, 상기 투약 용법은 후속적인 치료를 위해 순환하는 종양 세포의 안전한 수준을 달성하기 위해 초기(i) 항-CD47 제제의 치료 이하 용량 또는(ii) 세포감퇴(cytoreductive) 요법을 투여하는 단계(청소); 치료적 용량이 도달될 때까지(상기 환자의 골수 아세포에서 수용체 점유율이 약 80% 초과 달성됨), 항-CD47 제제의 용량을 상승시키는 단계(단계적 확대); 및 상기 환자의 골수에서 종양 세포를 감소시키기에 충분한 기간 동안 상기 치료적 용량을 유지하는 단계(유지)를 포함한다. 대안적인 투약 용법의 경우, 시행 시에 안전한 수준의 순환하는 종양 세포를 갖는 것으로 결정된 환자는 단계적 확대 및 유지의 단계들에 의해 치료되는데, 하기를 포함한다: 치료적 용량이 도달될 때까지 항-CD47 제제의 용량을 상승시키는 단계(여기서 상기 환자의 골수 아세포에서 약 80%를 초과하는 수용체 점유율이 달성된다)(단계적 확대); 및 상기 환자의 골수에서 종양 세포를 감소시키기에 충분한 기간 동안 치료적 용량을 유지하는 단계(유지).

[0008] 용량 및 타이밍에 대한 파라미터는 “램프” 스케줄에 포함될 수 있는데, 이것은 투여에 대한 일반적인 지침 및, 예를 들어 순환하는 아세포의 수준을 평가함으로써; 골수 아세포의 수용체 점유율을 모니터링 함으로써, 상

기 램프를 조절하기 위해 개별 환자 데이터가 이용될 수 있는 특정 시점들을 제공한다.

- [0009] 혈액성 악성종양과 연관된 순환하는 및 골수 종양의 높은 부담은, 한 개체에 용량의 적합한 단계적 확대 없이 항-CD47 제제의 치료적 용량이 부여된 경우, 적혈구에 대한 항-CD47 치료와 더불어, 독성 문제를 일으킬 수 있다. 상기 독성은 순환하는 종양 세포의 용해로 초래될 수 있다. 본 방법에서, 치료 수준으로의 단계적 확대는 상기 환자가 안전한 수준의 순환하는 종양 세포를 가질 때야 비로소(이 상태는 단계적 확대 시점이라 불림) 개시된다. 초기 순환하는 종양 세포 수준이 너무 높은 경우, 안전한 수준의 도달은 세포감퇴 제제, 예를 들어 하이드록시우레아, 하이드록시카바마이드, 플루다라빈, 경구 에토포시드, 백혈구분리반출법 등을 투여하여 상기 순환하는 종양 세포 부담을 감소함으로써 달성될 수 있다. 대안적으로 이것은 낮은 치료 이하 수준의 항-CD47 제제를 투여함으로써 달성될 수 있다. 일단 순환하는 세포가 안전한 수준에 도달되면, 이어서 상기 용량은 치료 수준으로 확대될 수 있다. 이와 같은 용량의 단계적 확대는 조기 사망을 방지하고 백혈병성 세포의 안전한 청소를 가능하게 한다.
- [0010] 일부 구현 예에서, 혈액성 악성종양의 치료를 위한 치료적 용량은, 정의된 기간 동안 항-CD47 제제에 의해 골수에서 아세포의 표면에 CD47 결합 부위의 실질적으로 완전한 점유(본 명세서에서 수용체 점유율이라 불림)를 가능하게 하는 용량과 동등하다. 일부 구현 예에서, 상기 항-CD47 제제는 특이적으로 CD47에 결합한다. 실질적으로 완전한 수용체 점유율은 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98% 이상일 수 있다. 상기 정의된 기간은 예를 들어, 용량 투여 사이의 시간, 예를 들어 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 10일, 약 2주 등일 수 있다. 대안적으로, 상기 정의된 기간은 치료적 용량의 투여와 이식 사이, 치료적 용량의 투여와 대안적인, 상보적, 및/또는 상승적 추가 제제의 투여 사이 등의 시간일 수 있다.
- [0011] 관심대상인 항-CD47 제제에 대한 투약계획은 하기를 포함할 수 있다: (i) 단계적 확대의 회수, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 등; (ii) 단계적 확대 사이의 기간, 예를 들어 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 10일, 약 2주 등; (iii) 각각의 단계적 확대에 대한 용량의 증가 수준, 및 고정 또는 가변 여부; 및 (iv) 초기 용량, 스케줄은 또한 상기 (v) 순환하는 종양 세포 부담을 감소하기 위한 세포감퇴 제제의 투약 및/또는 단계적 확대를 포함할 수 있다. 이들 파라미터는 안전하고 임상적으로 유효한 투약을 위한 스케줄을 규정한다.
- [0012] 상기 스케줄의 개별 반응의 평가 및 조정을 위한 데이터 포인트에는 하기가 포함될 수 있다: 순환하는 종양 세포의 개수를 결정하는 시점; 및 종양 세포, 예를 들어 골수 또는 혈액의 표면에 CD47 결합 부위의 수용체 점유율을 결정함으로써; 또는 상기 항-CD47 제제의 혈청 수준을 결정함으로써, 한 개체가 항-CD47 제제의 치료 수준에 도달하였는지 여부를 결정하는 시점.
- [0013] 순환하는 종양 세포의 개수를 결정하기 위해, 순환하는 아세포, 또는 백혈구의 측정이 이루어질 수 있는데, 여기서 용어 “아세포”는 순환하는 혈액성 종양 세포를 지칭하는 데 사용된다. 일부 구현 예에서, 환자 내 순환하는 아세포가 약 20×10^9 /리터 초과, 약 15×10^9 /리터 초과, 약 10×10^9 /리터 초과, 약 5×10^9 /리터 초과, 약 2×10^9 /리터 초과일 경우, 상기 환자는 순환하는 아세포의 수준이 요법을 위해 안전한 수준으로 감소하는 시기까지 치료 이하 용량의 항-CD47 제제로, 또는 세포감퇴 제제로, 또는 둘 모두로 치료된다. 반대로, 순환하는 아세포의 초기 수준이 약 2×10^9 /리터 미만, 약 5×10^9 /리터 미만, 약 10×10^9 /리터 미만인 환자는 세포감퇴 없이 단계적 확대 단계로 개시될 수 있다. 순환하는 아세포 대신에 순환하는 백혈구(WBC)가 카운트될 수 있는데, 여기서 환자 내 순환하는 WBC가 약 50×10^9 /리터 초과, 약 20×10^9 /리터 초과, 약 5×10^9 /리터 초과인 경우, 상기 환자는 순환하는 종양 세포가 요법을 위해 안전한 수준으로 감소되는 시기까지 치료 이하 용량의 항-CD47 제제로, 또는 세포감퇴 제제로, 또는 둘 모두로 치료된다. 반대로, 순환하는 WBC 세포의 초기 수준이 약 5×10^9 /리터 미만, 약 10×10^9 /리터 미만, 약 20×10^9 /리터 미만인 환자는 세포감퇴 없이 단계적 확대 단계로 개시될 수 있다.
- [0014] 본 방법은 병용 요법에서 혈액성 악성종양의 치료를 위한 항-CD47 제제의 투여를 포함하는데, 이것은 종양 세포의 감퇴에 추가적 및/또는 상승적 효과를 허용할 수 있다. 특이적 병용 요법에는, 비제한적으로, 세포감퇴 제제 및 요법과의 병용, 저메틸화(후성유전적) 제제와의 병용, 면역-종양학 제제, 예컨대 T 세포 상에서 작용하는 제제들과의 병용, 종양-표적화된 제제, 예를 들어 선택적으로 암세포 마커에 결합하는 항체와의 병용, 식균 세포 활성화, 성장, 편재화 등을 증가시키는 생물학적 인자와의 병용; 이식, 수혈, 백혈구분리반출법, 에리트로포

이에틴 자극제, 예컨대 에리트로포이에틴과의 병용 등이 포함된다.

[0015] 본 방법에는 혈액성 악성종양의 치료 및 선택된 환자의 치료의 경우 항-CD47 제제의 효능을 위한 환자 선택이 포함된다. 선택 기준은 임상 파라미터, 바이오마커의 발현 등에 기초할 수 있다. 바이오마커로서 포함되는 것은 효능의 강화를 위한 분자 돌연변이, 예를 들어 MDS-특이적 돌연변이이다. 임상 파라미터에는, 비제한적으로, 하기가 포함된다: 중급/고위험 MDS 환자(R/R); 치료 미접촉 부적당한(unfit) 환자를 위한 아자시티딘과의 병용 요법; 유도 화학요법에 부적격한 환자(종래의 요법에 재발/불응성임)를 위한 단일요법; 및 최소 잔존 질환을 갖는 환자의 치료.

도면의 간단한 설명

[0016] 본 발명은 수반되는 도면들과 함께 읽을 때 하기 상세한 설명으로 가장 잘 이해된다. 강조할 것은, 일반적 실시예에 따라, 도면의 다양한 특징들이 척도에 따르지 않는다는 점이다. 반대로, 다양한 특징의 치수들은 명백하게 하기 위해 임의로 확대 또는 축소되었다. 도면에 포함된 것들은 하기 도들이다.

도 1. Hu5F9-G4와 아자시티딘의 병용 치료에 의한 급성 골수성 백혈병 세포(AML)의 향상된 대식세포 식균작용. 약어: AZA = 아자시티딘.

도 2. AML에서 용량 단계적 확대 치료

도 3a-3b. AML에서 용량 단계적 확대 치료가 급성 사망을 방지한다

도 4. Hu5F9-G4의 환자 혈청 농도.

도 5. 항-CD47 Ab로 치료한 마우스 및 환자의 골수 생검의 광현미경사진(마우스:클론 B6H12; 인간:클론 Hu5F9-G4).

도 6. Hu5F9-G4로 치료한 환자의 골수 생검 중 대식세포 및 T 세포에 대한 면역조직화학 분석의 광현미경사진

도 7. 수용체 점유율에 대한 검정의 개략도.

도 8. 임상 투약 프로파일.

도 9. AML에서 CD47 수용체 점유율. 상기 데이터는(프라이밍 용량 1mg/kg 투여 후) 1회 용량 15mg/kg이 말초 혈액 및 골수의 중요한 구획에서 거의 100% RO를 달성하기에 충분했음을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 임상적으로 효과적인 기간에 치료 수준을 달성하는 한편, 용량의 안전한 단계적 확대를 제공하는 스케줄로, 혈액성 악성종양, 예를 들어 백혈병의 치료를 위해 치료적 항-CD47 제제의 최적화된 투약을 결정하고 투여하기 위한 방법이 제공된다.

[0018] 본 방법 및 조성물이 기재되기 전에, 본 발명이 특정 방법 또는 조성물에 제한되지 않으며, 물론 다양할 수 있음이 이해되어야 한다. 본원에 사용된 용어가 특정 구현 예를 기술하기 위한 것일 뿐, 제한하기 위한 것이 아니며, 이것은 본 발명의 범위가 첨부된 청구항들에 의해서만 제한되기 때문임이 이해되어야 한다.

[0019] 값의 범위가 제공될 경우, 문맥에서 달리 명확히 명시되지 않는 한, 상기 범위의 상한치와 하한치 사이의 값의 각각의 개재하는 값(하한치의 10분의 1까지)이 또한 구체적으로 개시된 것으로 이해된다. 언급된 범위 내 임의의 언급된 값 또는 개재하는 값과, 상기 언급된 범위 내의 임의의 다른 언급된 값 또는 개재하는 값 사이의 각각의 더 작은 범위는 본 발명 내에 포괄된다. 이와 같은 더 작은 범위들의 상한치 및 하한치는 상기 범위에 독립적으로 포함되거나 또는 배제되고, 상기 더 작은 범위에 두 한계치 모두가 포함되거나, 둘 중 하나만이 포함되거나 또는 둘 모두 포함되지 않는 각 범위는 또한 본 발명 내에 포괄되고, 상기 언급된 범위 내에 구체적으로 배제된 임의의 한계치의 대상이 된다. 상기 언급된 범위가 한계치의 하나 또는 둘 모두를 포함할 경우, 그와 같이 포함된 한계치에서 둘 중 하나 또는 모두를 배제하는 범위 또한 본 발명에 포함된다.

[0020] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은 본 발명이 속한 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에서 기재된 것과 유사한 또는 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있으나, 일부 가능성 있고 바람직한 방법 및 물질이 본원에 기재되었다. 본원에 언급된 모든 공보는 상기 공보가 인용될 때 연결된 방법 및/또는 물질을 개시 및 기술하기 위해 본 명세

서에 참고로 편입되었다. 모순이 있는 경우, 본 개시내용이 편입된 공보의 임의의 개시내용을 대체함이 이해되어야 한다.

- [0021] 본 개시내용의 판독 시 당업자에게 명백한 사항이 듯이, 본원에 기재 및 설명된 각각의 개별 구현 예는 본 발명의 범위와 사상에서 이탈하지 않으면서 임의의 여러 다른 구현 예의 특징에서 쉽게 분리되거나 또는 그 특징들과 쉽게 조합될 수 있는 별도의 성분들과 특징들을 갖는다. 임의의 인용된 방법은 인용된 사건들의 순서 대로 또는 논리적으로 가능한 임의의 다른 순서 대로 수행될 수 있다.
- [0022] 본원과 첨부된 청구항들에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "하나", "한", 및 "그"는, 문맥에서 달리 명확히 명시되지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함함을 유의해야 한다. 따라서, 예를 들어, "세포"에 대한 언급은 그와 같은 복수 개의 세포를 포함하고, "상기 펩타이드"는 하나 이상의 펩타이드 및 그것의 등가물, 예를 들어 당업자에게 알려진 폴리펩타이드 등에 대한 언급을 포함한다.
- [0023] 본 명세서에서 논의된 공보들은 본원의 출원일 이전에 그것의 개시를 위해 단독으로 제공되었다. 본원의 어떤 것도 본 발명이 선행 발명 때문에 그와 같은 공보에 선행할 자격이 없다고 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 또한, 제공된 공보의 일자는 실제 공개일과 상이할 수 있으므로, 독립적으로 확인될 필요가 있을 수 있다.
- [0024] 용어들 "수령체", "개체", "대상체", "숙주", 및 "환자"는 본원에서 상호교환적으로 사용되어 진단, 치료 또는 요법이 요구되는 임의의 포유동물 대상체, 특히 인간을 지칭한다. 치료를 목적으로 하는 "포유동물"은 포유동물로 분류되는 임의의 동물, 예컨대 인간, 가정용 및 농장 동물 및 동물원, 스포츠, 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 소, 양, 염소, 돼지 등을 지칭한다. 일반적으로, 상기 포유동물은 인간이다.
- [0025] 용어들 "암", "신생물", "종양", 및 "암종"은 본원에서 상호교환적으로 사용되어 상대적으로 자율적 성장을 나타냄으로써, 세포 증식의 통제에 유의미한 상실을 특징으로 하는 비정상적인 성장 표현형을 나타낼 수 있는 세포를 지칭한다. 일반적으로, 본원에서 검출 또는 치료를 위한 관심대상 세포에는 전암성(예를 들어, 양성), 악성, 전-전이성, 전이성, 및 비-전이성 세포가 포함된다. 암성 세포의 검출이 특히 관심의 대상이다. "정상 세포"의 맥락에서 사용된 용어 "정상적인"은 비전환된 표현형의 세포 또는 검사된 조직 유형의 비-전환된 세포의 형태를 나타내는 세포를 지칭하기 위한 것이다. "암성 표현형"은 일반적으로 암성 세포에 특징적인 임의의 다양한 생물학적 현상을 지칭하는데, 상기 현상은 암의 유형에 따라 달라질 수 있다. 상기 암성 표현형은 예를 들어, 세포 성장 또는 증식(예를 들어, 조절되지 않는 성장이나 증식), 세포 주기의 조절, 세포 이동도, 세포-세포 상호작용 또는 전이 등에서 비정상에 의해 일반적으로 확인된다.
- [0026] 용어들 "혈액학적 악성종양", "혈액학적 종양" 및 "혈액학적 암"은 상호교환적으로 그리고 본원에서 가장 광범위하게 사용되고, 조혈계의 세포에서 발생하는 암의 모든 단계 및 모든 형태를 지칭한다.
- [0027] 본 방법을 사용하여 치료될 수 있는 혈액성 악성종양의 예에는 백혈병, 림프종, 및 골수종, 예컨대 비제한적으로 급성 양표현형 백혈병, 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 급성 전골수구성 백혈병(APL), 양표현형 급성 백혈병(BAL) 아구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 골수단핵구성 백혈병(CMML), 만성 림프구성 백혈병(CLL)(백혈병성 세포가 부재할 경우, 소림프구성 림프종(SLL)이라 불림), 급성 단구성 백혈병(AMOL), 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종(예를 들어 만성 림프구성 백혈병(CLL), 미만성 큰 B-세포 림프종(DLBCL), 여포성 림프종(FL), 외투 세포 림프종(MCL), 변연부 림프종(MZL), 버킷 림프종(BL), 모발 세포 백혈병, 이식후 림프증식성 장애(PTLD), 발덴스트롬(Waldenström's) 거대글로불린 혈증/림프형질세포 림프종, 간비장-T 세포 림프종 및 피부 T 세포 림프종(예컨대 세자리 증후군), 다발성 골수종, 골수이형성 증후군, 및 골수증식성 신생물이 포함된다. 특정 구현 예에서, 본 방법은 백혈병, 예를 들어 급성 양표현형 백혈병, 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 급성 전골수구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 골수단핵구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 급성 단구성 백혈병(AMOL)의 치료에서 유용성을 찾을 수 있다.
- [0028] AML의 경우, 다양한 분자 마커가 환자 선택 및 투약에 사용될 수 있는데, 예컨대 비제한적으로, 양호한 결과와 연관된 알려진 임상 예후 인자에는 세포유전적 돌연변이 예컨대 t(15;17)PML/RAR α , t(8;21)AML1/ETO, 11q23, 및 inv(16)CBF β /MYH11, 또는 중급 위험과 연관된 FLT3에서 분자 돌연변이(예를 들어, FLT3-ITD, FLT3-D835), NPM1, EVI1, 또는 cEBP α 가 포함되고; 중급 결과와 연관된 바 있는 임상 예후 인자에는, 비제한적으로, 정상적인 핵형 및 세포유전적 돌연변이 +8, +21, +22, del(7q) 및 del(9q)이 포함되고; 및 부정적인 결과와 연관된 바 있는 임상 예후 인자에는, 비제한적으로, 세포유전적 돌연변이 del(5q), 11q23, t(6;9), t(9;22), 비정상 3q, 복합 세포유전학, 및 IL2Ra 및/또는 MSI2의 상승된 발현 수준이 포함된다.

- [0029] 본 명세서에서 사용된 "표적 세포"는 표면상에 CD47을 발현하는 혈액성 악성 세포로, 여기서 상기 CD47를 막스킹하거나 또는 달리 양성 표현형으로 변경하면(예를 들어, 항-CD47 제제의 투여에 의해) 식균작용의 증가가 야기된다. 일반적으로, 표적 세포는 포유동물 세포, 예를 들어 인간 세포이다.
- [0030] 순환하는 및 골수 아세포, 종양 세포가 순환계 및 골수에서 발견되는 것은 백혈병 및 골수이형성 증후군에서 전형적인 것이다. 아세포, 또는 백혈구의 개수가 이들 조직에서 계수될 수 있다. 아세포인 WBC의 백분율이 조건에 따라 달라질 수 있기에, 아세포 계수가 좀 더 정확할 수 있다.
- [0031] French-American-British(FAB) 분류에 따르면 급성 골수성 백혈병(AML)의 진단을 위해 골수(BM) 또는 말초 혈액(PB)에 아세포 백분율이 적어도 30%여야 하고, 또한 MDS를 하위분류하기 위해서 특이적 아세포 백분율이 있어야 한다. 그에 반해서, 세계보건기구(WHO) 분류는 AML 진단에 대한 커트라인 기준치를 30에서 20% BM 또는 PB 아세포로 낮추고 있다. PB 및 BM 아세포의 백분율은 급성 림프아구성 백혈병(ALL)의 진단을 위해서는 중요하지 않은데, 임의의 클론 미분화 모집단의 존재여부가 진단의 근거가 되기 때문이다. 그러나 후-요법 PB 아세포 백분율은 ALL에서의 결과를 반영하는 중요한 예후 지수이다.
- [0032] 백혈병 및 MDS의 진단은 대개의 경우, 아세포 백분율이 PB에서 보다 BM에서 더 높기 때문에, BM 아세포에 기초한다. 그러나, '말초성 백혈병'으로 알려진 급성 백혈병을 앓는 적은 비율의 환자의 경우, 진단에 기초가 될 만큼 BM 아세포 백분율의 증가가 없기에; 상기 진단은 적어도 20% PB 아세포의 존재를 기초로 한다. 아세포 백분율과 더불어, 순환하는 아세포의 개수가 유용한 측정치를 제공할 수 있다.
- [0033] 상기 단계적 확대 시점, 또는 항-CD47 제제의 치료 수준으로의 단계적 확대를 개시하기에 안전한 시점은 순환하는 아세포 또는 WBC의 수준에 의해 규정될 수 있다. 일부 방법에서, 치료 수준으로의 용량의 단계적 확대를 개시하기에 적절한가 여부를 결정하기 위해 상기 개수가 하나 이상의 시점에서 모니터링된다. 상기 단계적 확대 시점은, 예를 들어, 순환하는 아세포가 약 2×10^9 /리터 미만, 약 5×10^9 /리터 미만, 약 10×10^9 /리터 미만일 때이거나, 또는 백혈구(WBC)의 경우, 순환하는 WBC 세포가 약 5×10^9 /리터 미만, 약 10×10^9 /리터 미만, 약 20×10^9 /리터 미만일 때이다.
- [0034] 세포감퇴 요법은 순환하는 아세포의 개수가 감소되어, 예를 들어 상기 단계적 확대 시점에 도달하는 과정이다. 예를 들어, 순환하는 아세포가 약 20×10^9 /리터 초과, 약 15×10^9 /리터 초과, 약 10×10^9 /리터 초과하는 환자는 순환하는 아세포의 개수를 감소하기 위해 세포감퇴 요법으로 치료된다.
- [0035] 관심대상인 하나의 세포감퇴 요법은 치료 이하 용량의 항-CD47 제제의 투여이다. 치료 이하 용량은 종양 세포 용해, 응집 등으로 갑작스러운 사망을 방지하는 용량(즉, 양)이다. 치료 이하 용량의 항-CD47 제제는 사용된 특이 제제에 따라 달라질 수 있으나, 약 20mg/kg 미만의 5F9G4 항체, 약 15mg/kg 미만의 5F9G4 항체, 약 10mg/kg 미만의 5F9G4 항체, 약 7.5mg/kg 미만의 5F9G4 항체, 약 5mg/kg 미만의 5F9G4 항체, 약 2.5mg/kg 미만의 5F9G4 항체, 약 1mg/kg 미만의 5F9G4 항체와 동등한 용량일 수 있다. 치료 이하 용량은 예를 들어, 약 1~20mg/kg의 5F9G4 항체, 약 2.5 내지 약 15mg/kg의 5F9G4 항체, 약 5~10mg/kg의 5F9G4 항체와 동등하다.
- [0036] 세포 감퇴를 위한 대안적인 방법은 항-CD47 제제 이외의 세포감퇴 제제, 예를 들어 하이드록시우레아, 하이드록시카바마이드, 플루다라빈, 경구 에토포시드, 백혈구분리반출법 등의 투여를 활용한다. 그와 같은 제제는 알려진 방법에 따라 투여되는데, 예를 들어 하이드록시우레아는 1일 약 10, 약 15, 약 20, 약 25, 약 30mg/kg PO의 용량으로 투여되거나, 또는 매일 최소 500mg PO 내지 최대 6g PO의 고른 용량(flat dose)용량으로 투여될 수 있다.
- [0037] "치료적으로 효과적인 용량" 또는 "치료적 용량"은 원하는 임상 결과를 초래하는 데(즉, 치료적 효능을 달성하는 데) 충분한 양이다. 본 발명을 위해, 항-CD47 제제의 치료적으로 효과적인 용량은 표적 세포(예를 들어, 표적 세포)의 식균작용을 증가시킴으로써 상기 질환 상태의 증상을 완화, 개선, 안정화, 역전, 예방, 이것의 진행의 둔화 또는 지연을 위해 충분한; 예를 들어 혈액, 골수 등에서 종양 세포의 개수를 감소시키기에 충분한 양이다. 따라서, 항-CD47 제제의 치료적으로 효과적인 용량은, 상기 표적 세포의 식균작용을 증가시키기에 효과적인 용량으로, 표적 세포 상의 CD47가 식균 세포 상의 SIRP α 에 결합하는 것을 감소시킨다.
- [0038] 표적-매개 제거 경로는 항-CD47 제제 및 그것의 약리적 표적 사이의 상호작용을 수반하고, 단백질 청소의 경로를 대표한다. 예를 들어, 표적 상의 mAb의 세포 표면 결합은 상기 복합체의 세포로의 내재화를 유발하고, 이어서 상기 복합체의 후속적인 리소좀 열화를 유발할 수 있다. 상기 표적-매개 제거는 표적 항원의 규정된 양 때문

에 포화될 수 있어서, 이것은 비-선형 제거를 야기한다. 전형적으로, 막 항원에 결합하는 mAb의 청소는, 미결합된 표적이 항체를 “빨아들여”, 싱크대 역할을 하기 때문에(이와 같은 현상은 “항원 싱크대”라 불림), 저용량에서 더 빠르다. 또한, 항-CD47 제제의 적혈구 및 암세포에 대한 효과의 결과로 표적의 개수가 변화하면 표적-매개된 제거 경로를 통한 치료적 항체의 약동학이 바뀐다.

[0039] 상기 제제의 생물학적 활성인 항원 싱크대와 암세포의 식균작용을 향상시키기 위한 요건 사이의 복잡한 상호작용을 고려하는, 치료적으로 효과적인 용량에 대한 지표로서, 상기 치료적 용량은 규정된 기간 동안 항-CD47 제제에 의해 아세포, 예를 들어 골수, 혈액 등의 표면에 CD47 결합 부위의 실질적으로 완전한 점유(본 명세서에서 수용체 점유율이라 불림)를 허용하는 용량과 동등한 것으로 결정될 수 있다. 일부 구현 예에서, 상기 항-CD47 제제는 특이적으로 CD47에 결합한다. 실질적으로 완전한 수용체 점유율은 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98% 이상일 수 있다.

[0040] 수용체 점유율은 예를 들어, 도 7에서 나타난 바와 같이, 경쟁 검정에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 제제의 개체 투여 후, 적합한 생물학적 샘플, 일반적으로 골수 천자가 수득되는데, 이것은 기질 및 다른 세포에서 WBC를 분리하기 위해 선택적으로 처리된다. 상기 샘플은 나뉘지고, 여기서 하나의 분취액은 인공적으로 항-CD47 제제로 포화된다. 두 개의 분취액은 검출 가능하게 표지된 항-CD47 제제의 대응물로 염색되고; 및 상기 검출 가능한 표지가 정량화된다. 수용체 점유율은 테스트 샘플을 인공적으로 포화된 샘플로 나눈 값의 백분율 비이다.

[0041] 수용체 점유율은 상기 제제의 투여 후 일시적으로 정점에 도달하는데, 따라서 이것은 실질적으로 완전한 수용체 점유율이 달성되는 기간을 정의하는 데 유용하다. 상기 정의된 기간은 예를 들어, 용량 투여 사이의 시간, 예를 들어 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 10일, 약 2주 등일 수 있다. 대안적으로, 상기 정의된 기간은 치료적 용량의 투여와 이식 사이, 치료적 용량의 투여와 대안적인, 상보적, 및/또는 상승적 추가 제제의 투여 사이 등의 시간일 수 있다. 예를 들어, 골수 아세포에서 CD47의 수용체 점유율의 측정치는 상기 제제의 용량을 투여하고 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 1주, 약 10일, 약 2주 후에 결정될 수 있다.

[0042] 수용체 점유율의 대응물로서, 항-CD47 제제의 혈청 수준이 측정될 수 있다. 일부 구현 예에서, 치료적으로 효과적인 용량은 약 40 μ g/ml 이상(예를 들어, 약 50 μ g/ml 이상, 약 60 μ g/ml 이상, 약 75 μ g/ml 이상, 약 100 μ g/ml 이상, 약 125 μ g/ml 이상 또는 약 150 μ g/ml 이상)의 항-CD47 제제(예를 들어, 항-CD47 항체)의 지속적인 혈청 수준을 야기한다. 일부 구현 예에서, 치료적으로 효과적인 용량은 약 40 μ g/ml 내지 약 300 μ g/ml, 최대 약 500 μ g/ml, 최대 약 750 μ g/ml, 최대 약 1000 μ g/ml, 예를 들어, 약 40 μ g/ml 내지 약 1000 μ g/ml, 약 40 μ g/ml 내지 약 800 μ g/ml, 약 40 μ g/ml 내지 약 700 μ g/ml, 약 40 μ g/ml 내지 약 600 μ g/ml, 약 50 μ g/ml 내지 약 500 μ g/ml, 약 50 μ g/ml 내지 약 750 μ g/ml, 약 50 μ g/ml 내지 약 300 μ g/ml, 약 50 μ g/ml 내지 약 250 μ g/ml, 약 75 μ g/ml 내지 약 1000 μ g/ml, 약 75 μ g/ml 내지 약 750 μ g/ml, 약 75 μ g/ml 내지 약 500 μ g/ml, 약 75 μ g/ml 내지 약 250 μ g/ml, 약 100 μ g/ml 내지 약 1000 μ g/ml, 약 100 μ g/ml 내지 약 600 μ g/ml, 또는 약 100 μ g/ml 내지 약 300 μ g/ml의 범위의 항-CD47 제제(예를 들어, 항-CD47 항체)의 지속적인 혈청 수준을 야기한다. 일부 구현 예에서, 혈액성 악성종양을 치료하기 위한 치료적으로 효과적인 용량은 약 50 μ g/ml 이상의 항-CD47 제제(예를 들어, 항-CD47 항체)의 지속적인 혈청 수준(예를 들어, 75 μ g/ml 이상의 지속적인 혈청 수준; 또는 약 50 μ g/ml 내지 약 150 μ g/ml 범위의 지속적인 혈청 수준)을 야기한다.

[0043] 단계적 확대. 본 명세서에서 사용된 “단계적 확대”는 상기 제제의 용량의 증가이고, 증가 수준, 예를 들어 약 10% 증가율, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 100%, 2배, 2.5배, 5배 이상에 따라 달라질 수 있다. 상기 증가 수준은 고정적일 수도, 가변적일 수도 있다. 개체에 미치는 효과는 예를 들어, 순환하는 아세포의 수준을 측정함으로써 모니터링 될 수 있고, 상기 단계적 확대는 순환하는 아세포의 개수에 기초하여 조정될 수 있다.

[0044] 예를 들어, 일단 환자가 단계적 확대가 안전한 시점에 도달했다고 판단되면, 상기 항-CD47 제제의 용량은 약 1mg/kg/용량만큼, 약 2.5mg/kg/용량만큼, 약 5mg/kg/용량만큼, 약 7.5mg/kg/용량만큼, 약 10mg/kg/용량만큼; 약 12.5mg/kg/용량만큼, 약 15mg/kg/용량만큼, 약 20mg/kg/용량만큼, 약 25mg/kg/용량만큼, 약 30mg/kg/용량만큼, 일반적으로 약 1 내지 약 30mg/kg/용량, 1-20mg/kg/용량, 1-15mg/kg/용량 등으로 증가될 수 있는데, 이때 상기 단계적 확대는 매주, 격주, 매주 2회, 주2회(semi-weekly), 매 3 일 등으로 이루어질 수 있다.

[0045] “유지 용량”은 치료적으로 효과적인 수준이 도달된 때에 투여되는 용량이다. 치료적으로 효과적인 용량 또는 일련의 치료적으로 효과적인 용량은 항-CD47 제제의 혈청 수준 및/또는 실질적으로 완전한 수용체 점유율을 달성 및 유지할 수 있다. 항-CD47 제제의 치료적으로 효과적인 용량은 사용된 특이 제제에 따라 다를 수 있는데,

일반적으로 약 8mg/kg 체중 이상(예를 들어, 약 8mg/kg 이상, 약 10mg/kg 이상, 약 15mg/kg 이상, 약 20mg/kg 이상, 약 25mg/kg 이상, 약 30mg/kg 이상, 약 35mg/kg 이상 또는 약 40mg/kg 이상), 또는 약 45mg/kg 이상, 또는 약 50mg/kg 또는 약 60mg/kg 이상이다. 범위에는 약 10mg/kg 내지 약 60mg/kg(예를 들어, 약 10mg/kg 내지 약 50mg/kg, 또는 약 10mg/kg 내지 약 30mg/kg)이 포함될 수 있다. 특정 치료적 용량을 달성 및/또는 유지하기 위해 요구되는 용량은 용량들 사이의 시간의 양에 비례하고 투여된 용량의 회수에 반비례한다. 따라서, 투약의 빈도가 증가할수록, 요구되는 용량은 감소된다. 투약 전략의 최적화는 당업자에 의해 쉽게 이해되고 실시될 것이다.

[0046] 항-CD47 제제. 본 명세서에서 사용된 용어 “항-CD47 제제”는 CD47(예를 들어, 표적 세포 상에)의 SIRP α (예를 들어, 식균 세포 상에)의 결합을 감소시키는 임의의 제제를 지칭한다. 적합한 항-CD47 시약의 비-제한적인 예에는 SIRP α 시약, 예컨대 비제한적으로 고친화도 SIRP α 폴리펩타이드, 항-SIRP α 항체, 가용성 CD47 폴리펩타이드, 및 항-CD47 항체 또는 항체 단편이 포함된다. 일부 구현 예에서, 적합한 항-CD47 제제(예를 들어 항-CD47 항체, SIRP α 시약, 등)는 특이적으로 CD47과 결합하여 CD47의 SIRP α 결합을 감소시킨다. 적합한 항-CD47 제제의 효능은 상기 제제를 검정함으로써(추가로 하기에 기재됨) 평가될 수 있다. 예시적인 검정에서, 표적 세포가 후보 제제의 존재하에 또는 부재 하에 배양된다. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 제제는, 상기 제제의 부재하의 식균작용과 비교하여, 식균작용을 적어도 10%(예를 들어, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 120%, 적어도 140%, 적어도 160%, 적어도 180%, 또는 적어도 200%) 상향 조절할 것이다. 유사하게, SIRP α 의 티로신 인산화의 수준에 대한 시험관내 검정은, 상기 후보 제제의 부재 하에 관측된 인산화와 비교하여, 적어도 5%(예를 들어, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, , 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, or 100%)만큼 인산화의 감소를 보여줄 것이다.

[0047] 일부 구현 예에서, 상기 항-CD47 제제는 결합 시 CD47을 활성화하지 않는다. CD47이 활성화된 경우, 세포자멸사(즉, 프로그래밍된 세포사)와 유사한 과정이 발생할 수 있다(Manna and Frazier, Cancer Research, 64, 1026-1036, Feb. 1 2004). 따라서, 일부 구현 예에서, 상기 항-CD47 제제는 직접적으로 CD47-발현 세포의 세포사를 유도하지 않는다.

[0048] SIRP α 시약. SIRP α 시약은 인식가능한 친화도로 CD47와 결합하기에 충분하되, 정상적으로 신호 서열과 막관통 도메인 사이에 놓여 있는 SIRP α 의 부분, 또는 상기 결합 활성을 보유하는 그것의 단편을 포함한다. 적합한 SIRP α 시약은 천연 단백질 SIRP α 과 CD47의 상호작용을 감소(예를 들어, 차단, 방지 등)시킨다. 상기 SIRP α 시약은 일반적으로 적어도 SIRP α 의 d1 도메인을 포함한다. 일부 구현 예에서, SIRP α 시약은 예를 들어, 뼈대에 제2 폴리펩타이드와 융합된 융합 단백질이다. 일부 구현 예에서, 상기 제2 폴리펩타이드는 융합 단백질의 크기를 증가시킬 수 있는데, 예를 들어, 그럼으로써 상기 융합 단백질은 상기 순환에서 빠르게 제거되지 않는다. 일부 구현 예에서, 상기 제2 폴리펩타이드는 면역글로불린 Fc 영역의 일부 또는 전체이다. 상기 Fc 영역은 “나를 먹어요” 신호를 제공함으로써 식균작용을 보조하는 데, 이것이 고친화도 SIRP α 시약에 의해 제공된 “나는 먹지 말아요” 신호의 차단을 증진시킨다. 다른 구현 예에서, 상기 제2 폴리펩타이드는 Fc와 실질적으로 유사한 임의의 적합한 폴리펩타이드로, 예를 들어, 증가된 크기, 다량체화 도메인, 및/또는 Ig 분자와의 추가 결합 또는 상호작용을 제공한다.

[0049] 일부 구현 예에서, 본 발명의 항-CD47 제제는 SIRP α -유래 폴리펩타이드 및 그것의 유사체를 포함하는 “고친화도 SIRP α 시약”이다. 고친화도 SIRP α 시약은 국제 출원 PCT/US13/21937에 기재되었고, 이것은 본원에 참고로 구체적으로 편입되었다. 고친화도 SIRP α 시약은 천연 SIRP α 단백질의 변이체이다. 일부 구현 예에서, 고친화도 SIRP α 시약은 가용성인데, 여기서 상기 폴리펩타이드에는 SIRP α 막관통 도메인이 부족하고, 야생형 SIRP α 서열 대비 적어도 하나의 아미노산 변화가 포함되되, 상기 아미노산 변화는, 예를 들어 오프-레이트(off-rate)를 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 500배 이상 감소시킴으로써, SIRP α 폴리펩타이드가 CD47에 결합하는 친화도를 증가시킨다.

[0050] 고친화도 SIRP α 시약은 인식가능한 친화도, 예를 들어, 고친화도로 CD47와 결합하기에 충분한 SIRP α 의 부분(정상적으로 신호 서열과 막관통 도메인 사이에 놓여 있음) 또는 상기 결합 활성을 보유하는 그것의 단편을 포함한다. 상기 고친화도 SIRP α 시약은 일반적으로 변형된 아미노산 잔기와 함께 적어도 SIRP α 의 d1 도메인을 포함하여 친화도를 증가시킬 것이다. 일부 구현 예에서, 본 발명의 SIRP α 변이체는 예를 들어, 뼈대에 있어 제2 폴리펩타이드와 융합된 융합 단백질이다. 일부 구현 예에서, 상기 제2 폴리펩타이드는 융합 단백질의 크기를 증가시킬 수 있는데, 예를 들어, 그럼으로써 상기 융합 단백질은 상기 순환에서 빠르게 제거되지 않는다. 일부 구현 예에서, 상기 제2 폴리펩타이드는 면역글로불린 Fc 영역의 일부 또는 전체이다. 상기 Fc 영역은 “나를 먹

어요” 신호를 제공함으로써 식균작용을 보조하는 데, 이것이 고친화도 SIRP α 시약에 의해 제공된 “나는 먹지 말아요” 신호의 차단을 증진시킨다. 다른 구현 예에서, 상기 제2 폴리펩타이드는 Fc와 실질적으로 유사한 임의의 적합한 폴리펩타이드로, 예를 들어, 증가된 크기, 다량체화 도메인, 및/또는 Ig 분자와의 추가 결합 또는 상호작용을 제공한다. 친화도 증가를 허용하는 아미노산 변경은 상기 d1 도메인에 국소화되고, 따라서 고친화도 SIRP α 시약은 인간 SIRP α 의 d1 도메인을 포함하되, 이것은 상기 d1 도메인 내 야생형 서열과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 변경을 갖는다. 이와 같은 고친화도 SIRP α 시약은 선택적으로 추가의 아미노산 서열, 예를 들어 항체 Fc 서열; 상기 d1 도메인 이외의 야생형 인간 SIRP α 단백질의 일부분들, 예컨대 비제한적으로 상기 천연 단백질의 잔기 150 내지 374, 또는 이의 단편(일반적으로 상기 d1 도메인에 인접한 단편들) 등을 포함한다. 고친화도 SIRP α 시약은 단량체성 또는 다량체, 즉 이량체, 삼량체, 사량체 등일 수 있다.

[0051] 항-CD47 항체. 일부 구현 예에서, 본 발명의 항-CD47 제제는 특이적으로 CD47와 결합하는 항체(즉, 항-CD47 항체)이자 하나의 세포(예를 들어, 감염된 세포) 상의 CD47와 또 다른 세포(예를 들어, 식균 세포) 상의 및 SIRP α 사이의 상호작용을 감소시키는 항체이다. 일부 구현 예에서, 적합한 항-CD47 항체는 결합 시 CD47을 활성화하지 않는다. 적합한 항체의 비-제한적인 예에는 클론 B6H12, 5F9, 8B6, 및 C3(예를 들어, 국제 특허 공개 WO 2011/143624에 기재된 바와 같음(본원에 참고로 구체적으로 편입됨))이 포함된다. 적합한 항-CD47 항체에는 그와 같은 항체의 완전 인간, 인간화된 또는 키메라 버전이 포함된다. 인간화된 항체(예를 들어, hu5F9-G4)는 그것의 낮은 항원성 때문에 인간의 생체 내 적용에 특히 유용하다. 이와 유사하게, 개과화된, 고양이과화된, 또는 기타 항체는 각각 개, 고양이 및 다른 종의 적용에 특히 유용하다. 관심대상의 항체에는 인간화된 항체, 개과화된, 고양이과화된, 말과화된, 소과화된, 돼지과화된 항체 및 그들의 변이체가 포함된다.

[0052] 항-SIRP α 항체. 일부 구현 예에서, 본 발명의 항-CD47 제제는 SIRP α 와 결합하는 항체(즉, 항-SIRP α 항체)이자 하나의 세포(예를 들어, 감염된 세포) 상의 CD47과 또 다른 세포(예를 들어, 식균 세포) 상의 SIRP α 사이의 상호작용을 감소시키는 항체이다. 적합한 항-SIRP α 항체는 SIRP α 의 활성화가 식균작용을 억제하기 때문에 SIRP α 를 통한 신호전달을 활성화 또는 자극시킴 없이 SIRP α 와 결합할 수 있다. 대신에, 적합한 항-SIRP α 항체는 정상 세포보다 영향 받은 세포의 우선적인 식균작용을 촉진한다. 다른 세포(비-감염된 세포)와 비교하여 더 높은 수준의 CD47을 발현하는 세포들(예를 들어, 감염된 세포)이 우선적으로 식균(phagocytosed) 것이다. 따라서, 적합한 항-SIRP α 항체는 (식균작용을 억제하기에 충분한 신호전달 반응을 활성화/자극시킴 없이) 특이적으로 SIRP α 와 결합하여, SIRP α 와 CD47 상의 상호작용을 차단한다. 적합한 항-SIRP α 항체에는 이와 같은 항체의 완전 인간, 인간화된 또는 키메라 버전이 포함된다. 인간화된 항체는 그것의 낮은 항원성 때문에 인간의 생체내 적용에 특히 유용하다. 이와 유사하게, 개과화된, 고양이과화된, 또는 기타 항체는 각각 개, 고양이 및 다른 종의 적용에 특히 유용하다. 관심대상의 항체에는 인간화된 항체, 개과화된, 고양이과화된, 말과화된, 소과화된, 돼지과화된 항체 및 그들의 변이체가 포함된다.

[0053] 가용성 CD47 폴리펩타이드. 일부 구현 예에서, 본 발명의 항-CD47 제제는 특이적으로 SIRP α 와 결합하고 하나의 세포(예를 들어, 감염된 세포) 상의 CD47과 또 다른 세포(예를 들어, 식균 세포) 상의 SIRP α 사이의 상호작용을 감소시키는 가용성 CD47 폴리펩타이드이다. 적합한 가용성 CD47 폴리펩타이드는 SIRP α 의 활성화가 식균작용을 억제하기 때문에 SIRP α 를 통한 신호전달을 활성화 또는 자극시킴 없이 SIRP α 와 결합할 수 있다. 대신에, 적합한 가용성 CD47 폴리펩타이드는 비-감염된 세포에 비해 감염된 세포의 우선적인 식균작용을 촉진한다. 정상적인, 비-표적 세포(정상 세포) 대비 더 높은 수준의 CD47를 발현하는 세포들(예를 들어, 감염된 세포)이 우선적으로 식균될 것이다. 따라서, 적합한 가용성 CD47 폴리펩타이드는 식균작용을 억제하기에 충분한 신호전달 반응을 활성화/자극시킴 없이 SIRP α 와 특이적으로 결합할 수 있다.

[0054] 일부 경우에, 적합한 가용성 CD47 폴리펩타이드는 융합 단백질(예를 들어 US 특허 공보 US20100239579에 구조적으로 기재된 바와 같음(본원에 참고로 구체적으로 편입됨))일 수 있다. 그러나 SIRP α 를 활성화/자극하지 않는 융합 단백질만이 본원에 제공된 방법에 적합하다. 적합한 가용성 CD47 폴리펩타이드는 또한 특이적으로 SIRP α 와 결합하고, 식균작용을 억제하기에 충분한 SIRP α 활성을 자극함 없이 CD47와 SIRP α 사이의 상호작용을 억제하는 변이체 또는 자연적으로 현존하는 CD47 서열(예를 들어, 세포 외 도메인 서열 또는 세포의 도메인 변이체)을 포함하는 임의의 펩타이드 또는 펩타이드 단편을 포함한다.

[0055] 특정 구현 예에서, 가용성 CD47 폴리펩타이드는 신호 펩타이드(서열번호:2)를 비롯한, CD47의 세포외 도메인을 포함함으로써, CD47의 세포외 부분은 전형적으로 142 개 길이의 아미노산이고, 서열번호:3에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. 본원에 기재된 가용성 CD47 폴리펩타이드는 또한 적어도 65%~75%, 75%~80%, 80~85%, 85%~90%, 또는 95%~99%(또는 65% 내지 100% 사이로 구체적으로 열거되지 않은 임의의 동일성 퍼센트)아미노산 서열을 포함하는 CD47 세포외 도메인 변이체(이것의 변이체가 SIRP α 신호전달을 자극하지 않고 SIRP α 에 결합하는 능력

을 보유함)를 포함한다.

- [0056] 특정 구현 예에서, 상기 신호 펩타이드 아미노산 서열은 또 다른 폴리펩타이드(예컨대, 예를 들어, 번역글로블린 또는 CTLA4)에서 유래된 신호 펩타이드 아미노산 서열로 치환될 수 있다. 예를 들어, 상기 외부 세포막을 가로지르는 세포 표면 폴리펩타이드인 전장 CD47과 달리, 상기 가용성 CD47 폴리펩타이드는 분비되는데; 따라서, 가용성 CD47 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 세포에서 정상적으로 분비된 폴리펩타이드와 연관된 신호 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.
- [0057] 다른 구현 예에서, 상기 가용성 CD47 폴리펩타이드는 신호 펩타이드가 부족한 CD47의 세포의 도메인을 포함한다. 예시적인 구현 예에서, 상기 신호 펩타이드가 부족한 CD47 세포의 도메인은 서열번호:1에 제시된 아미노산 서열(124 아미노산)을 갖는다. 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 신호 펩타이드는 분비된 단백질 또는 막관통 단백질의 세포 표면에 노출되지 않는데, 이것은 상기 신호 펩타이드 중 하나가 단백질의 전좌 동안 절단되거나 또는 상기 신호 펩타이드가 외부 세포막에 고정된 채로 남아 있기 때문(그와 같은 펩타이드는 또한 신호 앵커라 불린다)이다. CD47의 신호 펩타이드 서열은 생체내에서 전구체 CD47 폴리펩타이드에서 절단된 것으로 여겨진다.
- [0058] 다른 구현 예에서, 가용성 CD47 폴리펩타이드는 CD47 세포의 도메인 변이체를 포함한다. 이와 같은 가용성 CD47 폴리펩타이드는 SIRP α 신호전달을 자극시킴 없이 SIRP α 에 결합하는 능력을 보유한다. CD47 세포의 도메인 변이체는 참조 CD47 서열(예를 들어 유전자은행 수탁 번호 NP_001768.1 또는 NP_942088.1)과 적어도 65%~75%, 75%~80%, 80~85%, 85%~90% 또는 95%~99% (상기 범위들 중 임의의 하나 사이의 기재된 임의의 동일성 퍼센트를 포함) 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0059] 용어들 “치료”, “치료하는”, “치료하다” 및 기타 동종의 것은 일반적으로 원하는 약리적 및/또는 생리적 효과를 수득하는 것을 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 상기 효과는 예방적 관점에서 질환 또는 그것의 증상(들)을 완전히 또는 부분적으로 예방차원의 것일 수 있고, 및/또는 질환의 및/또는 상기 질환에 기인하는 역효과의 부분적인 또는 완전한 안정화 또는 치유의 차원에서 치료차원의 것일 수 있다. 용어 “치료”는 포유동물, 특히 인간의 질환의 임의의 치료를 아우르는데, 여기에는 하기가 포함된다: 질환 및/또는 증상(들)의 억제, 즉 그것의 발전의 저지; 및/또는 질환 증상(들)의 경감, 즉 상기 질환 및/또는 증상(들)의 퇴행의 유발. 치료를 요구하는 개체에는 혈액성 악성종양이 이미 진단된 개체가 포함된다.
- [0060] 용어들 “특이적 결합,” “특이적으로 결합하다” 및 동종의 것은 용액 또는 반응 혼합물에서 다른 분자 또는 모이어티와 달리 한 분자에 우선적인 비-공유 또는 공유 결합(예를 들어, 항체는 다른 이용 가능한 폴리펩타이드와 달리 특정 폴리펩타이드 또는 에피토프에 특이적으로 결합함, 또는 SIRP α 폴리펩타이드의 결합)을 지칭한다. 일부 구현 예에서, 특이적으로 결합하는 다른 분자에 대한 한 분자의 친화도는 10^{-5} M 이하(예를 들어, 10^{-6} M 이하, 10^{-7} M 이하, 10^{-8} M 이하, 10^{-9} M 이하, 10^{-10} M 이하, 10^{-11} M 이하, 10^{-12} M 이하, 10^{-13} M 이하, 10^{-14} M 이하, 10^{-15} M 이하, 또는 10^{-16} M 이하)의 K_D (해리 상수)를 특징으로 한다. “친화도”는 결합의 강도를 지칭하는데, 결합 친화도의 증가는 더 낮은 K_D 와 상관된다.
- [0061] 본 명세서에서 사용된 용어 “특이적 결합 구성원”은 특이적 결합 쌍의 구성원(즉, 2개의 분자, 일반적으로 2개의 상이한 분자이되, 상기 분자들 중 하나, 예를 들어, 제1 특이적 결합 구성원이, 비-공유 수단을 통해, 다른 분자, 예를 들어, 제2 특이적 결합 구성원에 특이적으로 결합함)을 지칭한다. 적합한 특이적 결합 구성원에는, 특이적으로 CD47 및/또는 SIRP α 와 결합하는 제제(즉, 항-CD47 제제) 또는 달리 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 차단하는 제제가 포함된다.
- [0062] 용어들 “폴리펩타이드,” “펩타이드” 및 “단백질”은 아미노산 잔기들의 폴리머를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어들은 또한 하나 이상의 아미노산 잔기가 자연 발생 아미노산 폴리머 및 비-자연 발생 아미노산 폴리머뿐만 아니라, 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공 화학적 모방체인 아미노산 폴리머에 적용된다.
- [0063] 용어들 “식균 세포” 및 “식균세포”는 식균작용을 할 수 있는 세포를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 식균세포에는 세 가지 주요 범주가 있다: 대식세포, 단핵 세포(조직구 및 단핵구); 다형핵 백혈구(중성구) 및 수지상 세포.
- [0064] 환자와 관련하여 용어 “샘플”은 골수, 예를 들어 골수 천자; 혈액 및 생물학적 기원의 다른 액체 샘플, 고체

조직 샘플, 예컨대 생검 시료 또는 조직 배양물, 또는 그것에서 유래되거나 단리된 세포 및 그것의 자손을 아우른다. 상기 정의는 또한 그것의 조달 후 어떤 식으로든, 예컨대 시약으로 처리함으로써; 세정하여; 또는 특정 세포 모집단, 예컨대 암세포를 위해 강화(enrichment)에 의해 조작된 바 있는 샘플을 포함한다. 상기 정의는 또한 분자의 특정 유형, 예를 들어, 핵산, 폴리펩타이드 등이 풍부해진 샘플을 포함한다.

[0065] 용어 “생물학적 샘플”은 임상 샘플을 아우르고, 또한 외과적 절제에 의해 수득된 조직, 생검에 의해 수득된 조직, 배양액의 세포, 세포 상청액, 세포 용해물, 조직 샘플, 기관, 골수, 혈액, 혈장, 혈청, 및 기타 동종의 것을 포함한다. “생물학적 샘플”은 표적 세포 또는 정상적인 대조군 세포를 포함하거나 또는 그와 같은 세포 또는 그것에서 유래된 생체액(예를 들어, 암성 세포, 등)을 포함하는 것으로 의심되는 샘플, 예를 들어, 그와 같은 세포(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리펩타이드를 포함하는 세포 용해물 또는 다른 세포 추출물)에서 수득된 폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리펩타이드를 포함하는 샘플을 포함한다. 환자에서 유래된 종양 세포를 포함하는 생물학적 샘플은 또한 비-종양 세포를 포함할 수 있다.

[0066] 본 발명에 사용된 용어 “에피토프”는 항체의 파라토프가 결합하는, 항원 상의 임의의 항원 결정기를 의미한다. 에피토프 결정인자는 일반적으로 예컨대 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자들의 화학적 활성 표면 집단화로 이루어지고, 일반적으로 특이적 전하 특성뿐만 아니라 특이적 3차원 구조 특성도 갖는다.

[0067] 전혈구 계수(CBC) 및 말초혈액 바른 표본(peripheral smear)이 전체적인 건강을 평가하고, 광범위한 장애, 예컨대 빈혈, 감염 및 백혈병을 탐지하기 위해 사용된다. 전혈구 계수 테스트는 적혈구, 백혈구, 헤모글로빈, 적혈구 용적률, 혈소판 수 등을 비롯한, 혈액의 여러 성분 및 특징을 측정한다. 전혈구 계수에 드러난 바와 같이 세포수의 비정상적 증가 또는 감소는 추가 평가를 요구하는 기저의 의료 병태를 시사할 수 있다. 범혈구감소증 및 말초성 아세포는 급성 백혈병을 시사한다. 말초혈액 바른 표본에서 아세포는 혈액성 악성종양의 경우 WBC 계수의 100%에 접근할 수 있다.

[0068] 말초 혈액 중 감염된 아세포의 개수는 비록 그것이 무려 $100 \times 10^9/1\text{일}$ 수 있으나, 약 $10\sim40 \times 10^9/1\text{일}$ 수 있다. 만성 림프구성 백혈병(CLL)에서, 상기 계수는 일반적으로 실질적으로 상승되나($30\sim300 \times 10^9/1$), 그것의 형태적 외관이 특징적인 경우, $5\sim10 \times 10^9/1$ 의 낮은 계수에서도 상기 진단이 의심될 수 있다.

[0069] 혈액 차별적인 테스트는 상기 혈액에서 각각의 유형의 백혈구(WBC)의 백분율을 측정하고, 임의의 비정상 또는 미성숙한 세포가 존재하는지 여부를 밝힌다. 일반적으로, 상기 테스트는 중성구; 림프구, 단핵구, 호산구 및 호염기구를 센다.

[0070] CLL을 진단하기 위해, $5000/\text{mm}^3$ 초과인 림프구증가증이 존재할 수 있다. 절대적인 중성구 계수는 일반적으로 정상이고 적혈구 계수 및 혈소판 계수는 경도로 줄어든다. 또한, 상기 말초혈액 바른 표본 또는 골수는 55% 미만의 비정형 또는 아세포 형태를 갖는 정상적인 성숙한 작은 림프구를 나타내야 한다.

[0071] CML은 그것의 말초혈액 WBC 계수에 의해 정의된다. 전형적으로, 백혈구증가증은 $100,000/\text{mm}^3$ 를 초과한다. 상기 백혈구백분율수는 중성구 전구체가 존재함을 나타낸다. 이것은 호염기성 및 호산구증가증을 동반한다. AML에서의 세포들과 달리, 이들 세포는 성숙하고 기능적이다.

[0072] AML은 그것의 말초혈액 WBC 계수에 의해 진단될 수 있는데, 그것에 의하면 상기 혈액 중 적어도 20% 골수 아세포는 AML의 진단을 의미한다.

[0073] 흡인 또는 바늘 생검에 의한 골수 시험은 일상적으로 이루어질 수 있으나, 상기진단은 일반적으로 말초혈액 바른 표본에서 이루어질 수 있다. 골수에서의 아세포는 혈액성 악성종양의 경우 고전적으로 25 내지 95%이다.

[0074] 골수 흡인은 백혈병의 진단을 성립시킨다. 아세포의 형태는 일반적으로 ALL 및 AML 사이에서 분화할 수 있다. ALL의 경우, 림프아세포의 균질한 침윤물이 정상적인 골수 요소를 대체한다. 림프아세포는 일반적으로 작고, 대략 직경이 $14\mu\text{m}$ 이다. 이들은 과립이 없는 빈약한 세포질을 갖는다. 상기 핵은 핵소체(nucleoli)가 없거나 또는 구별되지 않는 작은 핵을 갖는다.

[0075] AML의 진단의 경우, 흡인액 중 유핵 세포의 적어도 20~30%(분류에 따라 달라짐)가 반드시 골수 기원의 아세포여야 한다. 다중 대형 핵소체, 연약한(delicate) 염색질, 회색-청색 세포질, 및 아우어 로드(Auer rods)는 골수아세포를 특징으로 한다. 아우어 로드의 존재는 사실상 AML의 진단의 기초가 되는데, 이들 응축된 리소좀 세포질 아주르친화성(azurophilic) 막대-형상화된 구조이 ALL에 나타나지 않기 때문이다.

- [0076] CLL의 경우, 골수 침윤은 30% 림프구를 초과한다. 상기 림프구는 성숙한 것으로 55% 미만의 비정형 또는 아세포 형태를 갖는다. 상기 핵은 둥글고, 세포질은 빈약하고, 염색질은 조밀하고, 핵소체는 눈에 띄지않고, 유사분열도 흔하지 않다.
- [0077] 세포-표면 항원에 대한 단클론성 항체로 표지한 뒤 멀티파라미터 유세포측정을 사용한 면역표현형검사, 이것은 림프아세포의 B 또는 T 세포 기원을 식별한다. B 계통-제한된 항원의 발현 및 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자의 클론 재배열에 기초하여, ALL 사례의 최대 80%가 B-세포 전구체에서 발생하는 것으로 추정된 바 있다. 상기 다수는 백혈병성 세포에만 존재하는 일반적인 ALL 항원(CALLA)을 소유한다. T-세포 ALL은 양 적혈구에 대한 수용체를 소유하고, 이들이 조합된 경우, 이들은 E-로젯(rosettes)을 형성한다. ALL의 또 다른 서브셋은 B- 또는 T-세포 특성이 없기에, 무효-세포 ALL이라 불린다.
- [0078] 특정 골수-특이적 항원, 예컨대 CD13, CD33, CD41 및 기타가 AML을 진단하기 위해 사용된 바 있다.
- [0079] CLL 중 악성 세포는 세포 표면 면역글로불린 M(IgM) 및 면역글로불린 D(IgD)를 발현하는 B 세포의 소수의 부분 모집단과 상기 T-세포 연관 항원 CD5에 상응한다.
- [0080] 마이엘로페록시다제 및 비특이적 에스테라제를 위한 조직화학 염색(레더 염색(Leder))은 골수성 전구체에 강한 친화도를 가지나, 림프구성 선조를 염색할 수 없다. 핵 DNA 중합 효소 말단 데옥시뉴클레오티딜 전달효소(TdT)의 출현은 림프양 기원을 시사한다. 그러나 AML 환자 중 최대 2~5%가 이와 같은 효소를 보인다. 악성 클론이 골수성 특성 및 림프구성 특성을 모두 발현할 수 있는 다분화능 세포에서 발생한 경우, 예외가 있을 수 있다.
- [0081] 염색체 분석 또한 아주 중요한 역할을 한다. CML의 진단은 염색체 9와 22 사이에 상호 전좌를 소유한 조혈 줄기 세포의 클론 팽창을 세포유전 차원에서 또는 분자 차원에서 식별함으로써, 성립된다. 백혈병성 세포의 염색체 분석은 현재 AML에서 가장 중요한 전처리 예후 정보를 제공한다.
- [0082] 용어 “항체”는 가장 광범위한 의미로 사용되는데, 구체적으로 단클론성 항체(예컨대, 전장 단클론성 항체), 다클론성 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체) 및 항체 단편(이들이 원하는 생물학적 활성을 보일 경우)을 포괄한다. “항체”(Abs) 및 “면역글로불린”(Igs)은 동일한 구조 특성을 갖는 당단백질이다. 항체가 특이적 항원에 대한 결합 특이성을 보이는 반면, 면역글로불린은 항체 및, 항원 특이성이 없는 다른 항체-유사 분자 모두를 포함한다. 후자 종류의 폴리펩타이드는 예를 들어, 림프계에 의해 낮은 수준으로, 골수중에 의해 증가된 수준으로 생산된다.
- [0083] 본 명세서에서 사용된 “항체 단편” 및 그것의 모든 문법적 변이체는 온전한 항체의 항원 결합 부위 또는 가변 영역을 포함하는 온전한 항체의 일부분으로 정의되되, 상기 일부분에는 상기 온전한 항체의 Fc 영역의 불변 중쇄 도메인(즉, 항체 아이소타입에 따라 CH2, CH3 및 CH4)이 없다. 항체 단편의 예에는 하기가 포함된다: Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아바디; 인접 아미노산 잔기들의 하나의 중단되지 않은 서열로 이루어진 일차 구조를 갖는 폴리펩타이드(본 명세서에서 “단일-사슬 항체 단편” 또는 “단일 사슬 폴리펩타이드”라 불림)인 임의의 항체 단편, 예컨대 비제한적으로(1) 단일-사슬 Fv(scFv) 분자 (2) 단 하나의 경쇄 가변 도메인을 함유한 단일 사슬 폴리펩타이드 또는 그것의 단편(연관된 중쇄 모이어티 없이, 경쇄 가변 도메인의 세 CDRs를 함유함) (3) 단 하나의 중쇄 가변 영역을 함유한 단일 사슬 폴리펩타이드, 또는 그것의 단편(연관된 경쇄 모이어티 없이 중쇄 가변 영역의 세 CDRs를 함유함) 및 (4) 비-인간 종에서 유래된 단일 Ig 도메인 또는 다른 특이적 단일-도메인 결합 모듈을 포함하는 나노바디; 및 항체 단편으로 형성된 다중특이적 또는 다가 구조.하나 이상의 중쇄를 포함하는 항체 단편에서, 상기 중쇄(들)은 온전한 항체의 비-Fc 영역에서 발견되는 임의의 불변 도메인 서열(예를 들어, IgG 아이소타입 중 CH1)을 함유할 수 있고, 및/또는 온전한 항체에서 발견되는 임의의 힌지 영역 서열을 함유할 수 있고, 및/또는 상기 중쇄(들)의 힌지 영역 서열 또는 불변 도메인 서열에 융합된 또는 그것에 위치하는 류신 지퍼 서열을 함유할 수 있다.
- [0084] 본 명세서에서 사용된 용어 “상관 관계가 있다” 또는 “~과 상관관계가 있다” 및 유사한 용어는 두 사건의 사례 사이에 통계적인 연관을 지칭하되, 사건에는 숫자, 데이터 세트 및 기타 동종의 것이 포함된다. 예를 들어, 상기 사건이 숫자를 수반할 경우, 양성 상관관계(또한 본 명세서에서 “정 상관관계”라 불림)는 하나가 증가할 경우, 다른 하나 역시 증가함을 의미한다. 음성 상관관계(또한 본 명세서에서 “역 상관관계”라 불림)는 하나가 증가할 경우, 다른 하나는 감소함을 의미한다.
- [0085] “투약량 단위”는 치료받을 특정 개인을 위해 일원화된 투약량으로 적합한 물리적으로 별개의 단위를 지칭한다. 각각의 단위는 활성 화합물(들)을 요구된 약제학적 담체와 연합하여 원하는 치료적 효과(들)을 생산하도록 계산된 사전결정된 양만큼 함유할 수 있다. 투약량 단위 제형에 대한 명세서항이 (a) 상기 활성 화합물(들)의 독특

한 특성 및 달성될 특정한 치료적 효과(들)에 의해, 및 (b) 그와 같은 활성 화합물(들)을 배합하는 기술에 고유한 제한요소들에 의해 결정될 수 있다.

[0086] "약제학적으로 허용 가능한 부형제"는 일반적으로 안전하고, 무독성이며 바람직한 약제학적 조성물을 제조하는데 유용한 부형제를 의미하고, 수의적 용도뿐만 아니라 인간 약제학적 용도를 위해 허용 가능한 부형제를 포함한다. 그와 같은 부형제는 고체, 액체, 반고체일 수 있고, 또는 에어로졸 조성물의 경우, 기체일 수 있다.

[0087] "약제학적으로 허용 가능한 염 및 에스테르"는 약제학적으로 허용가능하고, 원하는 약리적 특성을 갖는 염 및 에스테르를 의미한다. 그와 같은 염에는 본 화합물에 존재하는 산성 양성자가 무기 또는 유기 염기와 반응할 수 있도록 형성될 수 있는 염이 포함된다. 적합한 무기염에는 알칼리 금속, 예를 들어 나트륨 및 칼륨, 마그네슘, 칼슘, 및 알루미늄으로 형성된 것들이 포함된다. 적합한 유기 염에는 유기 염기, 예컨대 아민 염기, 예를 들어, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 트로메타민, N 메틸글루카민 및 기타 동종의 것으로 형성된 것들이 포함된다. 그와 같은 염에는 또한 무기 산(예를 들어, 염산 및 브롬화수소산) 및 유기산(예를 들어, 아세트산, 시트르산, 말레산, 및 알칸- 및 아렌-설폰산, 예컨대 메탄설폰산 및 벤젠설폰산)으로 형성된 산 부가 염이 포함된다. 약제학적으로 허용 가능한 에스테르에는 상기 화합물에 존재하는 카복시, 설포닐옥시, 및 포스포옥시 작용기로 형성된 에스테르, 예를 들어, C₁₋₆ 알킬 에스테르가 포함된다. 2개의 산성기가 존재하는 경우, 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 에스테르는 단일-산-단일-염 또는 에스테르이거나, 또는 이-염 또는 에스테르일 수 있고; 및 이와 유사하게 산성기가 2개 보다 더 많이 존재하는 경우, 그와 같은 작용기의 일부 또는 모두가 염화되거나 또는 에스테르화될 수 있다. 본 발명에 명명된 화합물은 비염화된 또는 비에스테르화된 형태로 존재하거나, 또는 염화된 및/또는 에스테르화된 형태로 존재할 수 있고, 그와 같은 화합물의 명명은 최초(비염화된 및 비에스테르화된) 화합물 및 그것의 약제학적으로 허용 가능한 염 및 에스테르 모두를 포함하도록 의도된다. 또한, 본 발명에 명명된 특정 화합물은 둘 이상의 입체이성질체 형태로 존재할 수 있고, 그와 같은 화합물의 명명은 모든 단일 입체이성질체 및 그와 같은 입체이성질체의 모든 혼합물(라세미이거나 아님)을 포함하도록 의도된다.

[0088] 용어들 "약제학적으로 허용 가능한", "생리적으로 허용되는" 및 그것의 문법적 변동들은, 이들이 조성물, 담체, 희석제 및 시약을 지칭하면서, 상호교환적으로 사용되고, 상기 물질이 상기 조성물의 투여를 금지시킬 정도로 바람직하지 않은 생리적 효과를 생산하지 않으면서, 인간에게 투여될 수 있음을 나타낸다.

[0089] 병용 요법

[0090] "~과 병용하여", "병용 요법" 및 "병용 생성물"은 특정 구현 예에서, 본원에 기재된 제제들을 환자에게 동반 투여하는 것을 지칭한다. 병용하여 투여된 경우, 각각의 성분은 동시에 또는 상이한 시점에 임의의 순서로 순차적으로 투여될 수 있다. 따라서, 각각의 성분은 별도로 투여될 수 있으나, 원하는 치료적 효과를 제공하기 위해 충분히 가까운 시간 내에 투여될 수 있다.

[0091] 본 발명의 방법에서 활성제제의 "수반되는 투여"는 상기 제제들이 동시에 치료 효과를 가질 수 있는 시점에 상기 시약을 투여하는 것을 의미한다. 그와 같은 수반되는 투여는 상기 제제들의 동반(즉 동시), 사전 혹은 후속 투여를 수반할 수 있다. 당업자는 본 발명의 특정 약물 및 조성물을 위한 투여의 적절한 타이밍, 순서 및 투여량을 결정하는 데 어려움이 없을 것이다.

[0092] 항-CD47 제제와 병용하여 투여될 수 있는 화학치료제에는 비제한적으로, 아비트렉세이트, 아드리아마이신, 아드루실, 암사크린, 아스파라기나제, 안트라사이클린, 아자시티딘, 아자티오프린, 비크누(bicnu), 블레녹산, 부셀판, 블레오마이신, 캄프토사르, 캄프토테신, 카보플라틴, 카무스틴, 세루비딘, 클로르암부실, 시스플라틴, 클라드리빈, 코스메젠, 사이타라빈, 사이토사르, 사이클로포스파마이드, 사이록산, 닥티노마이신, 도세탁셀, 독소루비신, 다우노루비신, 엘렌세, 엘스파, 에피루비신, 에토포시드, 플루다라빈, 플루오로우라실, 플루다라, 쟈시타빈, 쟈자르, 하이캄틴, 하이드록시우레아, 하이드레아, 이다마이신, 이다루비신, 이포스파마이드, 아이팩스(ifex), 이리노테칸, 란비스(lanvis), 류케란, 류스타틴, 마톨란, 메클로르에타민, 머캅토포린, 메토트렉세이트, 미토마이신, 미톡산트론, 미트라마이신, 뮤타마이신, 마이엘란, 마일로스르, 나벨빈, 니펜트, 노반트론, 온코빈, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 파라플라틴, 펜토스타틴, 플라티놀, 폴리카마이신, 프로카바진, 퓨린에톨, 할리트렉세드, 탁소테르, 탁솔, 테니포시드, 티오구아닌, 토뮤텍스, 토포테칸, 발루비신, 벨반, 베페시드, 빈블라스틴, 빈테신, 빈크리스틴, 비노렐빈, VP-16, 및 부몬(vumon)이 포함된다.

[0093] 항-CD47 제제와 병용하여 투여될 수 있는 표적화된 치료제에는, 비제한적으로, 티로신-키나제 억제제, 예컨대 이마티닙 메실레이트(글리벡, STI-571로도 알려짐), 게피티닙(이레싸, ZD1839로도 알려짐), 에를로티닙(타르세

바로 시판 중), 소라페닙(넥사바르), 수니티닙(수텐트), 다사티닙(스프라이셀), 라파티닙(타이커브), 닐로티닙(타지그나) 및 보르테조밐(벨케이드); 야누스 키나제 억제제, 예컨대 토파시티닙; ALK 억제제, 예컨대 크리조티닙; Bcl-2 억제제, 예컨대 오바토클락스, 벤클렉스타 및 고시폴; FLT3 억제제, 예컨대 미도스타우린(Rydapt), IDH 억제제, 예컨대 AG-221, PARP 억제제, 예컨대 이니파립 및 올라파립; PI3K 억제제, 예컨대 페리포신; VEGF 수용체 2 억제제, 예컨대 아파티닙; [D-Lys(6)]-LHRH에 연결된 AN-152(AEZS-108) 독소루비신; Braf 억제제, 예컨대 베무라페닙, 다브라페닙, 및 LGX818; MEK 억제제, 예컨대 트라메티닙; CDK 억제제, 예컨대 PD-0332991 및 LEE011; Hsp90 억제제, 예컨대 살리노마이신; 및/또는 소분자 약물 콘주게이트, 예컨대 빈타폴리드(Vintafolide); 세린/트레오닌 키나제 억제제, 예컨대 템시롤리무스(토리셀), 에버롤리무스(아피니토), 베무라페닙(젤보라프), 트라메티닙(메키니스트), 및 다브라페닙(타핀라르)이 포함된다.

[0094] 항-CD47 제제는 면역조절물질, 예컨대 사이토카인, 림포카인, 모노카인, 줄기 세포 성장 인자, 림프독소(LT), 조혈 인자, 집락 자극 인자(CSF), 인터페론(IFN), 부갑상선 호르몬, 티록신, 인슐린, 프로인슐린, 릴렉신, 프로릴락신, 여포자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH), 황체형성 호르몬(LH), 간 성장 인자, 프로스타글란딘, 섬유아세포 성장 인자, 프로락틴, 태반 락토겐, OB 단백질, 형질전환 성장 인자(TGF), 예컨대 TGF- α 또는 TGF- β , 인슐린-유사 성장 인자(IGF), 에리트로포이에틴, 트롬보포이에틴, 종양 괴사 인자(TNF), 예컨대 TNF- α 또는 TNF- β , 물레리안-억제 물질, 마우스 고나도트로핀-연관 펩타이드, 인히빈, 액티빈, 혈관 내피 성장 인자, 인테그린, 과립구-집락 자극 인자(G-CSF), 과립구 대식세포-집락 자극 인자(GM-CSF), 인터페론 예컨대 인터페론- α , 인터페론- β , 또는 인터페론- γ , S1 인자, 인터류킨(IL), 예컨대 IL-1, IL-1cc, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 IL-21 또는 IL-25, LIF, 킷-리간드, FLT-3, 안지오테틴, 트롬보스폰딘, 엔도스타틴 및 LT와 병용하여 투여될 수 있다.

[0095] 항-CD47 제제와 병용하여 투여될 수 있는 종양 특이적 단클론성 항체에는, 비제한적으로, 켄투주맵 오조가마이신(Myelotarg), 리톡시맵(MabThera 또는 리톡산으로 시판 중), 트라스투주맵(헤르셉틴), 알렘투주맵, 세톡시맵(에비투스로 시판 중), 파니투무맵, 베바시주맵(아바스틴으로 시판 중) 및 이필리무맵(예르보이)이 포함된다.

[0096] 특히 관심의 대상은 항-CD47 제제와의 병용을 위한 저메틸화(후성유전학으로도 알려져 있음) 제제이다. 저메틸화제는 DNA 메틸화를 억제하는 약물이다. 현재 이용가능한 저메틸화제는 DNA 메틸전달효소(DNA 메틸전달효소 억제제 / DNMT 억제제)의 활성을 차단한다. 현재 상기 부류의 두 구성원, 아자시티딘 및 데시타빈은 미국에서 사용되는 것에 대해 FDA 승인을 받았다. 구아데시타빈 또한 관심대상이다. 그것의 상대적으로 온건한 부작용 때문에, 아자시티딘 및 데시타빈이 특히 고령 환자 및 동반질환(co-morbidities)이 있는 환자의 치료에 적합하다. 두 약물 모두 이롭지 않은 세포유전적 특성을 갖는 AML 아세포에 대항한 현저한 활성을 갖는다.

[0097] 혈액성 악성종양, 예를 들어 백혈병의 치료는 하나 이상의 치료적 독립체와 병용될 수 있다. 일부 구현 예에서, 면역 반응 조절제 중 상기 추가의 치료적 독립체, 면역 검문 단백질은 표적 세포, 특히 본 발명의 방법에서 종양 세포에 대항하여 면역 반응성을 감소시키도록 작용하는 면역 억제성 분자이다. T 세포에 의한 종양에 대한 내인성 반응은 면역 검문(면역 억제성 단백질)을 활성화하고 공동자극 수용체(면역 활성화 단백질)를 억제하는 종양 세포에 의해 비정상적으로 조절될 수 있다. 당업계에서 “면역 검문 억제제”로 불리는 치료제의 부류는 억제성 신호의 길항제를 투여함으로써 면역 반응의 억제를 뒤집는다. 다른 면역요법은 면역 공동자극 분자의 작용약을 투여하여 반응성을 증가시킨다.

[0098] 임상 암 면역요법, 세포독성 T-림프구-연관된 항원 4(CTLA4; CD152로도 알려짐) 및 프로그래밍된 세포사 단백질 1(PD1; CD279로도 알려짐)의 맥락에서 가장 적극적으로 연구된 바 있는 면역-검문 수용체는 모두 억제성 수용체이다. 이들 수용체들 중 어느 하나를 차단하는 항체의 임상적 활성은 항종양 면역력이 다중 수준으로 증진될 수 있고, 병용 전략이 기계론적인 고려사항들 및 전임상 모델에 의해 지능적으로 설계 및 유도될 수 있음을 암시한다.

[0099] CTLA4는 T 세포 상에서 독점적으로 발현되는데, 이때 주로 T 세포 활성화의 초기 단계의 진폭을 조절한다. CTLA4는 T 세포 공동자극 수용체, CD28의 활성을 무효화한다. CD28 및 CTLA4는 하기의 동일한 리간드를 공유한다: CD80(B7.1로도 알려짐) 및 CD86(B7.2로도 알려짐). CTLA4의 주요한 생리적 역할은 헬퍼 T 세포 활성화의 하향조절 및 조절 T(TReg) 세포 면역억제성 활성의 증진이다. CTLA4 차단은 면역 반응의 광범위한 증진을 초래한다. 두 개의 완전 인간화된 CTLA4 항체인 이필리무맵 및 트레멜리무맵은 임상 시험 및 용도로 쓰인다. 임상적으로, 면역-검문 차단제에 대한 반응은 느리고, 많은 환자에게서, 치료 개시 후 최대 6 개월까지 지연되었다.

- [0100] 다른 면역-검문 단백질은 PD1 및 PDL1이다. 이들 표적에 대한 현재 임상 용도에 쓰이는 항체에는 니볼루맙 및 펌브롤리주맙이 포함된다. PD1의 주요 역할은 감염에 대한 염증 반응의 시기에 말초 조직에서의 T 세포의 활성을 제한하고, 자가면역을 제한하는 것이다. PD1 발현은 T 세포가 활성화될 때 유도된다. PD1은 그것의 리간드들 중 하나에 의해 관여될 때, T 세포 활성화에 관여되는 키나제를 억제한다. PD1은 T_{Reg} 세포 상에서 상당히 높게 발현되는데, 이것은 리간드의 존재 하에 그것의 증식을 증진시킬 수 있다. 많은 종양이 T_{Reg} 세포로 상당히 침윤되기 때문에, 상기 PD1 경로의 차단은 또한 종양내 T_{Reg} 세포의 개수 및/또는 억제성 활성을 축소시킴으로써 항종양 면역 반응을 증진시킬 수 있다.
- [0101] 림프구 활성화 유전자 3(LAG3; CD223 로도 알려짐), 2B4(CD244 로도 알려짐), B 및 T 림프구 감쇠기(BTLA; CD272 로도 알려짐), T 세포막 단백질 3(TIM3; HAVcr2 로도 알려짐), 아데노신 A2a 수용체(A2aR) 및 킬러(killer) 억제성 수용체의 계열은 각각 림프구 활성화의 억제와 연관된 바 있고, 일부 경우에 림프구 무력증의 유도와 연관된 바 있다. 이들 수용체의 항체 표적화가 본 발명의 방법에 사용될 수 있다.
- [0102] TIM3은 T 헬퍼 1(T_H1) 세포 반응을 억제하고, TIM3 항체는 항종양 면역력을 증진시킨다. TIM3은 또한 종양-특이적 $CD8^+$ T 세포 상에서 PD1과 공-발현되는 것으로 보고된 바 있다. Tim3 차단제는 이와 같은 억제성 신호전달을 극복하고, 항종양 T 세포 기능을 유지 또는 회복시킬 수 있다.
- [0103] BTLA는 TNFRSF14와 상호작용하는 T 세포 상의 억제성 수용체이다. BTLA^{hi} T 세포는 그것의 리간드의 존재 하에 억제된다. 상호작용하는 분자들의 시스템은 하기와 같이 복잡하다: CD160(면역글로불린 슈퍼패밀리 일원) 및 LIGHT(TNFSF14로도 알려져 있음)는, 각각 억제성 및 공동자극 활성을 매개한다. 신호전달은 상호작용의 특이적 조합에 따라 달라지는 양방향성일 수 있다. BTLA 및 PD1의 이중 차단이 항종양 면역력을 증진시킨다.
- [0104] A2aR(이것의 리간드가 아데노신임)는 부분적으로 $CD4^+$ T 세포를 구동시켜 FOXP3를 발현하고, 그러므로 T_{Reg} 세포로 발달함으로써, T 세포 반응을 억제한다. 이와 같은 수용체의 결핍은 감염에 대한 향상된 및 때때로 병리적인 염증 반응을 초래한다. A2aR는 아데노신 결합을 차단하는 항체 또는 아데노신 유사체 중 하나에 의해 억제될 수 있다.
- [0105] 면역 공동자극 분자를 괴롭히는(agonize) 제제들이 또한 본 발명의 방법에 유용하다. 그와 같은 제제에는 작용제 또는 CD40 및 OX40가 포함된다. CD40은 항원 제시 세포(APCs) 상에서 발견되는 공동자극 단백질로, APCs 활성화를 위해 요구된다. 이들 APCs에는 식균세포(대식세포 및 수지상 세포) 및 B 세포가 포함된다. CD40은 TNF 수용체 계열의 일부이다. CD40에 대한 일차 활성화 신호전달 분자는 $IFN\gamma$ 및 CD40 리간드(CD40L)이다. CD40을 통한 자극은 대식세포를 활성화한다. CD47 차단제의 주요 효과 중 하나는 대식세포 및 다른 식균세포에 의한 표적 세포의 식균작용의 증진이다. 따라서, 작용적(agonistic) CD40 리간드를 항CD47과 조합하면 각각의 단일 요법과 비교하여 치료적 효능이 증진될 수 있다(실시예 1). 작용적 CD40 제제는 실질적으로 항-CD47 제제와 동시에 투여되거나; 또는 대식세포를 사전활성화하기 위해 항-CD47로의 치료 전에 그리고 그것과 동시에 투여될 수도 있다.
- [0106] 면역 종양 미세환경을 바꾸는 제제가 본 발명의 방법에 유용하다. 그와 같은 제제에는 면역억제성 효과를 나타내는 효소인 인돌아민-2,3-디옥시게나제(IDO)의 생산을 억제하는 IDO 억제제가 포함된다.
- [0107] 본 명세서에서 기재된 방법에 따라 CD47 차단제와 병용하여 투여될 수 있는 다른 면역-종양학 제제에는 케모카인 수용체에 특이적인 항체, 예컨대 비제한적으로 항-CCR4 및 항-CCR2가 포함된다. 관심대상인 항CCR4(CD194) 항체에는 잠재적인 항-염증성 및 항신생물성 활성을 가진 C-C 케모카인 수용체 4(CCR4)에 대항하는 인간화된 단클론성 항체가 포함된다. 모가물리주맙이 예시적인데, 이것은 선택적으로 CCR4와 결합하거나 또는 그것의 활성을 차단하고, 이것은 CCR4-매개 신호 형질도입 경로를 억제하고, 그럼으로써 T 세포의 케모카인-매개 세포 이동 및 증식과 케모카인-매개혈관신생을 억제할 수 있다. 또한, 이와 같은 제제는 CCR4-양성 T 세포에 대항하는 항체-의존적 세포-매개 세포독성(ADCC)을 유도할 수 있다. C-C 케모카인에 대한 G-커플링된-단백질 수용체인 CCR4, 예컨대 MIP-1, RANTES, TARC 및 MCP-1은 T 세포의 일부 유형, 내피 세포 및 뉴런의 일부 유형의 표면에 발현된다. CD194로도 알려진 CCR4는 성인 T-세포 림프종(ATL) 및 말초혈액 T-세포 림프종(PTCL) 세포 상에서 과발현될 수 있다.
- [0108] 앞서 기재된 병용 요법은 조절 T 세포에 작용하는 기타 제제, 예를 들어 항-CTLA4 Ab, 또는 다른 T 세포 검문 억제제, 예를 들어 항-PD1, 항-PDL1 항체 및 기타 동종의 것과 조합될 수 있다.

- [0109] 일부 구현 예에서, 본 발명의 제제들의 조합물의 투여는 환자 적혈구 용적률을 증가시키는 제제, 예를 들어 에리트로포이에틴 자극제(ESA)의 효과적인 용량과 조합된다. 그와 같은 제제는 당업계에 알려져 있고 사용되고 있으며, 예를 들어, 아라네스프® (다르베포에틴 알파), 에포젠®/프로크리트® (에포에틴 알파), 오몬타이스® (페기네사타이드), 프로크리트® 등을 포함한다. 예를 들어, US 특허 번호 제9,623,079호를 참고.
- [0110] 방법
- [0111] 항-CD47 제제의 치료적으로 효과적인 용량의 투여가 임상적으로 효과적인 기간 내에 치료 수준을 달성하면서, 용량의 안전한 단계적 확대를 제공하는 스케줄로 제공된다. 상기 방법은 청소, 단계적 확대, 및 유지의 단계들을 포함할 수 있다. 일 구현 예에서, 상기 투약 용법은 후속적인 치료를 위해 순환하는 종양 세포의 안전한 수준을 달성하기 위해 초기(i) 치료 이하 용량의 항-CD47 제제 또는 (ii) 세포감퇴 요법을 투여하는 단계(청소); 치료적 용량이 도달될 때까지 항-CD47 제제의 용량을 상승시키는 단계(단계적 확대); 및 상기 환자의 골수에서 종양 세포를 감소시키기에 충분한 기간 동안 치료적 용량을 유지하는 단계(유지)를 시행한다.
- [0112] 대안적인 투약 용법의 경우, 시행 시에 안전한 수준의 순환하는 종양 세포를 갖는 것으로 결정된 환자는 단계적 확대 및 유지의 단계들에 의해 치료되는데, 하기를 포함한다: 치료적 용량이 도달될 때까지 항-CD47 제제의 용량을 상승시키는 단계(여기서 상기 환자의 골수 아세포에서 약 80%를 초과하는 수용체 점유율이 달성된다)(단계적 확대); 및 상기 환자의 골수에서 종양 세포를 감소시키기에 충분한 기간 동안 치료적 용량을 유지하는 단계(유지).
- [0113] 투약량 및 빈도는 상기 환자에서 항-CD47 제제의 반감기에 따라 달라질 수 있다. 그와 같은 지침이 예를 들어 항체 단편의 사용 시, 항체 콘주게이트의 사용 시, SIRP α 시약의 사용 시, 가용성 CD47 펩타이드의 사용 시에, 상기 활성 제제의 분자량에 대해 조정될 것임은 당업자에 의해 이해될 것이다. 투약량 또한 국소화된 투여, 예를 들어 비강내, 흡입, 등의 경우에, 또는 전신 투여, 예컨대, i.m., i.p., i.v., 및 기타 동종의 것의 경우에 달라질 수 있다.
- [0114] 키트
- [0115] 또한 본 방법에 사용하기 위한 키트가 제공된다. 본 발명의 키트에는 항-CD47 제제가 포함된다. 일부 구현 예에서, 항-CD47 제제가 하나의 제형(예를 들어, 치료적으로 효과적인 제형)으로 제공된다. 일부 구현 예에서, 항-CD47 제제가 둘 이상의 상이한 제형(예를 들어, 둘 이상의 상이한 치료적으로 효과적인 제형)으로 제공된다. 키트의 맥락에서, 프라이머 제제 및/또는 항-CD47 제제가 임의의 편리한 포장(예를 들어, 스틱 팩, 용량 팩 등)으로 액체 또는 고체 형태로 제공될 수 있다.
- [0116] 상기 성분들과 더불어, 본 발명의 키트는 추가로 (특정 구현 예에서) 본 방법을 실행하기 위한 지침을 포함할 수 있다. 이들 지침은 다양한 형태로 본 발명의 키트에 존재할 수 있는데, 이들 중 하나 이상은 상기 키트에 존재할 수 있다. 이들 지침이 존재할 수 있는 하나의 형태는 포장 삽입물 및 기타 동종의 것에 상기 키트의 포장 시, 적합한 매체 또는 기관상에 인쇄된 정보, 예를 들어, 상기 정보가 인쇄된 종이 한 장 또는 여러 장일 수 있다. 그러나 이들 지침의 다른 형태는 컴퓨터 판독가능 매체, 예를 들어, 디스켓, 콤팩트 디스크(CD), 플래시 드라이브 및 동종의 것으로, 여기에 상기 정보가 기록되었다. 그러나, 존재할 수 있는 이들 지침의 또 다른 형태는 오픈 사이트에서 상기 정보에 접근하도록 인터넷을 통해 사용될 수 있는 웹사이트 주소이다.
- [0117] 이제 본 발명이 완전하게 기재됨으로써, 본 발명의 사상 또는 범위에서 이탈하지 않으면서 다양한 변화 및 변형이 이루어질 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다.
- [0118] 실험
- [0119] 하기 실시 예는 당업자에게 완전한 개시내용 및 설명을 제공하기 위해 제시되고, 상기 발명자들이 그것의 발명으로 간주하는 것의 범위를 한정하고자 하는 것이거나 하기 실험들이 수행된 모든 또는 유일한 실험임을 나타내기 위해 의도된 것도 아니다. 사용된 숫자(예컨대, 양, 온도 등)와 관련하여 정확도를 확보하기 위해 노력을 기울였으나, 일부 실험 오차 및 편차가 감안되어야 한다. 달리 나타내지 않는 한, 부(parts)는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨이며, 압력은 대기압 또는 대기압 근처이다.
- [0120] 본 명세서에 인용된 모든 공보 및 특허 출원은, 마치 각각의 개별 공보 또는 특허 출원이 구체적으로 그리고 개별적으로 참고로 편입된 것으로 보이듯이, 본원에 참고로 편입되었다.
- [0121] 본 발명은 본 발명자에 의해 발견되거나 또는 제안된 특정 구현 예의 관점에서 기재되어 본 발명의 실시를 위한 바람직한 방식을 포함한다. 본 발명의 의도된 범위에서 이탈하지 않으면서, 본 개시내용에 비추어, 수많은 변형

및 변화가 예시된 특정 구현 예에서 이루어질 수 있음이 당업자에 의해 인정될 것이다. 예를 들어, 코돈 중복 (redundancy) 때문에, 단백질 서열에 영향을 미치지 않으면서 기저의 DNA 서열에 변화가 이루어질 수 있다. 나아가, 생물학적 기능적 등가성 고려사항들 때문에, 생물학적 작용에 영향을 미치지 않으면서, 단백질 구조 중 종류 또는 양의 측면에서 변화가 이루어질 수 있다. 그와 같은 모든 변형은 첨부된 청구항들의 범위 내에 포함 되도록 의도된 것이다.

[0122] 실시예 1

[0123] CD47를 인간 급성 골수성 백혈병(AML) 줄기세포 및 다른 암세포 상에서 높게 발현하였다. 그것은 인간 대식세포에 의한 암세포의 식균작용을 억제하였다. CD47의 차단으로 대식세포가 식균작용을 통해 AML을 제거할 수 있었다. 따라서, CD47은 치료적 항체 표적이다. CD47-결합제는 백혈병 및 다른 암세포, 또는 다른 이환 세포의 제거를 초래하였다. 만약 대상체가 순환하는 이환 세포, 예를 들어 순환하는 백혈병 또는 림프종 세포의 높은 부담을 갖고 있다면, 상기 CD47 결합제가 상기 CD47 표적 요법의 잠재적인 생명 위협 독성으로 이어질 수 있는 응집 및/또는 용해 뿐만 아니라 다른 세포 사멸 및 이환 세포의 제거를 초래할 수 있다. 따라서 급성 생명 위협 부작용을 방지하는 투약 전략이 요구된다. 우리는 CD47 표적 요법의 용량을 서서히 증가시켜 순환하는 질환의 부담을 낮춤으로써, 이들 독성을 방지하는 대상체 내(intra-subject) 용량 단계적 확대 전략을 확립한 바 있다.

[0124] 우리는 CD47-SIRP알과 경로 차단 요법을 시험하기 위해 인간 AML 이중이식 마우스 모형을 확립한 바 있다. 우리는 순환하는 AML 세포의 초고 부담을 나타내는 AML 세포(총 백혈구 수 >50%)로 이중이식된 마우스 및 AML(>90%)이 있는 골수 침윤에서, 항-CD47 항체(Hu5F9-G4)로의 CD47 표적 요법이 종종 첫 번째 용량의 투여 후 1시간 내에 사망을 야기함을 발견하였다. 상기 약물의 더 높은 후속적인 용량의 투여 전에 먼저 상기 혈액 내 순환하는 AML 세포의 양을 감소시키기 위해 저용량의 Hu5F9-G4를 사용한 경우, 이들 마우스에서 현저하게 조기 사망이 예방될 수 있었다. 이와 같은 대상체 내 용량 단계적 확대는 조기 사망을 방지했을 뿐만 아니라 백혈병성 세포의 안전한 청소를 야기하였다.

[0125] 대상체내 용량 단계적 확대는 (1) 저용량의 항-CD47 Ab로 초기 치료함으로써 조기 사망 증후군을 방지하고, (2) 저용량의 항-CD47 Ab 또는 세포감퇴 제제로 초기 치료함으로써 백혈병 세포의 말초 혈액을 감소 또는 청소할 수 있고, (3) 정상적인 및 백혈병성 세포를 저용량의 항-CD47 Ab로 포화시켜 세포 응집 및 연관된 독성을 방지 및/또는 감소시키고, 및 (4) 궁극적으로 상기 혈액 및 골수에서 유래된 질환을 제거(clear)할 수 있는 더 높은 후속적인 용량의 안전한 투여를 가능하게 한다. 따라서, 초기 저용량의 항-CD47 Ab는 말초 혈액을 청소하고, 더 높은, 치료적 용량의 투여를 촉진한다.

[0126] 실시예 2

[0127] 아자시티딘과 Hu5F9-G4와의 병용 치료가 인간 대식세포에 의한 급성 골수성 백혈병 암세포의 식세포 제거를 증진시킨다

[0128] AML의 치료를 위해 아자시티딘과 Hu5F9-G4의 병용을 평가하였다. 아자시티딘(비다자[®])는 급성 골수성 백혈병(AML)의 치료를 위해 사용 중인 화학요법 제제이다. 아자시티딘의 항암 효과는, 빠르게 분열하는 암세포의 사멸을 야기하는 직접적인 세포독성 효과를 생산하기 위해, 세포 대사에 간섭뿐만 아니라, 탈메틸화 또는 데옥시리보핵산(DNA)의 메틸화의 방해에 기인하는 것으로 여겨진다.

[0129] 녹색 형광 단백질(GFP) 인코딩 렌티바이러스가 이전에 형질도입된 바 있는 급성 전골수구성 백혈병 세포(HL60)를 0 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 및 15 μ M 농도의 아자시티딘의 용량을 증가시키면서 24시간 동안 배양하였다. HL60 백혈병 세포를 나중에 10 μ g/ml의 농도에서 Hu5F9-G4 Ab의 존재 또는 부재 하에, 인간 단핵구에서 유래된 인간 대식세포와 함께 2시간 동안 공배양하였다. 대식세포를 항-CD206 Ab로 표지하고, 모든 세포를 유세포측정에 의해 분석하여 HL60 백혈병 세포의 식균작용을 판단하였다. HL60 백혈병 세포의 식균작용을 대식세포의 총수와 비교하여 GFP 양성, HL60 장악형(engulfing) 대식세포의 백분율로 판단하였다. 결과는 최대 식균작용(100%)의 조건으로 정규화하였다.

[0130] 3 μ M의 농도의 아자시티딘과 Hu5F9-G4의 병용은 단일 제제: 아자시티딘 또는 Hu5F9-G4으로만 처리된 HL60 백혈병 세포의 식균작용과 비교하여, 인간 대식세포에 의한 HL60 백혈병 세포의 식세포 제거를 증진시켰다. 상기 3 μ M 아자시티딘 용량을 선택한 것은 그것이 환자의 아자시티딘의 근사치 피크 혈장 농도이기 때문이다. 1 μ M 농도의 아자시티딘은 HL60 백혈병 세포의 식세포 제거를 증진시키지 않았다. 15 μ M 농도의 아자시티딘은 Hu5F9-G4와 병용하여 3 μ M 농도의 아자시티딘보다 HL60 백혈병 세포의 식세포 제거를 증진시키지 않았다. 이들 결과

는 2개의 상이한 단핵구 공여체에서 유래된 대식세포에 대한 2개의 상이한 검정에서 일관되었다.

- [0131] 요약하면, 3 μM 농도의 아자시티딘과 Hu5F9-G4의 병용이, 아자시티딘 또는 Hu5F9-G4로의 단일 제제 치료와 비교하여, *시험관내에서* 인간 대식세포에 의한 HL60 백혈병 세포의 식세포 제거를 상당히 증진시켰다. 이들 실험은 AML 환자에서 Hu5F9-G4와 아자시티딘의 병용에 대한 효능의 전임상적 입증에 제공한다.
- [0132] 임상적으로, Hu5F9-G4는 1) 연령 및/또는 동반이환 때문에 표준 유도 화학요법 또는 동종이계 조혈 세포 이식에 부적격한 치료 미접촉 AML 환자; 2) 재발하거나 및/또는, 1차 저메틸화제 또는 표준 요법에 불응하는 AML; 3) 이전에 치료받지 않은 중급 및 고위험 골수이형성 증후군(MDS) 환자; 및 4) 재발한 및/또는 일류 저메틸화제에 불응한 MDS 환자의 치료를 위해, 아자시티딘, 데시타빈, 또는 다른 저메틸화제와 병용될 수 있다.
- [0133] 이와 같은 연구는 아자시티딘과 Hu5F9-G4의 병용이, 아자시티딘 또는 Hu5F9-G4로의 단일 제제 치료와 비교하여, 시험관내 인간 대식세포에 의한 HL60 백혈병 세포의 식세포 제거를 증진시킬 수 있음을 입증한다.
- [0134] 실시예 3
- [0135] Hu5F9-G4 용량 단계적 확대 치료가 높은 질환 부담을 갖는 마우스에서 급성 사망을 방지한다
- [0136] 이와 같은 연구에서, 마우스 이중이식 모형에서 인간 AML 질환에 대항하는 Hu5F9-G4, 인간화된 항-CD47 항체에 의해 유도된 조기 사망에 대한 예방적 전략으로서, 용량 단계적 확대 용법을 조사하였다. 사전 연구에서, 우리는 Hu5F9-G4의 초기 치료적 용량이 AML 이식 마우스에서 조기 사망을 야기함을 관측하였다. 우리는 또한 조기 사망을 야기하기 쉬운 높은 수준의 순환하는 백혈병 세포를 가진 상기 마우스에서, 조기 사망이 순환하는 질환의 부담과 관련된 것으로 보임을 관측하였다. 우리는 Hu5F9-G4의 초기 저용량이 순환하는 질환을 제거하고, 그리고 나서 골수를 청소하기 위해 더 높은, 치료적 용량의 투여를 촉진한다고 가정하였다.
- [0137] 초고 순환하는 백혈구(총 백혈구 수 > 50%)로 이중이식된 마우스 및 AML(> 80%)을 갖는 골수 침윤에서, Hu5F9-G4 치료는 첫 번째 용량의 투여 후 1시간 이내에 사망을 야기하였다. 본 연구의 목적은 백혈병 세포가 사멸되는 속도를 감소시킴으로써, AML-이중이식된 마우스에서 관측된 조기 사망이 방지될 수 있는지 여부를 판단하는 것이었다. 광범위한 임상 병리학 및 조직학적 분석은 사망의 원인을 명확하게 규명하지 못했다. 조기 사망은 백혈병성 세포의 응집 또는 종양 용해 중 하나 때문일 수 있으며, 백혈병 세포가 사멸되는 속도를 감소시킴으로써 조기 사망이 방지될 수 있다는 가설을 세웠다.
- [0138] 후자 가설을 시험하기 위해, 1 μg 내지 100 μg 에 달하는 초기 용량의 Hu5F9-G4로 마우스를 처리하였다. Hu5F9-G4 100 μg 으로 처리된 다섯 마리 마우스 중 네 마리가 죽었고, Hu5F9-G4 10 μg 으로 처리된 다섯 마리 마우스 중 한 마리가 죽었으나; Hu5F9-G4 1 μg 으로 처리한 다섯 마리 마우스 중 다섯 마리에서 어떤 조기 사망도 관측되지 않았다.
- [0139] 낮은 초기 용량의 Hu5F9-G4를 사용하는 것이 안전하게 질환을 경감시킬 수 있는지 여부와 그 후 더 높은 용량이 질환을 치유하기 위해 사용될 수 있는지 여부를 판단하기 위해, 동일한 연구에서 생존한 마우스에 계속 투약하였다. 마우스를 하기 Hu5F9-G4 투약 반응식으로 처리하였다: 집단 I - 14일 동안 100 μg /일, 집단 II - 7일 동안 10 μg /일, 이어서 14일 동안 100 μg /일 및 집단 III - 7일 동안 1 μg /일, 이어서 7일 동안 10 μg /일, 이어서 14일 동안 100 μg /일. Hu5F9-G4 초기 용량 100 μg 을 주입한 집단 I의 다섯 마리 마우스 중 네 마리가 조기 사망 증후군을 겪었다. 유일한 생존 마우스는 항체 100 μg 의 나머지 14회 투여를 견디고, 질환이 깨끗이 나왔다. Hu5F9-G4 초기 용량 10 μg 을 투여받은 집단 II의 다섯 마리 마우스 중 한 마리가 조기 사망을 겪었고; 나머지 네 마리 마우스는 Hu5F9-G4 10 μg 의 처음 7회 투여 및 후속적인 100 μg 14회 투여 후 생존하였다. Hu5F9-G4 초기 용량 1 μg 을 투여받은 집단 III의 마우스 중 조기 사망한 마우스는 없었으나; 질환의 청소는 1 μg 7회 투여, 10 μg 7회 투여 및 100 μg 14회 투여 후 현저히 줄어들었고, 치료 종료 후 몇 주가 지나 마우스는 재발하였다. 대조군의 모든 마우스는 계속해서 병이 진행되어 죽었다. Hu5F9-G4의 용량-단계적 확대 용법을 받은 실험군은 질환 및 AML 세포의 증가된 부담을 가졌고, 초기 치료의 정지 후 재발하였다. 재치료로 상기 질환이 깨끗이 나왔고, 일부의 경우에 장기간 질환이 없는 생존이 지속되었다. 결과는 도 2 및 3에 나타내었다.
- [0140] 실시예 4
- [0141] AML에서 약동학적 및 효능 프로파일
- [0142] 정상 조직상에 널리 퍼진 CD47의 발현을 감안할 때, Hu5F9-G4의 치료적 용량은 백혈병성 세포를 포화시키고 제거하기 위해서 내부 CD47 싱크대를 포화시킬 수 있어야만 한다. AML 1기 실험에서, Hu5F9-G4 투약 용법이 상기 내부 CD47 싱크대를 포화시킬 수 있고, 임상적으로 실행 가능한 투약으로 유의미한 순환하는 약물 수준을 야기

할 수 있음을 실증하였다.

- [0143] 전-임상 모형에서, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 Hu5F9-G4 최저치가 효능과 연관됨이 밝혀졌다(청색 점선). 이와 같은 최저치는 상기 1기 실험에서 투약을 안내하는 최소 최저치 목표로 작용한다. $3\text{mg}/\text{kg}$ 이하의 용량 수준은 목표 최저치를 달성하지 못했다. 관측된 신속한 정점 및 최저치는 CD47 싱크대의 비-선형 포화 때문에 목표-매개 배치와 일치하였다. 따라서 $3\text{mg}/\text{kg}$ (집단 1 및 2)의 농도 이하에서 요법에 대한 반응이 기대되거나 관측되지 않았다. $10\text{mg}/\text{kg}$ 이상의 용량 수준(집단 3 및 4)은 제1 반응 평가의 시기인 약 4 주 만에 목표 최저치를 달성하였다.
- [0144] 실시예 5
- [0145] AML에서 Hu5F9-G4 치료의 치료 효과
- [0146] 매주 2회 Hu5F9-G4를 최대 $10\text{mg}/\text{kg}$ 투여 받은 환자(집단 3)에서, 환자 세 명 중 두 명(106 및 702)이 생물학적 항백혈병성 활성을 보였다. 이들 환자 두 명은, 전임상 쥐과 이중이식 모형에서 관측된 Hu5F9-G4 항-백혈병성 활성과 유사하게, 현저한 저세포성 골수 및 절대적인 아세포 계수 감소를 나타내었다. 생물학적 활성을 갖는 이들 환자의 경우 몇 개의 추가의 인자가 주목할 만하다. 우선, 이들 두 환자 중 한 명은 $>50\%$ 아세포 감소를 갖는 부분적인 반응(PR)을 보였고, 내구성 반응이 6개월에 걸쳐 나타났고 계속 진행 되었다. 임상적으로, 이와 같은 환자는 요법을 잘 견뎠으며, 치료 전 대략 매주에서 3개월 동안 및 치료 이후에 월 1회로 RBC 수혈 요건에 유의미한 개선을 보였다.
- [0147] Hu5F9-G4 활성의 약력학적 측정치로서, 모든 환자에게서 골수 중 백혈병성 아세포 상의 CD47 수용체 점유율을 측정하였다. 생물학적 반응을 보인 이들 두 환자에서, 백혈병성 골수 세포 상에 $50\sim 60\%$ CD47 수용체 점유율이 관측되었고, 이것은 Hu5F9-G4에 의한 종양 세포 침투(engagement)를 입증하였다.
- [0148] 대식세포 및 T 세포 특이적 항-백혈병성 활성을 유도할 때 Hu5F9-G4의 MOA에 기초하여, 내구성 반응을 보이는 이와 같은 환자에서 종양 미세환경(골수) 중 면역 효과기 세포의 존재를 평가하였다. Hu5F9-G4에 의해 유도된 상당한 저세포성(hypocellularity)에도 불구하고, 치료 4주차에 상당한 수의 대식세포(CD68 또는 CD163 염색에 의해 평가함)가 골수에 존재하였다. 게다가, 골수로의 T 세포 침윤이 치료 기간 동안 현저하게 증가하였다: $10\sim 15\%$ T 세포 침윤물이 기준선에 존재하였고, 요법 시행 8주차에 모든 골수 세포의 $40\sim 50\%$ 로 증가를 보였다(청색 동그라미). 샘플 크기가 제한되는 동안, 상기 데이터는 Hu5F9-G4가 전-임상 연구에서 실증된 바와 같이 타고난 및 적응성 면역 기전 둘 다를 통해 백혈병성 세포를 제거함을 시사한다.
- [0149] 도 9에서 나타낸 바와 같이, 1일 및 4일 차에 $1\text{mg}/\text{kg}$ 의 프라이밍 용량의 5F9-G4로 환자를 처리하였다. 상기 용량을 8일차에 $15\text{mg}/\text{kg}$ 로 확대하였다. 각각의 투여 후, 상기 수용체 점유율을 측정하였다. CD45^+ 말초 혈액 및 골수의 경우, 이와 같은 투약이 거의 완전한 수용체 점유율을 허용하였다.
- [0150] 실시예 6
- [0151] 세포 감퇴 제제 및 Hu5F9-G4의 병용 요법:
- [0152] 순환하는 백혈병성 세포 부담을 감소시키기 위한 세포감퇴 요법 및 Hu5F9-G4로의 공동 치료는 Hu5F9-G4와 연관된 조기 사망의 위험을 완화시킬 수 있다. 세포감퇴 요법은 순환하는 및 골수 종양 부담을 감소시키는 제제로, 요법 예컨대 하이드록시우레아, 경구 에토포시드, 백혈구분리반출법, 및 다른 세포독성 화학요법을 포함한다. 전-임상 모형에서, 진행 중인 Hu5F9-G4 치료와 함께 하이드록시우레아 및 잠재적 첨가제 독성의 영향을 정상 면역력을 가진 야생형 건강한 마우스에서 평가하였다.
- [0153] 재발/불응성 AML에서 Hu5F9-G4의 1기 실험의 경우, Hu5F9-G4의 부수적 투약 중에 순환하는 WBC 부담을 $<10 \times 10^9/\text{L}$ 로 감소시키기 위해 하이드록시우레아 및/또는 경구 에토포시드 중 하나와 함께 세포 감퇴를 이용하였다. Hu5F9-G4 치료와 함께 하이드레아를 첨가하는 것은 증가된 독성 없이 실험 중에 환자의 $\text{WBC} < 10 \times 10^9/\text{L}$ 를 유지하기에 충분하였다. 본 특허 진술에서와 마찬가지로, 실험 중 투여받은 임의의 환자에게서 Hu5F9-G4와 관련된 급성 사망은 전혀 관측되지 않았다.
- [0154] 실시예 7
- [0155] Hu5F9-G4과 면역-종양학 요법의 병용:
- [0156] 단클론성 차단 항-CD47 항체에 의한 종양 세포 상의 CD47-SIRP α 신호전달 축의 차단은 타고난 및 적응성 면역계 둘 다의 활성화에 의한 종양 제거를 유발시킨다. 타고난 면역계에 의한 항-CD47 항체-매개 종양 제거는 대식

세포 및 다른 식균세포에 의한 종양 세포의 식세포 제거를 통해 발생한다. 대식세포가 많은 종양 유형에서 일반적인 면역 세포 침윤물이며, 종양 내 대식세포 침윤물의 정도가 임상 예후와 상관관계가 있음은 잘 알려져 있다. 대식세포 침윤과 임상 질환 과정의 상관관계는 종종 종양 진행을 억압하는 고전적으로 활성화된(M1) 유형 대식세포 또는, 대안적으로, 종양 진행을 촉진하는 활성화된(M2) 유형 대식세포 중 하나의 존재에 의존한다.

[0157] 많은 종양 유형에서 M2 대식세포의 빈번한 침윤과, 종양형성을 촉진할 때 그것의 역할을 고려할 때, 종양 대식세포 분극화를 친-종양형성 M2에서 항종양성 M1 대식세포로 바꾸는 요법을 개발하는 데 많은 관심이 집중되고 있다. 비임상적 연구에서, 항-CD47 항체-매개 종양 세포 식균작용은 M1 및 M2 대식세포 둘 다를 통해 발생함이 실증된 바 있다(참고 Zhang 등 (2016) PLoS ONE 11(4): e0153550). 또한, 항-CD47 항체로 인간 이중이식 종양의 생체 내 처리가 증가된 M1 종양 내 대식세포 후처리를 입증하였고, 이것은 항-CD47 항체가 또한 생체 내에서 대식세포의 표현형을 M2에서 M1 표현형으로 바꿀 수 있음을 암시한다. 대식세포 효과기의 동원이 항-CD47 항체에 의한 항종양 활성을 위한 주요한 기전이기 때문에, 항-CD47 항체를 투여 받은 환자에서 대식세포 종양 침윤 전처리 및 후처리의 특성규명은 환자 및, 항종양 효능을 위해 풍부해지는 암 아형 및 대식세포 바이오마커에 대한 통찰을 제공한다.

[0158] 타고난 면역계를 조절할 뿐만 아니라, 항-CD47 항체 요법은 또한 적응성 면역계를 항종양 반응 쪽으로 활성화한다. 식균세포(대식세포 및/또는 수지상 세포)에 의한 종양 세포의 식균작용은 T 세포에 종양 항원의 교차-제시를 유발하고, 이것은 T-세포 항종양 반응을 가능하게 한다. 하나의 비임상적 연구에서, 항-CD47 항체는 조절 T 세포(일반적으로 종양을 촉진하는 것으로 여겨짐)의 증식 없이 특이적 CD8 T-세포 항종양 반응을 매개하였다. 현재, 상기 종양에 침윤하는 T-세포 서브셋과, 면역-종양학 치료제의 사용으로 인한 임상 반응 사이의 관계를 조사하는 데 관심이 집중되고 있다. 사실상, 종양에서 증가된 T-세포 침윤은 T-세포 검문 억제제로 처리된 종양 환자에서의 임상 반응과 연관된 바 있다. 항종양 T-세포 반응을 매개하는 항-CD47 항체의 역할을 고려할 때, 항-CD47 항체-매개 효능에 대한 T-세포 효과기의 기여의 임상 조사가 요법에 반응하는 환자 및 종양 아형을 위해 선택할 때 중요하다

[0159] 대식세포 및 T 세포 특이적 항-백혈병성 활성을 유도할 때 Hu5F9-G4의 MOA에 기초하여, Hu5F9-G4로 1기 임상시험 중인 AML 환자에게서 종양 미세환경(골수) 중 면역 효과기 세포의 존재를 평가하였다. 부분적인 반응을 얻은 한 환자에서, 골수 중 대식세포 및 T 세포 침윤물을 평가하였다.

[0160] 상당한 수의 대식세포(CD68 또는 CD163 염색 중 하나로 평가함)가 치료 4주차에 골수에 존재하였다. 게다가, 골수로의 T 세포 침윤이 치료 기간 동안 현저하게 증가하였다: 15% T 세포 침윤물이 기준선에 존재하였고, 요법 시행 8주차에 모든 골수 세포의 40~50%로 증가하였다(청색 동그라미). 이와 같은 데이터는 전-임상 연구에서 실증된 바와 같이, 타고난 및 적응성 면역 기전 둘 다를 통해 Hu5F9-G4가 백혈병성 세포를 제거함을 나타낸다.

[0161] Hu5F9-G4 치료 시 증가된 T 세포 종양 침윤물의 증거에 기초하여, 항종양 T 세포 반응을 활성화 및 증진시키는 치료제와 Hu5F9-G4의 병용은 향상된 임상 효능을 야기할 수 있다. Hu5F9-G4와의 병용 치료는 T 세포 검문 억제제(예를 들어 항-PD1, 항-PDL1, 항-CTLA-4, 항-Tim3 항체)을 포함한다.

[0162] 실시예 8

[0163] 바이오마커

[0164] Hu5F9-G4에 대한 향상된 임상 반응을 예측하는, 백혈병 또는 전-백혈병성 질환(예를 들어 MDS)를 갖는 환자를 선택하기 위한 분자, 세포유전적, 면역 표현형, 및 종양 미세환경 프로파일링의 사용.

[0165] 전-임상 모형에서, Hu5F9-G4는 광범위한 세포유전적, 분자, 및 표현형 AML 아형에서 단일요법 활성을 실증한 바 있다. 그러나 Hu5F9-G4 치료는 특정 AML 아형에서 우선적으로 향상된 임상 활성을 가질 수 있다. DNA 서열분석, 세포유전적 분석/형광 원위치 하이브리드화(FISH) 및 유세포측정에 의한 AML 환자의 분자, 염색체, 및 표현형 특성의 전향시험(Prospective testing)은 Hu5F9-G4에 더 큰 반응을 보이는 환자의 확인으로 이어질 수 있다. 1기 AML 시험에서, Hu5F9-G4 치료를 받은 환자에게서 골수성 돌연변이의 표적화된 DNA 서열분석을 수행하였다. 돌연변이 부담(변이체 대립유전자 빈도)의 감소가 다른 것에 비해 일부 돌연변이의 경우에 관측되었다(도 X).

[0166] AML 표현형 선택뿐만 아니라, 골수 중 종양 미세환경의 전향적 특성규명은 Hu5F9-G4 반응의 예측 가능 인자일 수 있다. 대식세포, 다른 식균세포 및 T 세포가 Hu5F9-G4 항종양 활성에 필요한 일차 효과기 세포인 점을 고려할 때, 치료 전 골수에서 이들 면역 세포 유형의 빈도는 Hu5F9-G4 활성의 예측 가능 인자일 수 있다. 구체적으로, CD68, CD163, M1 및 M2 특성규명 및 다른 유사한 마커에 의한 골수 중 증가된 대식세포 빈도는 향상된 효능과 상관관계가 있을 수 있다. 증가된 중성구, 수지상 세포, 및 T 세포 침윤 또한 향상된 효능과 상관관계가 있을 수 있다.

을 수 있다. 특이적 T 세포 아형, 예컨대 비제한적으로 CD3, CD4, CD8, PDL1, PD1, FoxP3, CD25 발현의 특성규명은 Hu5F9-G4 효능과 상관관계가 있을 수 있다. 마지막으로, 종양에서 SIRP α 침윤의 정도는 반응의 예측가능 인자일 수 있는데, SIRP α 가 효과기 세포 상에서 CD47에 대한 리간드이기 때문이다. 골수 중 면역 효과기 특성 규명의 양식에는 면역조직화학, 면역형광, cyTOF 및 유세포측정이 포함되곤 한다.

[0167] 실시예 9

[0168] Hu5F9-G4 AML 징후:

[0169] Hu5F9-G4는 AML 형태적, 분자, 및 세포유전적 아형에서 넓은 전-임상 활성을 갖는다. 따라서, Hu5F9-G4는 AML에서 넓은 잠재적 임상 활성을 가질 수 있다. 특이적 임상 징후와 관련하여, Hu5F9-G4는 하기에 투여될 수 있다: 1) 재발한 및/또는 불응성 급성 골수성 백혈병; 2) 표준 저장도 요법(예를 들어, 저메틸화제 요법)에 실패한 표준 유도 화학요법에 부적격한 AML 환자; 3) 최소 잔존 질환의 증거가 있고 형태적으로 완전한 차도를 보이는 AML 환자.

[0170] 최소 잔존 질환(MRD) 모니터링은 이식 전 및 이식 후 상황에서 AML 환자의 치료에 중추적 역할을 하기 시작하는 강력한 예후 인자가 되었다. 새로 진단된 AML 환자의 대형 다중 연구에서, MRD 양성 후-요법(MRD positivity post-therapy)은 독립적인 불량한 예후 인자이며 재발의 예측변수였다. 이와 더불어, MRD 양성은 또한 이식 후 상황에서 불량한 예후 인자인 것으로 보인다. 회고(retrospective) 연구에서, 동종이계 HSCT를 겪으며 형태적 차도를 보인 환자에서, 이식 전 MRD의 존재는 재발의 독립적인 예측변수였다(MRD-양성 차도를 보인 환자의 67%가 이식 후 3년 내에 재발한 반면, MRD-음성 차도에서는 22%였다). MRD 모니터링을 위한 몇 개의 방법이 AML에 이용된 바 있는데, 하기를 포함한다: 1) 비정상적인 조혈 표면 항원의 검출을 위한 멀티파라미터 유세포 측정; 2) 백혈병-특이적 돌연변이 부담의 분자 모니터링; 3) 백혈병-연관 염색체 비정상의 세포유전적 모니터링.

[0171] 전-임상 및 초기 임상 연구에서, Hu5F9-G4는 질환의 더 낮은 종양 부담에서 향상된 활성을 실증했다. 따라서, Hu5F9-G4는 특히 최소 잔존 질환을 갖는 환자에서 최소 종양 부담이 검출되는 상황에 좀 더 유용할 수 있다.

[0172] 실시예 10

[0173] 수용체 점유율에 대한 검정

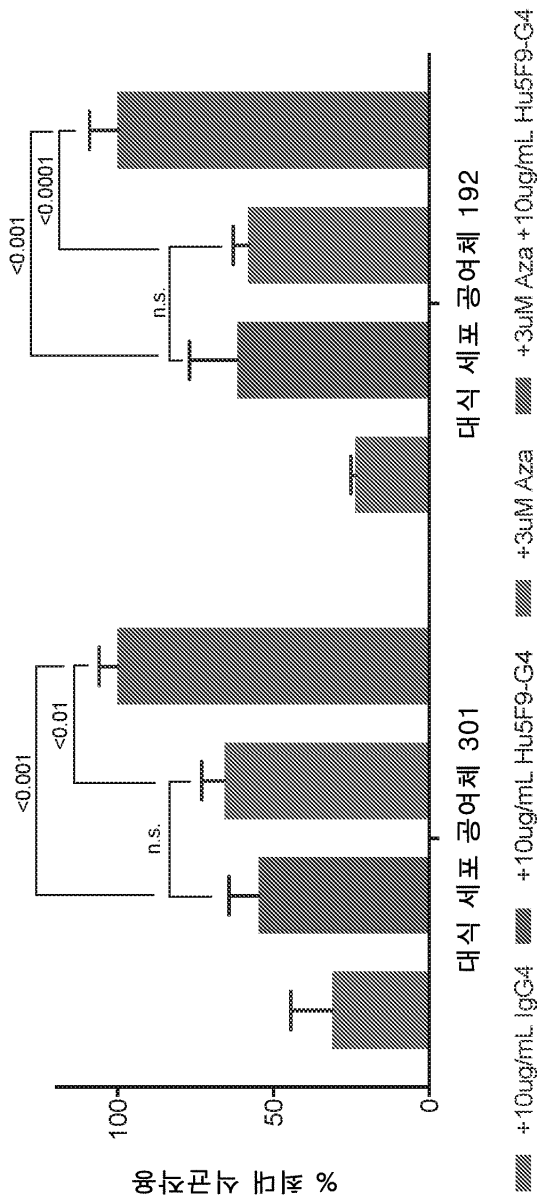
[0174] 상기 검정에 대한 도식이 도 7에 제공되었다. 환자 말초 혈액 및 골수 천자를 계획된 시점(예를 들어, Hu5F9-G4 투약 1일 전, Hu5F9-G4 투약 1일 후 등)에 수집하였다. 이들 샘플을 두 개의 시험관 “RO_{테스트}” 및 “RO_{포화된}”에 나눠 담았다. “RO_{포화된}”은 100% 수용체 점유율을 시뮬레이션하기 위해 Hu5F9-G4 200 μ g/ml로 *생체외*에서 인공적으로 포화시켰다(사전에 포화시키기로 결정됨). RO_{테스트}는 인공적으로 포화시키지 않았다. 이어서, 이들 두 개 시험관을 AlexaFlour-647 접합된 항-IgG4(클론 G17-4) 200 μ g/ml로 염색하여 적혈구 및 백혈구, 예컨대 아세포 상에서 형광 강도를 측정하였다. 각각의 혈액 분획의 수용체 점유율은 RO_{포화된} 중앙 형광 강도(MFI)로 나눈 RO_{테스트} MFI의 백분율 비로 측정하였다.

[0175] 실시예 11

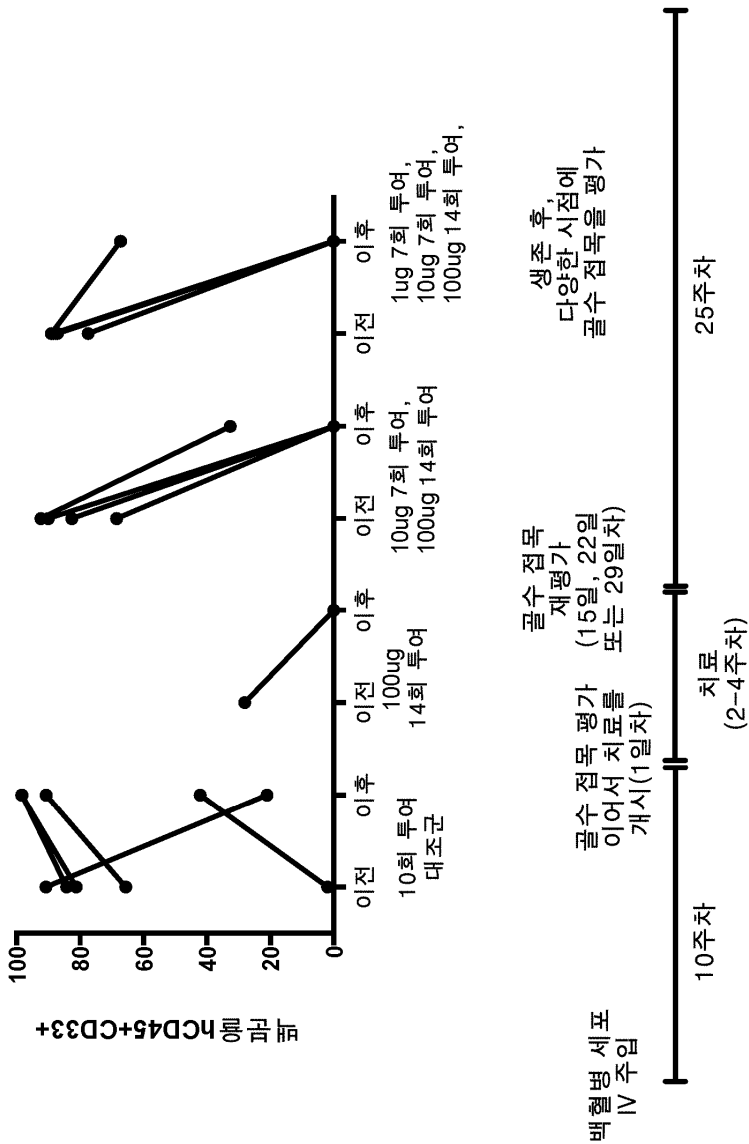
[0176] 예시적인 임상 투약 프로토콜이 도 8에 제공되었다. 상부 표는 1기 임상시험 사용을 위한 더 낮은 투약 범위를 제공하고, 하부 표는 임상적으로 관련된 투약 계획을 제공한다.

도면

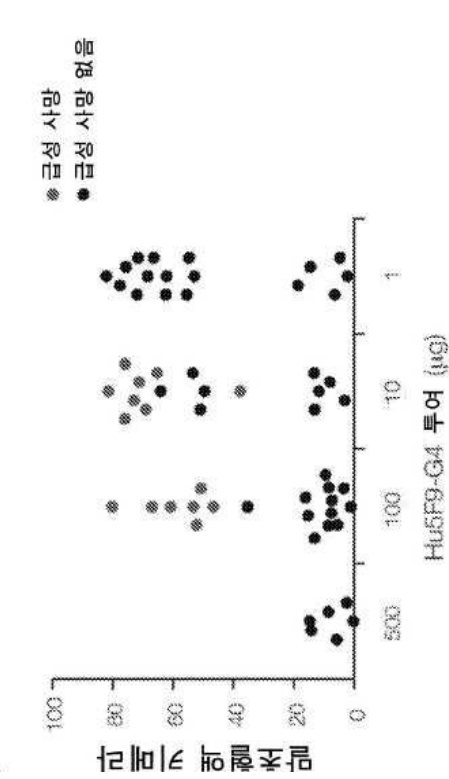
도면1



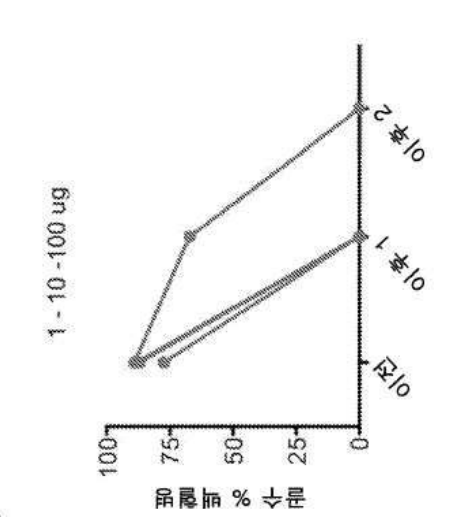
도면2



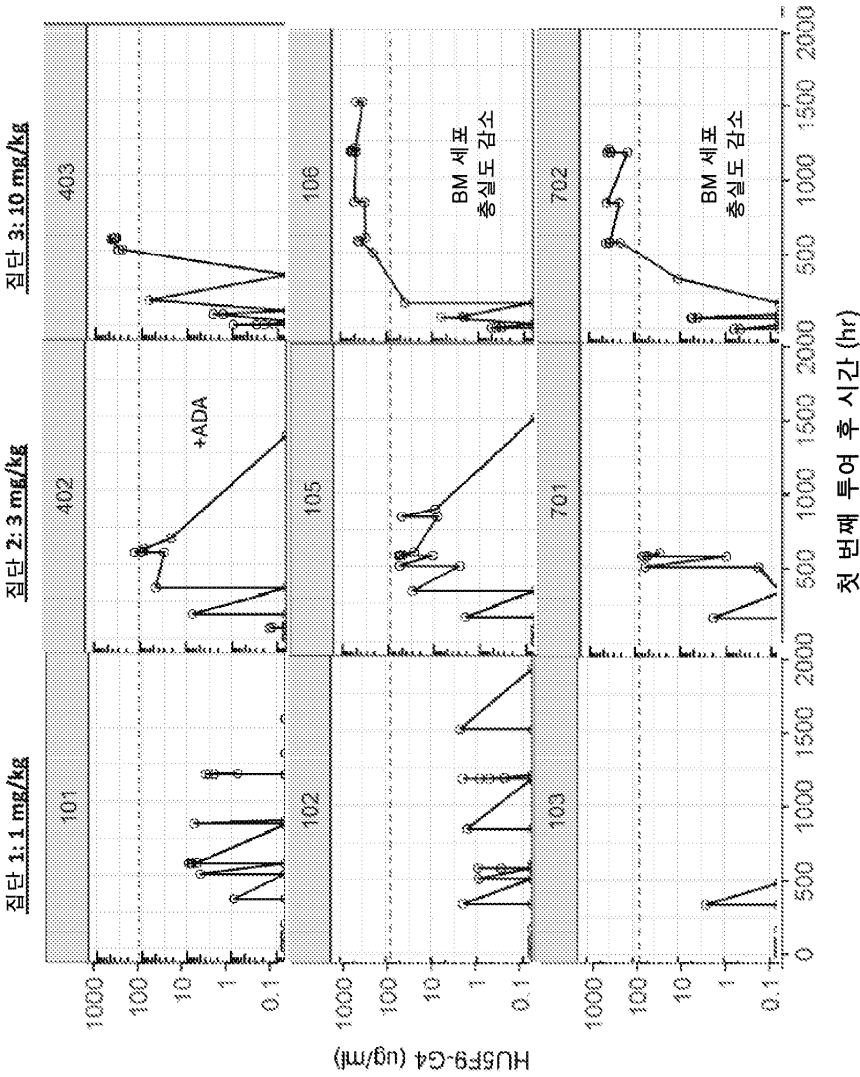
도면3a



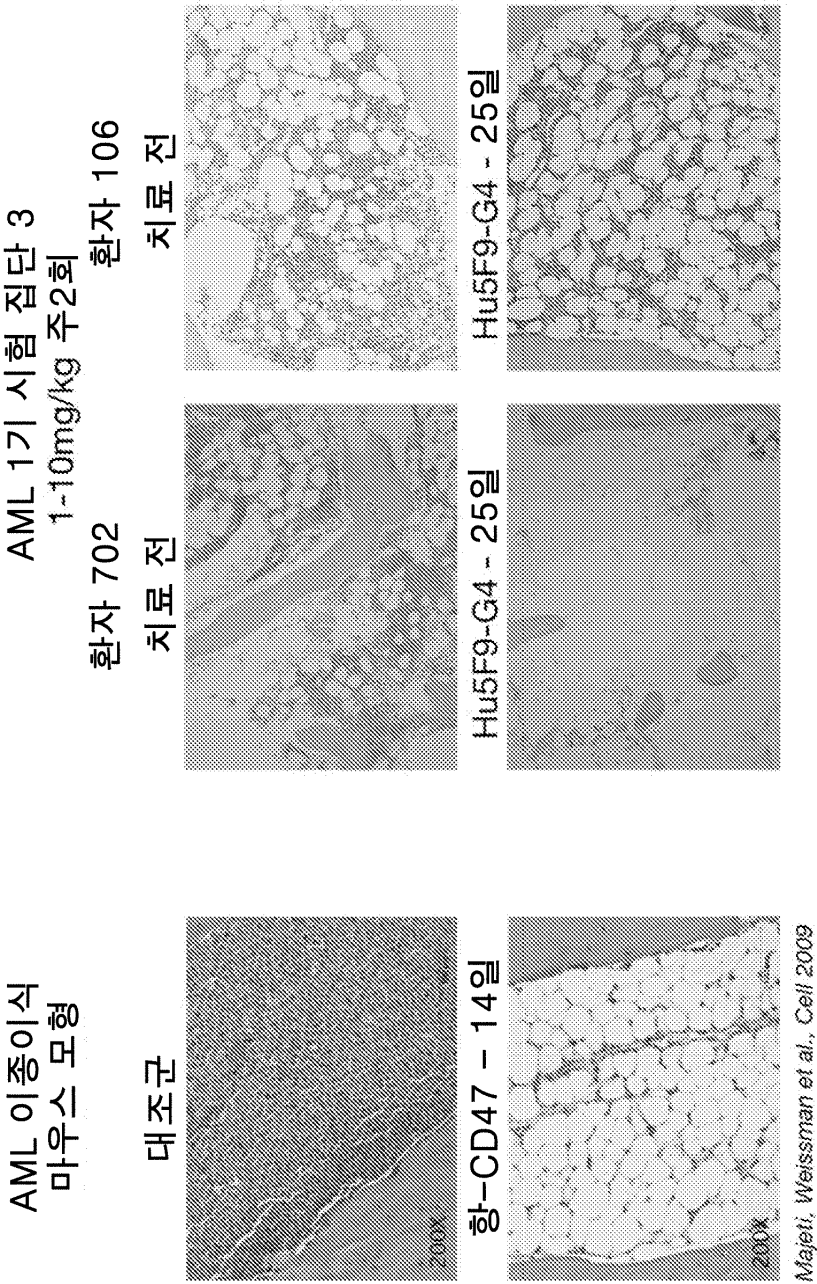
도면3b



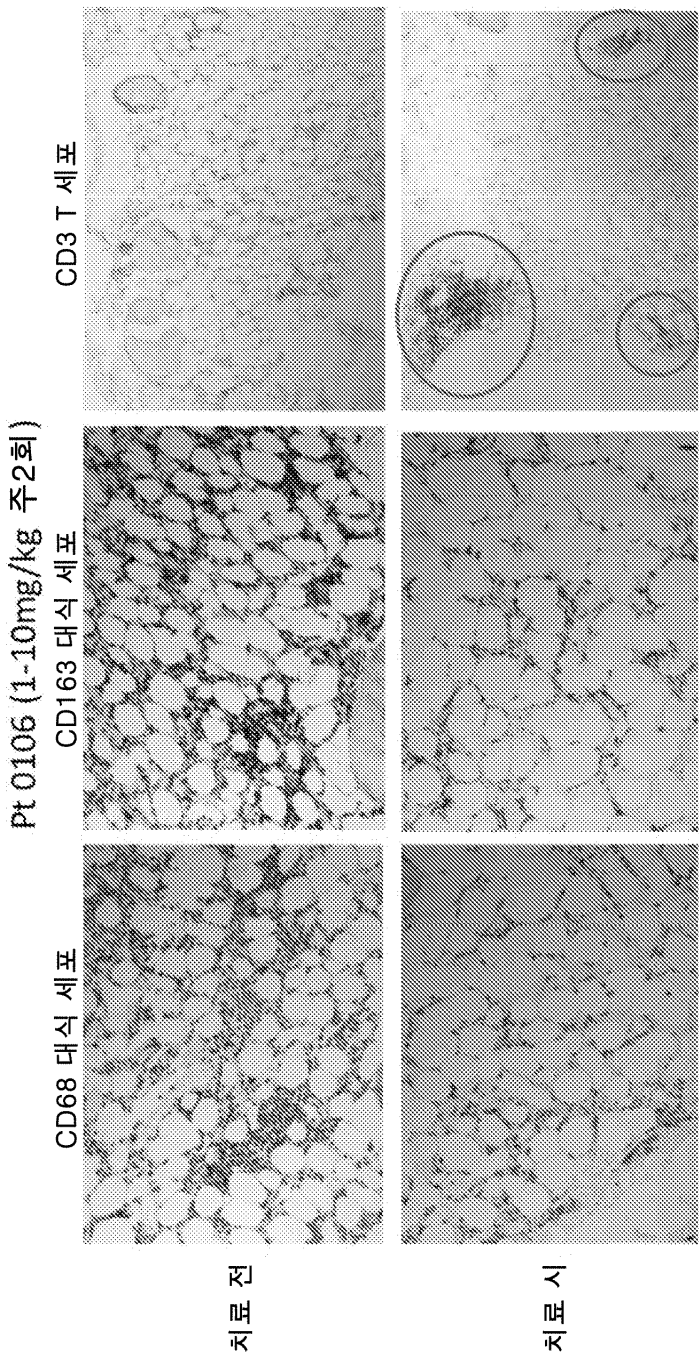
도면4



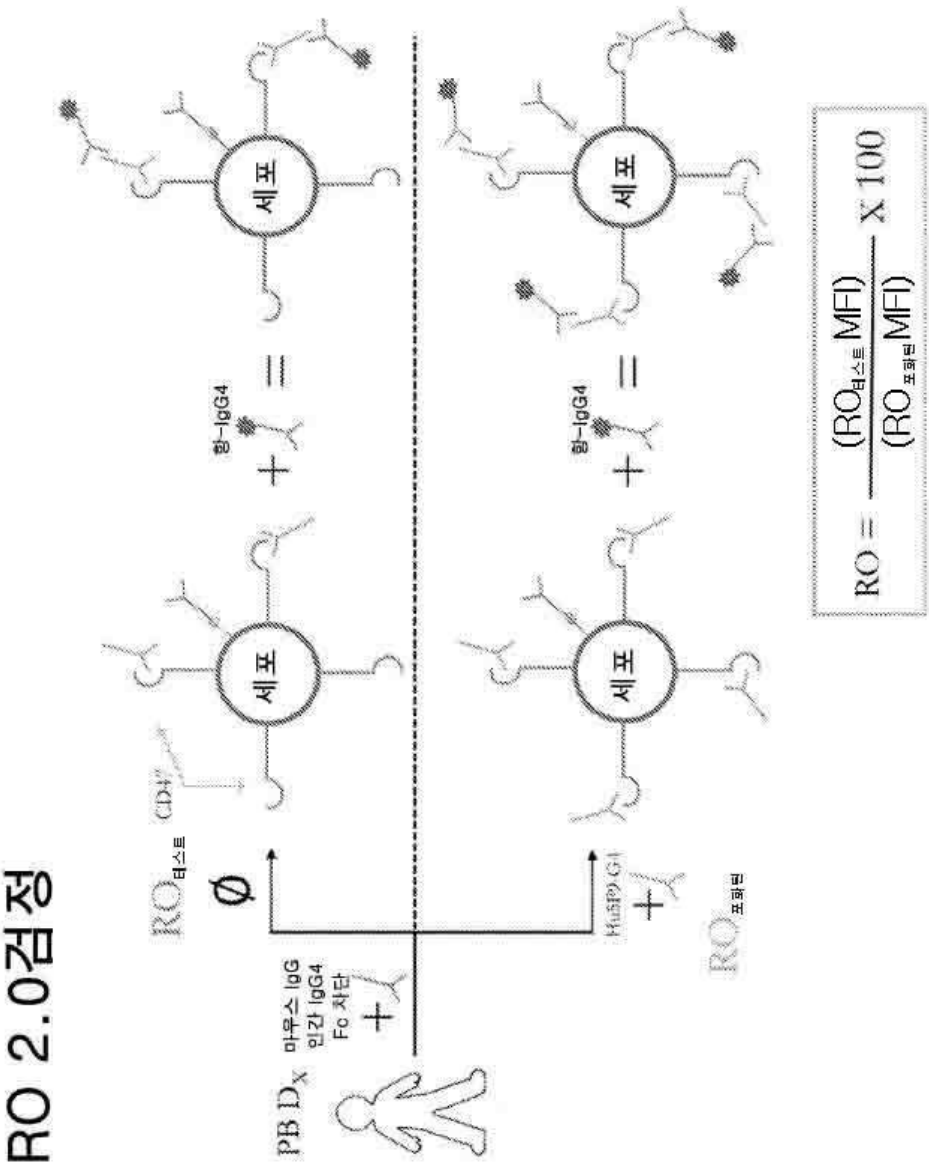
도면5



도면6



도면7



도면8

Hu5F9-G4 AML 투여 프로파일 범위: 1기 AML 시험												
집단	1주차		2주차		3주차		4주차		5주차		6주차	
	D1	D4	D8	D11	D15	D18	D22	D25	D29+	D32	D35	D38
1	0.1 mg/kg	0.1 mg/kg	0.3 mg/kg	0.3 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg
2	0.3 mg/kg	0.3 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg	3 mg/kg	3 mg/kg	3 mg/kg	3 mg/kg	3 mg/kg	3 mg/kg	3 mg/kg
3	1 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg
4	1 mg/kg	1 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	15 mg/kg	15 mg/kg	15 mg/kg	15 mg/kg	15 mg/kg	15 mg/kg	15 mg/kg	15 mg/kg
5	1 mg/kg	1 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg

치료적 투여 프로파일

1주차		2주차		3주차		4주차		5주차	
D1	D4	D8	D11	D15	D18	D22	D25	D29+	D32
1 mg/kg	1 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg
1 mg/kg	1 mg/kg	30 mg/kg	60 mg/kg	60 mg/kg	60 mg/kg	60 mg/kg	60 mg/kg	60 mg/kg	60 mg/kg

도면9

