



공개특허 10-2020-0070341



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0070341
(43) 공개일자 2020년06월17일

(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 10-2020-7014146
(22) 출원일자(국제) 2018년10월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년05월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/056442
(87) 국제공개번호 WO 2019/079549
국제공개일자 2019년04월25일
(30) 우선권주장
62/574,073 2017년10월18일 미국(US)

(71) 출원인
포티 세븐, 인코포레이티드
미국 캘리포니아 94025 멘로 파크 스위트 에이 오
브라이언 드라이브 1490
(72) 발명자
타키모토, 크리스 히데미, 미즈후네
미국 캘리포니아 94025 멘로 파크 오브라이언 드
라이브 1490, 포티 세븐, 인코포레이티드
볼크메어, 엔스-피터
미국 캘리포니아 94025 멘로 파크 오브라이언 드
라이브 1490, 포티 세븐, 인코포레이티드
(74) 대리인
김영철, 김 순 영

전체 청구항 수 : 총 60 항

(54) 발명의 명칭 항-CD47 및 항-PD-L1로 난소암의 치료

(57) 요 약

난소암을 앓는 개체를 항-CD47 항체 및 항 PD-L1 항체로 치료하기 위한 방법이 제공된다.

(52) CPC특허분류

C07K 16/2827 (2013.01)

A61K 2039/507 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

상피 난소암을 앓는 인간 개체를 치료하는 방법에 있어서, 하기 단계를 포함하는, 방법:

- Hu5F9-G4 항체의 초회감작 용량을 개체에게 투여하는 단계, 여기서 상기 초회감작 용량은 1 mg/kg의 Hu5F9-G4 항체이고; 그리고
- Hu5F9-G4 항체의 치료적으로 유효 용량을 개체에게 투여하는 단계, 여기서 Hu5F9-G4 항체의 치료적으로 유효 용량은 20 내지 60 mg/kg이고, 그리고 여기서 단계 (b)는 단계 (a)를 시작한 후 적어도 약 7 일 후, 그리고 그 후에 7 일마다 수행되고; 그리고
- 아벨루맙을 개체에게 투여하는 단계, 여기서 아벨루맙의 용량은 10 mg/kg이고, 그리고 여기서 단계 (c)는 단계 (a) 후 적어도 약 7 일에, 그리고 그 후 14 일마다 수행됨.

청구항 2

상피 난소암을 앓는 인간 개체를 치료하는 방법에 있어서, 하기 단계를 포함하는, 방법:

- Hu5F9-G4 항체의 초회감작 용량을 개체에게 투여하는 단계, 여기서 상기 초회감작 용량은 1 mg/kg의 Hu5F9-G4 항체이고; 그리고
- Hu5F9-G4 항체의 치료적으로 유효 용량을 개체에게 투여하는 단계, 여기서 Hu5F9-G4 항체의 치료적으로 유효 용량은 30 mg/kg이고, 그리고 여기서 단계 (b)는 단계 (a)를 시작한 후 적어도 약 7 일 후, 그리고 그 후에 7 일마다 수행되고; 그리고
- 아벨루맙을 개체에게 투여하는 단계, 여기서 아벨루맙의 용량은 10 mg/kg이고, 그리고 여기서 단계 (c)는 단계 (a) 후 적어도 약 7 일에, 그리고 그 후 14 일마다 수행됨.

청구항 3

난소암을 앓는 인간 개체를 치료하거나 또는 상기 개체에서 난소암의 크기를 감소시키는 방법에 있어서, 항-CD47 항체의 치료 효과량을 상기 개체에게 투여하는 단계; 그리고 적어도 하나의 항-PD-L1 항체의 치료 효과량을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 난소암은 상피 난소암, 임의적으로 장액성 종양, 점액 종양, 투명 세포 종양, 자궁내막양 종양, 이행 세포 종양, 브레너 종양, 암육종 종양, 혼합 상피 종양, 경계선 상피 종양, 미분화 암종 종양, 난관 종양, 또는 원발성 복막 종양인, 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상피 난소암은 장액성 종양인, 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 장액성 종양 난소암은 조직학적 분석 서브타이핑에 의해 결정될 때, 낮은 등급 또는 높은 등급인, 방법.

청구항 7

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 유형은 조직학적 분석에 의해 결정되는, 방법.

청구항 8

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 개체는 항-PD-L1 항체 미경험인, 방법.

청구항 9

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체 및 항-PD-L1 항체는 동시에 또는 순차적으로 투여되는, 방법.

청구항 10

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체는 IgG4 Fc를 포함하는, 방법.

청구항 11

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체는 CD47에 결합에 대해 Hu5F9-G4와 경쟁하는, 방법.

청구항 12

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47은 Hu5F9-G4와 동일한 CD47 에피토프에 결합하는, 방법.

청구항 13

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체는 Hu5F9-G4인, 방법.

청구항 14

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항 PD-L1 항체는 아벨루맙 (Bavencio ®)인, 방법.

청구항 15

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체는 Hu5F9-G4이고, 그리고 항 PD-L1 항체는 아벨루맙 (Bavencio ®)인, 방법.

청구항 16

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체 및 항-PD-L1 항체는 각각, 제약학적으로 허용되는 부형제와 함께 제약학적 조성물에서 조제되는, 방법.

청구항 17

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 개체는 백금 민감성인, 방법.

청구항 18

청구항 15을 제외하고, 전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 개체는 백금 저항성인, 방법.

청구항 19

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체 및/또는 항 PD-L1 항체는 정맥내 투여되는, 방법.

청구항 20

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체 및/또는 항 PD-L1 항체는 복강내 투여되는, 방법.

청구항 21

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체 및/또는 항-PD-L1 항체는 종양내 투여되는, 방법.

청구항 22

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 개체에서 CA125의 수준을 기준선과 비교하여 감소시키고, 임의적으로 여기서 CA125의 수준은 약 월 1회 계측되는, 방법.

청구항 23

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 개체에서 CA125의 수준을 기준선과 비교하여 적어도 30-90, 40-

80, 50-70, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 또는 90% 감소시키는, 방법.

청구항 24

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 임의적으로 영상화에 의해 계측될 때, 기준선과 비교하여 암의 크기 또는 이의 전이를 감소시키고, 임의적으로 여기서 상기 영상화는 크기에서 초기에는 기준선으로부터 증가하지만 차후에는 감소하는 질환을 임의적으로 포함하는 CT/PET/CT 또는 MRI인, 방법

청구항 25

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 기준선과 비교하여, CA125, HE4 (인간 부고환 단백질 4), CA-72-4, CA-19-9, 그리고 CEA 중에서 적어도 한 가지의 수준을 감소시키는, 방법.

청구항 26

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체의 초회감작 용량을 투여하는 단계를 더욱 포함하는, 방법.

청구항 27

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 에리트로포이에틴 자극제의 초회감작 용량을 투여하는 단계를 더욱 포함하는, 방법.

청구항 28

청구항 26에 있어서, 항-CD47 항체는 약 0.5 내지 약 5 mg/kg의 항체의 범위에서 변하는 초회감작 용량, 임의적으로 1 mg/kg의 항체의 초회감작 용량으로서 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 29

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체는 약 20 내지 약 67.5 mg/kg의 항체의 범위에서 변하는 용량, 임의적으로 20 mg/kg의 항체, 30 mg/kg의 항체, 45 mg/kg의 항체, 60 mg/kg의 항체, 또는 67.5 mg/kg의 항체의 용량으로서 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 30

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체는 주 1회, 2 주마다 1회, 또는 3 주마다 1회 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 31

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 하기 단계를 포함하는, 방법:

- 항-CD47 항체의 초회감작 용량을 개체에게 투여하는 단계, 여기서 상기 초회감작 용량은 약 0.5 내지 약 5 mg/kg의 항체이고; 그리고
- 항-CD47 항체의 치료적으로 유효 용량을 상기 개체에게 투여하는 단계, 여기서 단계 (b)는 단계 (a)를 시작한 후 적어도 약 3 내지 14 일 후, 임의적으로 단계 (a) 후 7 일에 수행됨.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 상기 방법은 (a) 1 일자에서 1 mg/kg의 항체의 용량에서 항-CD47 항체의 초회감작 용량을 개체에게 투여하는 단계; 그리고 (b) 8 일자에서 20 mg/kg의 항체, 30 mg/kg의 항체, 45 mg/kg의 항체, 60 mg/kg의 항체, 또는 67.5 mg/kg의 항체의 용량에서 항-CD47 항체의 치료적으로 유효 용량을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 33

청구항 26 내지 32 중 어느 한 항에 있어서, 초회감작 용량의 유용성은 초회감작 용량의 투여 이후에 개체의 빈혈 상태에 근거하여 결정되는, 방법.

청구항 34

청구항 26 내지 32 중 어느 한 항에 있어서, 초회감작 용량은 만약 개체의 혈액의 수준에서 하락이 8.0 g/dL보다 적지 않고; 및/또는 개체의 혈액의 수준에서 절대적 하락이 3.0 내지 3.75 g/dL보다 적으면, 효과적인 것으로 고려되는, 방법.

청구항 35

청구항 31에 있어서, 단계 (a) 이후 및 단계 (b)에 앞서, 초회감작 용량의 투여가 효과적이었는지를 결정하는 단계를 더욱 포함하는, 방법.

청구항 36

청구항 35에 있어서, 결정하는 단계는 망상적혈구 계수를 수행하는 것을 포함하고, 여기서 만약 망상적혈구 수치가 L당 약 100×10^9 망상적혈구 내지 L당 약 -1000×10^9 망상적혈구이면, 초회감작 용량의 투여는 효과적이었던 것으로 결정되는, 방법.

청구항 37

청구항 36에 있어서, 결정하는 단계는 망상적혈구 계수를 수행하는 것을 포함하고, 여기서 만약 혈액 내에 망상적혈구의 백분율이 약 1.5%보다 크면, 초회감작 용량의 투여는 효과적이었던 것으로 결정되는, 방법.

청구항 38

청구항 36에 있어서, 결정하는 단계는 망상적혈구 계수를 수행하는 것을 포함하고, 여기서 만약 망상적혈구 지수가 약 2%보다 크면, 프라이머 작용제의 투여가 효과적이었던 것으로 결정되는, 방법.

청구항 39

청구항 31 내지 38 중 어느 한 항에 있어서, 초회감작 용량은 약 0.05 mg/ml 내지 약 0.5 mg/ml의 항-CD47 항체의 농도를 갖는 주입액에 담겨 인간 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 40

청구항 39에 있어서, 주입액은 적어도 약 1-3, 8-10, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 시간(들)의 기간에 걸쳐 전달되는, 방법.

청구항 41

청구항 39에 있어서, 주입액은 적어도 약 3 시간의 기간에 걸쳐 전달되는, 방법.

청구항 42

청구항 39에 있어서, 주입액은 약 2.5 시간 내지 약 6 시간의 기간에 걸쳐 전달되는, 방법.

청구항 43

청구항 31 내지 38 중 어느 한 항에 있어서, 초회감작 용량은 약 6 시간 내지 약 3 일의 기간에 걸쳐 연속 펌프에 의해 전달되는, 방법.

청구항 44

청구항 31 내지 43 중 어느 한 항에 있어서, 초회감작 용량은 피하 전달되는, 방법.

청구항 45

청구항 31 내지 44 중 어느 한 항에 있어서, 초회감작 용량은 적혈구 상에서 CD47 부위 중에서 적어도 약 50% 내지 100%, 임의적으로 적혈구 상에서 CD47 부위 중에서 100%를 포화시키는, 방법.

청구항 46

청구항 45에 있어서, 용량은 수용체 점유 검정 (여기서 개체에게 1회 용량의 표지화되지 않은 항-CD47 항체의 투여 이후에, 혈액 표본이 획득되고 검출가능하게 표지화된 항-CD47 항체의 포화 용량과 조합된다)에 의해; 그리고 결합 수준을 측정함으로써 결정되는, 방법.

청구항 47

청구항 31 내지 46 중 어느 한 항에 있어서, (b)의 치료적으로 유효 용량은 지속된 기간 동안 항-CD47 항체의 100, 250, 500, 또는 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 보다 큰 순환 수준을 달성하는데 충분하고, 임의적으로 여기서 지속된 기간은 적어도 1-28, 7-28, 7-21, 14-28, 또는 21-28 일인, 방법.

청구항 48

청구항 47에 있어서, 지속된 기간은 약 1, 2, 3, 또는 4 주인, 방법.

청구항 49

청구항 31 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 초회감작 용량은 1 mg/kg 의 항-CD47 항체인, 방법.

청구항 50

청구항 31 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체의 치료적으로 유효 용량은 20 mg/kg 인, 방법.

청구항 51

청구항 31 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체의 치료적으로 유효 용량은 30 mg/kg 인, 방법.

청구항 52

청구항 31 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체의 치료적으로 유효 용량은 45 mg/kg 인, 방법.

청구항 53

청구항 31 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체의 치료적으로 유효 용량은 60 mg/kg 인, 방법.

청구항 54

청구항 31 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체의 치료적으로 유효 용량은 67.5 mg/kg 인, 방법.

청구항 55

청구항 31 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체의 치료적으로 유효 용량은 약 7, 14, 21, 또는 28 일마다 투여되는, 방법.

청구항 56

청구항 31 내지 55 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD47 항체의 치료적으로 유효 용량은 7 일마다 투여되는, 방법.

청구항 57

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항-PD-L1 항체의 치료 효과량은 10 mg/kg 인, 방법.

청구항 58

청구항 57에 있어서, 항-PD-L1 항체는 14 일마다 투여되는, 방법.

청구항 59

항-CD47 항체 및 항-PD-L1 항체를 포함하는 조성물.

청구항 60

항-CD47 항체, 항-PD-L1 항체, 그리고 사용설명서를 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련된 출원에 대한 교차 참조
- [0002] 본 출원은 2017년 10월 18일자 제출된 U.S. 특허가출원 번호 62/574,073에 우선권을 주장하고, 이것은 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된다.
- [0003] 서열 목록
- [0004] 본 출원은 서열 목록을 내포하는데, 이것은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출되었고 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된다. 2018년 9월 26일자에 창출된 상기 ASCII 사본은 41404WO_CRF_sequencelisting.txt로 명명되고 크기에서 12,403 바이트이다.

배경 기술

- [0005] 배경
- [0006] 난소암은 USA에서 부인암 사망의 가장 빈번한 원인이다. 진행성 질환을 앓는 새로이 진단된 환자에 대한 표준 전신 요법은 전형적으로, 항신생혈관제와 함께 또는 이들 작용제 없이, 백금-기초된 화학요법의 이용을 필요로 한다. 더욱 최근에는 표적화된 작용제, 예컨대 PARP 저해제가 진행성 질환 및 BRCA 돌연변이를 갖는 여성에서 활용되었다. 하지만, 더욱 새로운 면역요법, 예컨대 관문 저해제는 관리 기준이 될 만큼 충분히, 임상적 결과에 영향을 주지는 못하였다. 재발성 난소암을 앓는 여성에서, 마지막 백금 투약 및 재발의 일자 사이에 간격으로서 규정되는 무백금 간격 (PFI)은 차후 화학요법에 반응의 가능성과 강하게 상관된다. 1 개월 이상, 하지만 6 개월 이하의 PFI를 갖는 환자는 역사적으로 백금-저항성으로 지칭되었고, 그리고 이들 환자는 한정된 치료 옵션을 가졌다. 따라서, 이들 환자에 대한 효과적인 암 치료제의 개발은 충족되지 않은 실제적인 의료 요구를 해소할 것이다.
- [0007] 비정상적인 세포를 검출하고 파괴하는 면역계의 자연적인 능력은 많은 암의 발달을 예방할 수 있다. 하지만, 암 세포는 때때로 면역계에 의한 검출과 파괴를 회피할 수 있다. 암 세포는 그들의 표면상에서 종양 항원의 발현을 감소시켜, 면역계가 이들을 검출하는 것을 더욱 어렵게 만들고; 면역 세포 비활성화를 유도하는 단백질을 그들의 표면상에서 발현하고; 및/또는 미세환경에서 세포가, 면역 반응을 억제하고 종양 세포 증식과 생존을 증진하는 물질을 방출하도록 유도할 수 있다.
- [0008] 면역계의 특정한 성분을 자극함으로써; 또는 면역 반응을 억제하는 암 세포에 의해 생산된 신호를 상쇄시킴으로써, 종양에 대한 면역 반응을 증강하는 암 면역요법이 개발되었다.
- [0009] 한 가지 접근법은 면역 반응의 강도와 지속 기간을 제한하는 면역 관문 단백질을 차단한다. 이들 단백질은 비정상 세포뿐만 아니라 정상 세포를 손상시킬 수도 있는 지나치게 강렬한 반응을 예방함으로써, 면역 반응을 통상적으로 억제한다. 면역 관문 단백질의 활성을 차단하는 것은 면역계에 대한 "제동"을 풀고, 암 세포를 파괴하는 이의 능력을 증가시킨다.
- [0010] 현재 임상적으로 이용 중인 면역 관문 저해제는 이플리무맙을 포함하는데, 이것은 활성화된 세포독성 T 립프구의 표면상에서 발현되는 CTLA4의 활성을 차단한다. CTLA4는 이들 T 세포를 비활성화시키고, 따라서 면역 반응의 강도를 감소시키는 "스위치"로서 행동한다; 이것을 저해하는 것은 세포독성 T 세포 반응을 증가시킨다. 2가지 다른 FDA-승인된 관문 저해제, 니볼루맙 및 펜브로리주맙은 유사한 방식으로 작동하지만, 이들은 PD-1을 표적으로 한다. 세 번째 FDA-승인된 관문 저해제, 아벨루맙은 PD-L1을 표적으로 한다.
- [0011] 면역요법의 다른 형태는 통상적으로 면역계 활성을 조절하거나 또는 조정하여, 암에 대한 신체의 면역 반응을 증강하는데 도움을 주는 단백질, 예를 들면, 인터류킨 및 인터페론을 이용한다. 종양 세포 항원에 표적화된 항체 또한 임상적으로 이용된다.
- [0012] 면역요법의 일부 형태는 선천성 면역계를 활용한다. 건강한 세포 상에서 세포 표면 단백질 CD47 및 이의 식세포 수용체, SIRP알파의 맞물림은 아폽토시스성 세포 제거 및 FcR 매개된 식균작용을 비롯한, 복수 양상에 의해 매개된 탐식을 중지시킬 수 있는 핵심 "돈트 잇 미 (don't eat-me)" 신호를 구성한다. 식세포 상에서 SIRP알파의 CD47 매개된 맞물림을 차단하거나, 또는 녹아웃 생쥐에서 CD47 발현의 상실은 생존 세포 및 비-노화 적혈구의 제거를 유발할 수 있다. 대안으로, SIRP알파 인식을 차단하는 것 또한, 정상적으로는 식균되지 않는 표적의 탐

식을 허용한다. 항-CD47 항체 치료는 암의 대식세포 식균작용을 가능하게 할 뿐만 아니라, 항종양 세포독성 T 세포 면역 반응을 개시할 수 있는 것으로 또한 밝혀졌다.

[0013] 면역조절제의 CD47 차단과의 조합은 또한, 저해성 면역 세포의 종양 항원 제시와 고갈을 증진함으로써 이들 면역조절제의 효력을 증강할 수 있다. 이것은 치료 기간의 단축을 가능하게 하고, 그리고 따라서, 잠재적 독성과 부작용의 지속 기간 및 유의성을 감소시킨다.

[0014] 관련된 간행물은 하기를 포함한다: "Engineered Sirp alpha Variants Asm Immunotherapeutic Adjuvants To Anticancer Antibodies." Science 341(6141): 88-91; Willingham, S. B., J. P. Volkmer, Et Al. (2012). "The Cd47-Signal Regulatory Protein Alpha (Sirpa) Interaction Is A Therapeutic Target For Human Solid Tumors." Proc Natl Acad Sci U S A 109(17): 6662-6667. Chao, M. P., A. A. Alizadeh, Et Al. (2010). "Anti-i-Cd47 Antibody Synergizes With Rituximab To Promote Phagocytosis And Eradicate Non-Hodgkin Lymphoma." Cell 142(5): 699-713. Boyerinas B, Jochems C, Fantini M, Heery CR, Gulley JL, Tsang, KY, and Schlom J. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab (MSB0010718C) on Human Tumor Cells Cancer Immunol Res 2015;3(10): 1148-57. Davis A, Tinker AV, Friedlander M. "Platinum resistant" ovarian cancer: What is it, who to treat and how to measure benefit? Gynecol Oncol 2014;133:624-631. Disis ML, Patel MR, Pant S, Hamilton EP, Lockart AC, Kelly K, Beck JT, Gordon MS, Weiss, GJ, Taylor MH, Chaves J, Mita AC, Chin KM, von Heydebreck A, Cuillerot J-M, Gulley JL. Avelumab (MSB0010718C; anti-PD-L1) in patients with recurrent/refractory ovarian cancer from the JAVELIN Solid Tumor phase 1b trial: Safety and clinical activity. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 5533). Rustin GJS, Vergote I, Eisenhauer E, et al. Definitions for Response and Progression in Ovarian Cancer Clinical Trials Incorporating RECIST 1.1 and CA 125 Agreed by the Gynecological Cancer Intergroup (GCIG). Int J Gynecol Cancer 2011;21: 419-423. Seymour L, Bogaerts J, Perrone A, et al. RECIST working group. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. Lancet Oncol. 2017 Mar;18(3):e143-e152. Tseng D, Volkmer J-P, Willingham SB, et al., Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor. PNAS 2013;110(27):11103-11108. Wilson MK 1, Pujade-Lauraine E, Aoki D, et al. Fifth Ovarian Cancer Consensus Conference of the Gynecologic Cancer InterGroup: recurrent disease. Annals of Oncol 2017; 28: 727-732. Yanagita T, Murata Y, Tanaka D, et al, Anti-SIRPa antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy. JCI Insight, 2017;2(1):e89140. 관련된 출원은 하기를 포함하고: Methods for Achieving Therapeutically Effective Doses of anti-CD47 Agents for Treating Cancer, US 특허 번호 9,623,079. Treatment of cancer with combinations of immunoregulatory agents, US 특허 출원 번호 US 15/411,623, 이들은 각각 본원에서 전체적으로 모든 점에서 참조로서 편입된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 요약

[0016] 개체, 예를 들면, 인간 개체를 항-CD47 항체 및 항-PD-L1 항체의 치료적 조합으로 치료하기 위한 방법이 제공된다. 본 발명의 유익성은 단일 면역조절제, 또는 CD47 차단의 부재에서 면역조절제들의 조합으로서 필요한 용량에 비하여 낮아진 용량의 작용제, 예를 들면, 항-CD47 항체 및 항-PD-L1 항체의 이용일 수 있다. 본 발명의 유익성은 또한, 또는 대안으로, 단일 면역조절제, 또는 CD47 차단의 부재에서 면역조절제들의 조합으로서 치료에 필요한 기간에 비하여, 치료에 필요한 기간에서 감소일 수 있다. 본 발명의 유익성은 또한, 또는 대안으로, 단일 면역조절제, 또는 CD47 차단의 부재에서 면역조절제들의 조합으로 치료 후 관찰된 반응에 비하여 증강된 반응일 수 있다.

[0017] 본 발명의 방법은 항-CD47 항체의 투여를 포함한다. 일부 구체예에서 상기 항체는 인간 IgG4 Fc 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 항-CD47 항체는 CD47에 결합에 대해 Hu5F9-G4와 경쟁한다. 일부 구체예에서, 항-CD47 항체는 Hu5F9-G4와 동일한 CD47 애피토프에 결합한다. 다른 구체예에서, 항-CD47 항체는 Hu5F9-G4이다.

[0018] 본 발명의 방법은 항-PD-L1 항체의 투여를 포함한다. 일부 구체예에서, 항-PD-L1 항체는 아벨루맙 (Bavencio ®)이다.

- [0019] 일부 구체예에서, 항-CD47 항체는 Hu5F9-G4이고, 그리고 항-PD-L1 항체는 아벨루맙 (Bavencio ®)이다.
- [0020] 일부 구체예에서, 난소암은 상피 난소암, 임의적으로 장액성 종양, 점액 종양, 투명 세포 종양, 자궁내막양 종양, 이행 세포 종양, 브레너 종양, 암육종 종양, 혼합 상피 종양, 경계선 상피 종양, 미분화 암종 종양, 난관 종양, 또는 원발성 복막 종양이다. 일부 구체예에서, 상피 난소암은 장액성 종양이고, 예를 들면, 장액성 종양 난소암은 조직학적 분석 서브타이핑에 의해 결정될 때 낮은 등급 또는 높은 등급이다. 일부 구체예에서, 종양 유형은 조직학적 분석에 의해 결정된다.
- [0021] 일부 구체예에서, 개체는 항-PD-L1 항체 미경험이다. 개체는 백금 민감성 또는 대안으로, 백금 저항성일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 방법은 임의의 적합한 전달에 의한 항-CD47 항체 및/또는 항-PD-L1 항체의 투여를 포함한다. 일부 구체예에서, 항-CD47 항체 및/또는 항-PD-L1 항체는 복강내 투여된다. 일부 구체예에서, 항-CD47 항체 및/또는 항-PD-L1 항체는 종양내 투여된다. 일부 구체예에서, 항-CD47 항체 및/또는 항-PD-L1 항체는 정맥내 투여된다. 항-CD47 항체 및 항-PD-L1 항체는 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일부 구체예에서, 항-CD47 항체 및/또는 항-PD-L1 항체의 투여는 기준선과 비교하여 암 마커, 예컨대 CA125, HE4 (인간 부고환 단백질 4), CA-72-4, CA-19-9 및 CEA의 수준을 감소시킨다. 일부 구체예에서, 항-CD47 항체 및/또는 항-PD-L1 항체의 투여는 기준선과 비교하여 개체에서 CA125를 감소시킨다. 일부 구체예에서, CA125의 수준은 약 월 1회 계측된다. 다른 구체예에서, 투여는 개체에서 CA125의 수준을 기준선과 비교하여 적어도 30-90, 40-80, 50-70, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 또는 90% 감소시킨다. 다른 구체예에서, 투여는 임의적으로 영상화에 의해 계측될 때, 기준선과 비교하여 암의 크기 또는 이의 전이를 감소시키고, 임의적으로 여기서 상기 영상화는 크기에서 초기에는 기준선으로부터 증가하지만 차후에는 감소하는 질환을 임의적으로 포함하는 CT/PET/CT 또는 MRI이다.
- [0024] 일부 구체예에서 암의 치료를 위한 치료 섭생은 5F9-G4를 제한 없이 포함하는 항-CD47 항체의 부하 용량의 투여를 포함하는데, 여기서 상기 부하 용량은 20 mg/kg 내지 67.5 mg/kg의 용량에서 주 2회 투여되고; 그리고 20 mg/kg 내지 30 mg/kg의 용량에서 주 2회 투여될 수 있다. 환자는 이후, 10 mg/kg 내지 40 mg/kg의 용량에서 주 1회 또는 주 2회 유지 용량이 투여되고; 그리고 20 mg/kg 내지 30 mg/kg의 용량에 있을 수 있다. 일부 이런 구체예에서 암은 난소암이다. 일부 이런 구체예에서, 암은 상피 난소암, 예를 들면, 장액성 종양, 점액 종양, 투명 세포 종양, 자궁내막양 종양, 이행 세포 종양, 브레너 종양, 암육종 종양, 혼합 상피 종양, 경계선 상피 종양, 미분화 암종 종양, 난관 종양, 또는 원발성 복막 종양이다.
- [0025] 일부 구체예에서, 항-PD-L1 항체의 치료 효과량은 10 mg/kg이다. 일부 구체예에서, 항-PD-L1 항체는 14 일마다 투여된다. 일부 구체예에서, 항-PD-L1 항체는 초회감작 투약 후 7 일에, 그리고 그 후 14 일마다 투여된다. 일부 구체예에서, 항-PD-L1 항체는 초회감작 투약과 동일자에, 그리고 그 후 14 일마다 투여된다.
- [0026] 본 발명은 또한, 항-CD47 항체 및 항-PD-L1 항체를 포함하는 조성물을 포함한다. 본 발명은 또한, 항-CD47 항체, 항-PD-L1 항체 및 사용설명서를 포함하는 키트를 포함한다.

과제의 해결 수단

- [0027] 상세한 설명
- [0028] 개체에서 난소암을 치료하거나 또는 난소암의 크기를 감소시키기 위한 방법이 제공되는데, 상기 치료는 항-CD47 항체 및 항-PD-L1 항체를 개체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0029] 본 발명의 활성제와 방법을 설명하기에 앞서, 본 발명은 설명된 특정 방법, 산물, 기구와 인자에 한정되지 않는 것으로 이해되는데, 그 이유는 이런 방법, 기구와 제제가 당연히, 달라질 수 있기 때문이다. 또한, 본원에서 이 용어는 단지 특정 구체예를 설명하기 위한 것이고, 그리고 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 의도되지 않으며, 상기 범위는 첨부된 청구범위에 의해서만 한정되는 것으로 이해된다.
- [0030] 유의해야 할 점은 본 명세서에서 및 첨부된 청구범위에서 이용된 바와 같이, 단수 형태 ("a", "and" 및 "the")는 문맥에서 별도로 지시되지 않으면, 복수 지시대상을 포함한다는 것이다. 따라서, 예를 들면, "약물 후보"에 대한 참조는 이런 후보 중에서 한 가지 또는 이들의 혼합물을 지칭하고, 그리고 "방법"에 대한 참조는 당업자에게 공지된 동등한 단계와 방법에 대한 참조를 포함하고, 기타 등등이다.
- [0031] 별도로 정의되지 않으면, 본원에서 이용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속하는 당해 분야의 평균적

기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 언급된 모든 간행물은 이들 간행물에서 설명되고, 그리고 본원에서 설명된 발명과 관련하여 이용될 수 있을지도 모르는 장치, 제제와 방법을 설명하고 개시하는 목적으로 본원에서 참조로서 편입된다.

[0032] 값의 범위가 제공되는 경우에, 문맥에서 별도로 명시되지 않으면, 상기 범위의 상한선과 하한선 사이에 하한선의 단위의 1/10까지 각 개재성 값, 그리고 언급된 범위 내에 임의의 다른 진술된 또는 개재성 값이 본 발명 내에 포함되는 것으로 이해된다. 더욱 작은 범위 내에 독립적으로 포함될 수 있는, 이들 더욱 작은 범위의 상한선과 하한선 또한, 본 발명의 범위 안에 포함되고 언급된 범위 내에 임의의 특정적으로 배제된 한계에 종속된다. 언급된 범위가 한계 중에서 한쪽 또는 양쪽을 포함하는 경우에, 이들 포함된 한계의 한쪽 또는 양쪽을 배제하는 범위 역시 본 발명에서 포함된다.

[0033] 하기 설명에서, 본 발명에 관한 더욱 철저한 이해를 제공하기 위해 다양한 특정한 상세가 진술된다. 하지만, 본 발명이 이들 특정한 상세 중에서 한 가지 또는 그 이상이 없다 하더라도 실시될 수 있다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 다른 사례에서, 당업자에게 널리 공지된 특질과 절차는 발명을 모호하게 하는 것을 방지하기 위해 설명되지 않았다.

[0034] 일반적으로, 단백질 합성, 재조합 세포 배양 및 단백질 단리의 전통적인 방법, 그리고 당해 분야의 기술 내에 재조합 DNA 기술이 본 발명에서 이용된다. 이런 기술은 기존 문헌에서 충분히 설명되는데, 예를 들면, Maniatis, Fritsch & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); Sambrook, Russell and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2001); Harlow, Lane and Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. I, Cold Spring Harbor Laboratory (1998); 및 Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988)을 참조한다.

정의

[0035] 본원에서 이용된 바와 같이, "항-CD47 항체"는 SIRP α (예를 들면, 표식 세포 상에서)에 CD47 (예를 들면, 표적 세포 상에서)의 결합을 감소시키는 임의의 항체를 지칭한다. 무제한적 실례가 아래에 더욱 상세하게 설명되고 Hu5F9-G4를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0036] 아래에 더욱 상세하게 설명된 바와 같이, 항-PD-L1 항체는 PD1 (예정된 사례 1)에 PD-L1 (PD1 리간드)의 결합을 저해하는 항체이다. 실례는 아벨루맙을 포함한다.

[0037] 본원에서 이용된 바와 같이, "항체"는 특정 항원과 면역학적으로 반응성인 면역글로불린 분자에 대한 참조를 포함하고, 그리고 다중클론과 단일클론 항체 둘 모두를 포함한다. 상기 용어는 또한, 유전적으로 가공된 형태, 예컨대 키메라 항체 (예를 들면, 인간화 뮤린 항체) 및 혜테로접합체 항체를 포함한다. 용어 "항체"는 또한, 항원 결합 능력을 갖는 단편 (예를 들면, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv 및 rIgG를 비롯한, 항체의 항원 결합 형태를 포함한다. 상기 용어는 또한, 재조합 단일 사슬 Fv 단편 (scFv)을 지칭한다. 용어 항체는 또한, 이가 또는 이중특이적 분자, 디아바디, 트리아바디, 그리고 테트라바디를 포함한다. 용어 항체에 관한 추가 설명은 아래에서 발견된다.

[0038] 본 발명을 위해, "환자"는 애완동물 및 실험 동물, 예를 들면, 생쥐, 쥐, 토끼 등을 비롯하여, 인간 및 다른 동물, 특히 포유동물 둘 모두를 포함한다. 따라서 이들 방법은 인간 요법 및 수의학적 적용 둘 모두에 적용가능하다. 한 구체예에서 환자는 포유동물, 바람직하게는 영장류이다. 다른 구체예에서 환자는 인간이다.

[0039] 용어 "피험자," "개체" 및 "환자"는 치료를 위해 사정되는 및/또는 치료되는 포유동물을 지칭하기 위해 본원에서 교체가능하게 이용된다. 한 구체예에서, 포유동물은 인간이다. 용어 "피험자," "개체" 및 "환자"는 암을 앓는 개체를 제한 없이 포함한다. 개체는 인간일 수 있지만, 다른 포유동물, 특히 인간 질환에 대한 실험실 모형으로서 유용한 포유동물, 예컨대 생쥐, 쥐 등을 또한 포함한다.

[0040] 본원에서 이용된 바와 같이, 관용구 "백금 민감성"은 마지막 백금-기초된 화학요법을 제공받은 후 6 개월 이후에 재발성 질환이 발달하는 인간 개체를 지칭한다.

[0041] 본원에서 이용된 바와 같이, 관용구 "백금 저항성"은 마지막 백금-기초된 화학요법을 제공받은 후 6 개월 이내에 재발성 질환이 발달하는 인간 개체를 지칭한다.

[0042] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "기준선"은 난소암을 앓는 인간 개체에 첫 번째 치료 투여에 앞서 30 일 기간으로서 규정된다.

- [0044] 환자에 대하여 용어 "표본"은 혈액 및 생물학적 기원의 다른 액체 표본, 고형 조직 표본, 예컨대 생검 검체 또는 조직 배양액, 또는 그것으로부터 유래된 세포 및 이들의 자손을 포함한다. 상기 정의는 또한, 예컨대 시약으로 처리; 세척; 또는 일정한 세포 개체군, 예컨대 암 세포에 대한 농축에 의해, 그들의 구입 후 어떤 방식으로든 조작된 표본을 포함한다. 상기 정의는 또한, 특정 유형의 분자, 예를 들면, 혼산, 폴리펩티드 등에 대해 농축된 표본을 포함한다. 용어 "생물학적 표본"은 임상적 표본을 포함하고, 그리고 또한, 외과적 적출에 의해 획득된 조직, 생검에 의해 획득된 조직, 배양 중인 세포, 세포 상층액, 세포 용해물, 조직 표본, 장기, 골수, 혈액, 혈장, 혈청 등을 포함한다. "생물학적 표본"은 환자의 암 세포로부터 획득된 표본, 예를 들면, 환자의 암 세포로부터 획득되는 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드를 포함하는 표본 (예를 들면, 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드를 포함하는 세포 용해물 또는 다른 세포 추출물); 그리고 환자로부터 암 세포를 포함하는 표본을 포함한다. 환자로부터 암 세포를 포함하는 생물학적 표본은 또한, 비암성 세포를 포함할 수 있다.
- [0045] 용어 "진단"은 분자 또는 병리학적 상태, 질환 또는 장애의 확인, 예컨대 유방암, 전립선암, 또는 다른 유형의 암의 분자 아형의 확인을 지칭하기 위해 본원에서 이용된다.
- [0046] 용어 "예후"는 신생물 질환, 예컨대 난소암의 암-기인한 사망, 또는 재발, 전이성 혼산 및 약제 내성을 비롯한 진행의 가능성의 예측을 지칭하기 위해 본원에서 이용된다. 용어 "예측"은 관찰, 경험, 또는 과학적 추론에 근거하여, 예측하거나 또는 추정하는 행위를 지칭하기 위해 본원에서 이용된다. 한 가지 실례에서, 의사는 원발성 종양의 외과적 제거 및/또는 일정한 기간 동안 화학요법 이후에, 환자가 암 재발 없이 생존할 가능성을 예측할 수 있다.
- [0047] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "치료," "치료하는" 등은 효과를 획득하는 목적으로, 작용제를 투여하거나, 또는 시술을 시행하는 것을 지칭한다. 상기 효과는 질환 또는 이의 증상을 완전하게 또는 부분적으로 예방한다는 면에서 방지적일 수 있고 및/또는 질환 및/또는 상기 질환의 증상에 대한 부분적인 또는 완전한 치유를 달성한다는 면에서 치료적일 수 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, "치료"는 포유동물에서, 특히 인간에서 종양의 치료를 포함할 수 있고, 그리고 (a) 상기 질환, 또는 상기 질환에 대한 소인이 있을 수 있지만 이것을 앓는 것으로 아직 진단되지 않은 개체에서 발생하는 질환 (예를 들면, 원발성 질환과 연관되거나 또는 이것에 의해 유발될 수 있는 질환 포함)의 증상을 예방하는; (b) 상기 질환을 저해하는, 다시 말하면, 이의 발달을 저지하는; 그리고 (c) 상기 질환을 완화하는, 다시 말하면, 상기 질환의 퇴행을 유발하는 것을 포함한다.
- [0048] 치료하는 것은 임의의 객관적인 또는 주관적인 파라미터, 예컨대 감소; 관해; 증상의 축소, 또는 환자가 질환 상태를 더욱 견뎌내도록 만듦; 변성 또는 감퇴의 속도에서 늦춤; 또는 변성의 최종점이 더욱 적게 심신쇠약성이 되도록 만듦을 비롯하여, 암의 치료 또는 개선 또는 예방에서 성공의 임의의 증인을 지칭할 수 있다. 증상의 치료 또는 개선은 의사에 의한 검사의 결과를 비롯한, 객관적인 또는 주관적인 파라미터에 근거될 수 있다. 따라서, 용어 "치료하는"은 암 또는 다른 질환을 예방하거나 또는 지연시키거나, 경감하거나, 또는 이들과 연관된 증상 또는 상태의 발달을 저지하거나 또는 저해하기 위한, 본 발명의 화합물 또는 작용제의 투여를 포함한다. 용어 "치료 효과"는 개체에서 질환, 상기 질환의 증상, 또는 상기 질환의 부작용의 감소, 제거, 또는 예방을 지칭한다.
- [0049] "조합으로", "복합 요법" 및 "조합 산물"은 일정한 구체예에서, 환자에게 본원에서 설명된 작용제의 동시 투여를 지칭한다. 조합으로 투여될 때, 각 성분은 동시에 또는 상이한 시점에서 임의의 순서로 순차적으로 투여될 수 있다. 따라서, 각 성분은 원하는 치료 효과를 제공하기 위해 별개로, 하지만 시간상으로 충분히 가깝게 투여될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 방법에서 활성제의 "수반성 투여"는 이를 작용제가 동시에 치료 효과를 나타낼 그와 같은 시점에서 이들 시약으로 투여를 의미한다. 이런 수반성 투여는 이를 작용제의 동시 (다시 말하면, 동시에) 투여, 이전 투여, 또는 차후 투여를 수반할 수 있다. 당업자는 본 발명의 특정 약물과 조성물에 대한 온당한 시기선택, 투여 순서 및 투여량을 결정하는데 어려움이 없을 것이다.
- [0051] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "상관시킨다," 또는 "상관한다" 및 유사한 용어는 2가지 사건의 사례 사이에 통계학적 연관을 지칭하는데, 여기서 사건은 숫자, 데이터 세트 등을 포함한다. 예를 들면, 사건이 숫자를 포함할 때, 양성 상관 (본원에서 "직접적인 상관"으로서 또한 지칭됨)은 하나가 증가함에 따라서, 다른 하나 역시 증가한다는 것을 의미한다. 음성 상관 (본원에서 "역 상관"으로서 또한 지칭됨)은 하나가 증가함에 따라서, 다른 하나가 감소한다는 것을 의미한다.
- [0052] "투약 단위"는 치료되는 특정 개체에 대한 단위 용량으로서 적합한 물리적으로 구별된 단위를 지칭한다. 각 단

위는 필요한 제약학적 담체와 연관하여, 원하는 치료 효과(들)를 발생시키는 것으로 계산된 미리 결정된 양의 활성 화합물(들)을 내포할 수 있다. 복용 단위 형태에 대한 사양은 (a) 활성 화합물(들)의 독특한 특징 및 달성되는 특정 치료 효과(들), 그리고 (b) 이런 활성 화합물(들)을 배합할 때 당해 분야에서 내재하는 제약에 의해 좌우될 수 있다.

[0053] "치료 효과량"은 질환을 치료하기 위해 개체에게 투여될 때, 상기 질환에 대한 치료를 달성하는데 충분한 양을 의미한다.

[0054] 치료 방법

[0055] 난소암을 앓는 인간 개체를 치료하거나 또는 난소암의 크기를 감소시키기 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 항-CD47 항체 및 항-PD-L1 항체를 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 이런 방법은 ESA와의 조합을 제한 없이 포함하는, 본 발명의 조합된 작용제의 치료 효과량 또는 유효 용량을 치료가 필요한 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0056] 항-PD-L1 항체는 항-CD47 항체의 효력을 증강할 수 있다. 항-CD47 항체는 만약 저해성 항-PD1/PD-L1 경로가 차단되면 확대될 수 있는 종양 특이적 T 세포의 초회감작을 모의하기 위해 조합으로 또는 항-PD-L1 항체에 앞서 투여될 수 있다.

[0057] 항-CD47 항체의 본원에서 설명된 항-PD-L1 항체와의 조합은 이들 요법에 반응성인 종양 아형을 앓는 환자에게 제공된다. 이들 종양은 본원에서 설명된 바와 같이, 더욱 많은 종양 항원을 유발하는 더욱 높은 빈도의 돌연변이에 의해 규정되고, 이런 이유로 더욱 면역원성일 수 있다. 일부 구체예에서 복합 요법으로 치료되는 환자는 면역 활성인자 또는 관문 저해제로 치료에 반응성이다; 하지만 이것은 특정한 잠재적으로 반응성 종양 아형 내에 환자 중에서 대략 25%의 부분집합을 나타낸다. 일부 구체예에서, 개체는 백금 요법 민감성 또는 저항성일 수 있다.

[0058] 일부 구체예에서, 요지 방법은 프라이머 작용제를 개체에게 투여하는 단계, 그 이후에 치료적으로 유효 용량의 항-CD47 항체 및 항-PD-L1 항체를 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 치료적으로 유효 용량을 투여하는 단계는 프라이머 작용제의 투여를 시작한 후 적어도 약 3 일 (예를 들면, 적어도 약 4 일, 적어도 약 5 일, 적어도 약 6 일, 적어도 약 7 일, 적어도 약 8 일, 적어도 약 9 일, 또는 적어도 약 10 일) 후 수행된다. 이러한 기간은 예를 들면, 개체에 의한 증강된 망상적혈구 생산을 제공하는데 충분하다.

[0059] 치료적으로 유효 용량의 항-CD47 항체 및/또는 항-PD-L1 항체의 투여는 다수의 상이한 방식으로 달성될 수 있다. 일부 사례에서, 프라이머 작용제가 투여된 후, 2회 또는 그 이상의 치료적으로 유효 용량이 투여된다. 치료적으로 유효 용량의 적합한 투여는 단일 용량의 투여를 수반할 수 있거나, 또는 매일, 주 2회, 주 1회, 2 주마다 1회, 월 1회, 연 1회 등으로 용량의 투여를 수반할 수 있다. 일부 사례에서, 치료적으로 유효 용량은 단계적으로 확대되는 농도 (다시 말하면, 증가하는 용량)의 2회 또는 그 이상의 용량으로서 투여되는데, 여기서 (i) 모든 용량이 치료 용량이고, 또는 여기서 (ii) 치료이하 용량 (또는 2회 또는 그 이상의 치료이하 용량)이 초기에 제공되고 치료 용량이 상기 단계적 확대에 의해 달성된다. 단계적으로 확대되는 농도 (다시 말하면, 증가하는 용량)를 예시하기 위한 한 가지 무제한적 실례로서, 치료적으로 유효 용량은 치료이하 용량 (예를 들면, 5 mg/kg의 용량)으로 시작하여 주 1회 투여될 수 있고, 그리고 투여가 중단될 수 있거나 또는 지속될 수 있는 (예를 들면, 지속된 치료 용량, 예를 들면, 30 mg/kg의 용량) 시점인, 치료 용량 (예를 들면, 30 mg/kg)이 도달될 때까지, 각 차후 용량이 특정 증분 (예를 들면, 5 mg/kg)으로, 또는 가변적 증분으로 증가될 수 있다. 단계적으로 확대되는 농도 (다시 말하면, 증가하는 용량)를 예시하기 위한 다른 무제한적 실례로서, 치료적으로 유효 용량은 치료 용량 (예를 들면, 10 mg/kg의 용량)으로 시작하여 주 1회 투여될 수 있고, 그리고 각 차후 용량은 투여가 중단될 수 있거나 또는 지속될 수 있는 (예를 들면, 지속된 치료 용량, 예를 들면, 30 mg/kg, 100 mg/ml 등의 용량) 시점인, 치료 용량 (예를 들면, 30 mg/kg, 100 mg/ml 등)이 도달될 때까지, 특정 증분 (예를 들면, 10 mg/kg)으로, 또는 가변적 증분으로 증가될 수 있다. 일부 구체예에서, 치료적으로 유효 용량의 투여는 연속 주입일 수 있고, 그리고 상기 용량은 시간의 추이에서 변경 (예를 들면, 증가)될 수 있다.

[0060] 용량과 빈도는 환자에서 항-CD47 항체 및/또는 항-PD-L1 항체의 반감기에 따라서 변할 수 있다. 이런 지침은 예를 들면, 항체 단편의 이용에서, 항체 접합체의 이용에서, 가용성 CD47 웨პ티드의 이용에서, 기타 등등에서 활성 제의 분자량에 맞춰 조정될 것으로 당업자에 의해 이해될 것이다. 용량은 또한, 국부 투여, 예를 들면, 비내, 흡입 등, 또는 전신 투여, 예를 들면, i.m., i.p., i.v., s.c. 등에 맞춰 변할 수 있다.

[0061] 본 발명의 일정한 구체예에서, 항-CD47 항체는 초기 용량에서, 그리고 임의적으로 차후 용량에서, RBC 및 상기

작용제의 높은 국부 농도가 존재하는 혈액학적 미세환경의 가능성을 감소시키는 기간 및/또는 농도에 걸쳐 환자에게 주입된다.

[0062] 본 발명의 일부 구체예에서, 항-CD47 항체의 초기 용량은 적어도 약 2 시간, 적어도 약 2.5 시간, 적어도 약 3 시간, 적어도 약 3.5 시간, 적어도 약 4 시간, 적어도 약 4.5 시간, 적어도 약 5 시간, 적어도 약 6 시간 또는 그 이상의 기간에 걸쳐 주입된다. 일부 구체예에서 초기 용량은 약 2.5 시간 내지 약 6 시간; 예를 들면, 약 3 시간 내지 약 4 시간의 기간에 걸쳐 주입된다. 일부 이런 구체예에서, 주입액에서 작용제의 용량은 약 0.05 mg/ml 내지 약 0.5 mg/ml; 예를 들면, 약 0.1 mg/ml 내지 약 0.25 mg/ml이다.

[0063] 요지 방법은 또한, 항-PD-L1 항체 및 항-CD47 항체의 공동투여를 포함한다. 일부 구체예에서, 항-PD-L1 항체는 아벨루맙이다. 일부 구체예에서, 치료를 제공받는 개체는 항-PD-L1 항체 미경험이다. 항-PD-L1 항체는 항-CD47 항체와 함께 또는 별개로, 임의의 적합한 전달 방법으로, 예를 들면, i.v., i.p., 피하, 종양내, 또는 복강내 투여될 수 있다. 항-PD-L1 항체의 치료 효과량은 약 10 mg/kg일 수 있다. 일부 구체예에서, 항-PD-L1 항체는 14 일마다 투여될 수 있다. 다른 구체예에서, 항-PD-L1 항체는 항-CD47 항체의 초회감작 투약 후 7 일에, 그리고 그 후 14 일마다 투여될 수 있다. 다른 구체예에서, 항-PD-L1 항체는 항-CD47 항체의 초회감작 투약과 함께, 그리고 그 후 14 일마다 투여될 수 있다.

난소암

[0065] 난소암을 앓는 개체를 치료하거나 또는 개체에서 난소암의 크기를 감소시키기 위한 방법이 본원에서 제공되는데, 이들 방법은 항-CD47 항체의 치료 효과량을 상기 개체에게 투여하는 단계; 그리고 적어도 하나의 항-PD-L1 항체의 치료 효과량을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0066] 난소암의 실례는 상피 난소암, 임의적으로 장액성 종양, 점액 종양, 투명 세포 종양, 자궁내막양 종양, 이행 세포 종양, 브레너 종양, 암육종 종양, 혼합 상피 종양, 경계선 상피 종양, 미분화 암종 종양, 난관 종양, 또는 원발성 복막 종양을 포함한다.

[0067] 일부 구체예에서, 상피 난소암은 장액성 종양이다. 장액성 종양 난소암은 조직학적 분석 서브타이핑에 의해 낮은 등급 또는 높은 등급인 것으로 결정될 수 있다. 한 구체예에서, 개체는 백금 화학요법 민감성이다. 다른 구체예에서, 개체는 백금 화학요법 저항성이다. 일부 구체예에서, 개체는 PD-L1 미경험이다.

[0068] 일부 구체예에서, 환자는 낮은 돌연변이 부담을 갖는다. 일부 구체예에서, 환자는 높은 돌연변이 부담을 갖는다. 당해 분야에서 공지된 바와 같이, 암 유형은 돌연변이의 평균 또는 특정한 정도에서 서로 다를 수 있는데, 여기서 돌연변이의 더욱 높은 수준은 신향원의 증가된 발현과 연관된다. 참조: 예를 들면, Vogelstein et al., (2013), 위와 같음. 낮은 돌연변이 부담은 종양마다 약 10개까지, 약 20개까지, 약 30개까지, 약 40개까지, 약 50개까지의 비유의한 돌연변이의 종양마다 평균, 또는 개별 종양에 대한 특정한 숫자를 갖는 암 유형일 수 있다. 높은 돌연변이 부담은 종양마다 약 50개 이상, 약 75개 이상, 약 100개 이상, 약 125개 이상, 약 150개 이상의 비유의한 돌연변이를 갖는 암 유형일 수 있다.

[0069] 일부 이런 구체예에서 암은 제한 없이, 난소암이다. 일부 이런 구체예에서, 암은 높은 신향원, 또는 돌연변이 유발 부담을 갖는 유형이다 (참조: 본원에서 특정적으로 참조로서 편입되는 Vogelstein et al. (2013) Science 339(6127):1546-1558). 다른 구체예에서, 암은 낮은 신향원 부담을 갖는 유형이다. 일부 이런 구체예에서, 본 발명의 복합 요법은 관문 저해제의 활성을 증강한다. 다른 구체예에서, 개별 암이 관문 저해제 단독에 반응하지 않는 경우에, 복합 요법은 치료 반응을 제공한다. 일부 구체예에서, 개체는 백금 민감성이다. 다른 구체예에서, 개체는 백금 저항성이다.

암

[0071] 용어 "암," "신생물" 및 "종양"은 세포 증식에 대한 제어의 유의미한 상실에 의해 특징되는 일탈적 성장 표현형을 전시할 만큼, 자율적인 조절되지 않은 성장을 전시하는 세포를 지칭하기 위해 본원에서 교체가능하게 이용된다. 본 출원에서 검출, 분석 또는 치료를 위한 관심되는 세포는 전암성 (예를 들면, 양성), 악성, 전전이성, 전이성 및 비전이성 세포를 포함한다. 사실상 모든 조직의 암이 알려져 있다. 관용구 "암 부담"은 개체에서 암 세포의 퀀텀 또는 암 체적을 지칭한다. 암 부담을 감소시키는 것은 따라서, 개체에서 암 세포의 숫자 또는 암 체적을 감소시키는 것을 지칭한다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "암 세포"는 암 세포이거나 또는 암 세포로부터 유래되는 임의의 세포, 예컨대 암 세포의 클론을 지칭한다. 고형 종양, 예컨대 암종, 육종, 교모세포종, 흑색종, 림프종, 골수종 등, 그리고 순환 암, 예컨대 백혈병을 비롯한, 많은 유형의 암이 당업자에게 알려져 있다. 암의 실례는 난소암, 유방암, 결장암, 폐암, 전립선암, 간세포암, 위암, 췌장암, 자궁경부암, 난소암,

간암, 방광암, 요로암, 갑상선암, 신장암, 암종, 흑색종, 두경부암, 그리고 뇌암을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0072] 암의 "병리"는 환자의 행복을 훼손하는 모든 현상을 포함한다. 이것은 비정상적인 또는 통제할 수 없는 세포 성장, 전이, 이웃 세포의 정상적인 기능의 간섭, 비정상적인 수준에서 사이토킨 또는 다른 분비 산물의 방출, 염증성 또는 면역학적 반응의 억제 또는 악화, 신생물, 전악성, 악성종양, 주변 또는 멀리 떨어진 조직 또는 장기, 예컨대 림프절의 침습 등을 제한 없이 포함한다.

[0073] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "암 재발" 및 "종양 재발", 그리고 이들의 문법적 변이체는 암의 진단 후 신생물성 또는 암성 세포의 추가 성장을 지칭한다. 특히, 추가 암성 세포 성장이 암성 조직에서 일어날 때, 재발이 발생할 수 있다. "종양 확산"은 유사하게, 종양의 세포가 국부 또는 원위 조직과 장기 내로 파종될 때 발생한다; 이런 이유로, 종양 확산은 종양 전이를 포함한다. "종양 침습"은 종양 성장이 국부로 확산하여 정상적인 장기 기능의 압박, 파괴 또는 방해에 의해, 침습된 조직의 기능을 훼손할 때 발생한다.

[0074] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "전이"는 본래 암성 종양의 장기에 직접적으로 연결되지 않은 장기 또는 신체 부위에서 암성 종양의 성장을 지칭한다. 전이는 본래 암성 종양의 장기에 직접적으로 연결되지 않은 장기 또는 신체 부위에서 검출할 수 없는 양의 암성 세포의 존재인 미세전이를 포함하는 것으로 이해될 것이다. 전이는 또한, 과정의 여러 단계, 예컨대 본래 종양 부위로부터 암 세포의 일탈 및 암 세포의 다른 신체 부위로의 이주 및/또는 침습으로서 규정될 수 있다.

임상적 종결점

[0075] 본원에서 설명된 방법은 기준선과 비교하여 적어도 하나의 향상된 종결점을 유발한다.

[0076] 본 발명의 일부 구체예에서, 항-CD47 항체 및/또는 항-PD-L1 항체의 투여는 기준선과 비교하여 암 마커, 예컨대 CA125, HE4 (인간 부고환 단백질 4), CA-72-4, CA-19-9 및 CEA의 수준을 감소시킨다. 일부 구체예에서, 항-CD47 항체 및/또는 항-PD-L1 항체의 투여는 기준선과 비교하여 개체에서 CA125를 감소시킨다. 일부 구체예에서, CA125의 수준은 약 월 1회 계측된다. 다른 구체예에서, 투여는 개체에서 CA125의 수준을 기준선과 비교하여 적어도 30-90, 40-80, 50-70, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 또는 90% 감소시킨다. CA125는 면역검정으로 계측될 수 있다. CA125는 Mongia et al., *Performance characteristics of seven automated CA 125 assays*. Am J Clin Pathol. 2006 Jun; 125(6):921-7 (본원에서 모든 점에서 참조로서 편입됨)에서 개시된 검정 중에서 한 가지 또는 그 이상을 이용하여 계측될 수 있다. 다른 구체예에서, 투여는 임의적으로 영상화에 의해 계측될 때, 기준선과 비교하여 암의 크기 또는 이의 전이를 감소시키고, 임의적으로 여기서 상기 영상화는 크기에서 초기에는 기준선으로부터 증가하지만 차후에는 감소하는 질환을 임의적으로 포함하는 CT/PET/CT 또는 MRI이다.

[0077] 본원에서 이용된 바와 같이, 치료에 대한 종결점은 당해 분야에서 공지되고 미국 식품의약국에 의해 이용되는 바와 같은 의미가 제공될 것이다.

[0078] 전체 생존은 무작위배정으로부터 임의의 원인으로 인한 사망 때까지의 시간으로서 규정되고, 그리고 치료 의도 개체군에서 계측된다. 생존은 가장 신뢰할 만한 암 종결점인 것으로 고려되고, 그리고 생존을 적절하게 사정하기 위한 연구가 수행될 때, 이것은 통상적으로 바람직한 종결점이다. 이러한 종결점은 정확하고, 계측하기 쉽고, 사망의 일자에 의해 문서화된다. 바이어스는 종결점 계측에서 인자가 아니다. 생존 향상은 임상적 유익성을 사정하기 위한 위험 편의 분석으로서 분석되어야 한다. 전체 생존은 무작위배정 대조 연구에서 평가될 수 있다. 전체 생존에서 통계학적으로 유의한 향상의 입증은 만약 독성 프로필이 용인되면 임상적으로 유의미한 것으로 고려될 수 있고, 그리고 종종 새로운 약물 승인을 뒷받침하였다. 본 발명의 방법의 유익성은 환자의 증가된 전체 생존을 포함할 수 있다.

[0079] 종양 사정에 근거되는 종결점은 DFS, ORR, TTP, PFS, 그리고 치료 실패까지 시간 (TTF)을 포함한다. 이들 시간-의존성 종결점에 관한 데이터의 수집과 분석은 간접적인 사정, 계산 및 추정 (예를 들면, 종양 계측)에 근거된다. 질환 없는 생존 (DFS)은 무작위배정으로부터 종양의 재발 또는 임의의 원인으로 인한 사망 때까지의 시간으로서 규정된다. 이러한 종결점의 가장 빈번한 이용은 완결 수술 또는 방사선요법 후 어쥬번트 세팅에서이다. DFS는 또한, 높은 비율의 환자가 화학요법으로 완전한 반응을 달성할 때 중요한 종결점일 수 있다.

[0080] 객관적 반응률. ORR은 최소 기간 동안 및 미리 규정된 양의 종양 크기 감소를 갖는 환자의 비율로서 규정된다. 반응 지속 기간은 통상적으로, 초기 반응의 시간으로부터 문서화된 종양 진행 때까지 계측된다. 일반적으로, FDA는 ORR을 부분적인 반응 플러스 완전한 반응의 합계로서 규정하였다. 이러한 방식으로 규정될 때, ORR은 단

일-팔 연구에서 평가될 수 있는, 약물 항종양 활성의 직접적인 척도이다.

[0082] 진행까지 시간 및 진행 없는 생존. TTP 및 PFS는 약물 승인을 위한 일차 종결점으로서 역할을 하였다. TTP는 무작위배정으로부터 객관적인 종양 진행 때까지의 시간으로서 규정된다; TTP는 사망을 포함하지 않는다. PFS는 무작위배정으로부터 객관적인 종양 진행 또는 사망 때까지의 시간으로서 규정된다. 종양 진행의 정확한 정의는 중요하고, 그리고 프로토콜에서 신중하게 상술되어야 한다.

[0083] 항체

[0084] 본원에서 설명된 방법은 항체 또는 항체들의 투여, 다시 말하면, 항 CD47 항체의 투여, 그리고 일부 구체예에서, 항 PD-L1 항체의 투여를 포함한다. 전술된 바와 같이, 용어 "항체"는 특정 항원과 면역학적으로 반응성인 면역글로불린 분자에 대한 참조를 포함하고, 그리고 다중클론과 단일클론 항체 둘 모두를 포함한다. 상기 용어는 또한, 유전적으로 가공된 형태, 예컨대 키메라 항체 (예를 들면, 인간화 뮤린 항체) 및 헤테로접합체 항체를 포함한다. 용어 "항체"는 또한, 항원 결합 능력을 갖는 단편 (예를 들면, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv 및 rIgG를 비롯한, 항체의 항원 결합 형태를 포함한다. 상기 용어는 또한, 재조합 단일 사슬 Fv 단편 (scFv)을 지칭한다. 용어 항체는 또한, 이가 또는 이중특이적 분자, 디아바디, 트리아바디, 그리고 테트라바디를 포함한다.

[0085] 항체의 선별은 선택성, 친화성, 세포독성 등을 비롯한, 다양한 기준에 근거될 수 있다. 단백질 또는 웨티드를 지칭할 때, 관용구인 항체에 "특이적으로 (또는 선별적으로) 결합한다" 또는 항체와 "특이적으로 (또는 선별적으로) 면역반응성"은 단백질 및 다른 생물체의 이질성 개체군에서 단백질의 존재를 결정하는 결합 반응을 지칭한다. 따라서, 지정된 면역검정 조건 하에, 특정된 항체는 배경의 적어도 2배, 그리고 더욱 전형적으로, 배경의 10 내지 100배 이상으로 특정 단백질 서열에 결합한다. 일반적으로, 본 발명의 항체는 작동체 세포 (예컨대 자연 킬러 세포 또는 대식세포)의 존재에서 표적 세포의 표면상에서 항원에 결합한다. 작동체 세포 상에서 Fc 수용체는 결합된 항체를 인식한다.

[0086] 특정 항원과 면역학적으로 반응성인 항체는 재조합 방법, 예컨대 파지 또는 유사한 백터에서 재조합 항체의 라이브리리의 선별에 의해, 또는 동물을 항원 또는 상기 항원을 인코딩하는 DNA로 면역화함으로써 산출될 수 있다. 다중클론 항체를 제조하는 방법은 당업자에게 알려져 있다. 항체는 대안으로 단일클론 항체일 수 있다. 단일클론 항체는 하이브리도마 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 하이브리도마 방법에서, 온당한 숙주 동물은 전형적으로, 면역체에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 또는 생산할 수 있는 림프구를 이끌어 내는 면역체로 면역화된다. 대안으로, 림프구는 시험관내에서 면역화될 수 있다. 림프구는 이후, 하이브리도마 세포를 형성하기 위해, 적합한 융합 작용체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 영속화된 세포주와 융합된다.

[0087] 인간 항체는 파지 전시 라이브리리를 비롯하여, 당해 분야에서 공지된 다양한 기술을 이용하여 생산될 수 있다. 유사하게, 인간 항체는 인간 면역글로불린 좌위를 유전자도입 동물, 예컨대 내인성 면역글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전하게 비활성화된 생쥐 내로 도입함으로써 만들어질 수 있다. 공격 접종 시에, 유전자 재배열, 어셈블리 및 항체 레퍼토리를 비롯한, 모든 양상에서 인간에서 목격되는 것과 매우 유사한 인간 항체 생산이 관찰된다.

[0088] 항체는 또한, 다양한 웨티드분해효소로 절단에 의해 생산되는 다수의 충분히 특징화된 단편으로서 존재한다. 따라서 웨신은 헌지 영역 내에 디설피드 연쇄 아래에서 항체를 절단하여 Fab의 이합체인 F(ab')₂를 생산하는데, 이것은 그 자체로, 디설피드 결합에 의해 V_H-C_{H1}에 결합된 경쇄이다. F(ab')₂는 온화한 조건 하에 환원되어 헌지 영역 내에 디설피드 연쇄가 파괴되고, 따라서 F(ab')₂ 이합체가 Fab' 단량체로 전환될 수 있다. Fab' 단량체는 헌지 영역의 일부를 갖는 본질적으로 Fab이다. 다양한 항체 단편이 무순상 항체의 절단의 면에서 규정되긴 하지만, 당업자는 이런 단편이 화학적으로, 또는 재조합 DNA 방법을 이용함으로써 데노보 합성될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 항체는 전체 항체의 변형에 의해 생산된 항체 단편, 또는 재조합 DNA 방법론을 이용하여 데노보 합성된 것들 (예를 들면, 단일 사슬 Fv) 또는 파지 전시 라이브리리를 이용하여 확인된 것들을 또한 포함한다.

[0089] "인간화 항체"는 비인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 내포하는 면역글로불린 분자이다. 인간화 항체는 수용자의 상보성 결정 영역 (CDR)으로부터 잔기가 원하는 특이성, 친화성 및 수용력을 갖는, 비인간 종 (공여자 항체), 예컨대 생쥐, 쥐 또는 토끼의 CDR로부터 잔기에 의해 대체되는 인간 면역글로불린 (수용자 항체)을 포함한다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 잔기가 상응하는 비인간 잔기에 의해 대체된다. 인간화 항체는 또한, 수용자 항체에서뿐만 아니라 이입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않는

잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나, 그리고 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실제로 모두 포함할 것인데, 여기서 CDR 영역의 전부 또는 실제로 전부가 비인간 면역글로불린의 것들에 상응하고, 그리고 프레임워크 (FR) 영역의 전부 또는 실제로 전부가 인간 면역글로불린 공통 서열의 것들이다. 인간화 항체는 최적으로는 또한, 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 것을 포함할 것이다.

[0090] 관심되는 항체는 ADCC (항체-의존성 세포 세포독성) 또는 ADCP (항체 의존성 세포 식균작용)을 유도하는 능력에 대해 검사될 수 있다. 항체-연관된 ADCC 활성은 용해된 세포로부터 표지 또는 유산 탈수소효소의 방출의 검출, 또는 감소된 표적 세포 생존력의 검출 (예를 들면, 아넥신 검정)을 통해 모니터링되고 정량될 수 있다. 아폽토시스에 대한 검정은 말단 데옥시뉴클레오티딜 전달효소-매개된 다이옥시제닌-11-dUTP 틈 단부 표지화 (TUNEL) 검정에 의해 수행될 수 있다 (Lazebnik et al., *Nature*: 371, 346 (1994). 세포독성 역시 당해 분야에서 공지된 검출 키트, 예컨대 Roche Applied Science (Indianapolis, Ind.)로부터 세포독성 검출 키트에 의해 직접적으로 검출될 수 있다.

CD47 항체

[0092] 본원에서 설명된 방법은 항-CD47 항체의 투여를 포함한다.

[0093] CD47은 단일 Ig-유사 도메인 및 5개의 막 스패닝 영역을 갖는 광범위하게 발현된 막경유 당단백질인데, 이것은 SIRP알파의 NH2-말단 V-유사 도메인을 통해 매개된 결합으로 SIRP알파에 대한 세포 리간드로서 기능한다. SIRP 알파는 대식세포, 과립구, 골수성 수지상 세포 (DCs), 비만 세포를 비롯한 골수 세포, 그리고 조혈 줄기 세포를 비롯한 이들의 전구체에서 일차적으로 발현된다. CD47 결합을 매개하는 SIRP알파 상에서 구조적 결정인자는 Lee et al. (2007) *J. Immunol.* 179:7741-7750; Hatherley et al. (2008) *Mol Cell.* 31(2):266-77; Hatherley et al. (2007) *J.B.C.* 282:14567-75에 의해 논의되고; 그리고 CD47 결합에서 SIRP알파 시스 이합체화의 역할은 Lee et al. (2010) *J.B.C.* 285:37953-63에 의해 논의된다. 정상 세포의 식균작용을 저해하는 CD47의 역할과 부합하게, 이것은 조혈 줄기 세포 (HSCs) 및 선조의 이동 시기 직전에 및 동안 이들 상에서 일시적으로 상향조절되고, 그리고 이들 세포 상에서 CD47의 수준은 이들이 생체내에서 탐식될 확률을 결정하는 것으로 증거된다.

[0094] 일부 구체예에서, 요지 항-CD47 항체는 CD47에 특이적으로 결합하고, 그리고 한 가지 세포 (예를 들면, 감염된 세포) 상에서 CD47 및 다른 세포 (예를 들면, 포식 세포) 상에서 SIRP α 사이의 상호작용을 감소시킨다. 일부 구체예에서, 적합한 항-CD47 항체는 결합 시에 CD47을 활성화시키지 않는다. 일부 항-CD47 항체는 SIRP α 에 CD47의 결합을 감소시키지 않고, 그리고 이런 항체는 "비-차단 항-CD47 항체"로서 지칭될 수 있다. "항-CD47 작용제"인 적합한 항-CD47 항체는 "CD47-차단 항체"로서 지칭될 수 있다. 적합한 항체의 무제한적 실례는 클론 B6H12, 5F9, 8B6 및 C3을 포함한다 (예를 들면, 본원에서 특정적으로 참조로서 편입되는 국제 특허 공개 WO 2011/143624에서 설명된 바와 같이). 적합한 항-CD47 항체는 이런 항체의 완전 인간, 인간화 또는 키메라 버전을 포함한다. 인간화 항체 (예를 들면, hu5F9-G4)는 특히, 그들의 낮은 항원성으로 인해 인간에서 생체내 적용에 유용하다. 유사하게, 개화 항체, 고양이화 항체 등을 특히, 개, 고양이, 그리고 다른 종 각각에서 적용에 유용하다. 관심되는 항체는 인간화 항체, 또는 개화 항체, 고양이화 항체, 밀화 항체, 소화 항체, 돼지화 항체 등, 그리고 이들의 변이체를 포함한다.

[0095] 일부 구체예에서 항-CD47 항체는 인간 IgG Fc 영역, 예를 들면, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4 불변 영역을 포함한다. 한 구체예에서 IgG Fc 영역은 IgG4 불변 영역이다. IgG4 헌자는 아미노산 치환 S241P에 의해 안정될 수 있다 (참조: 본원에서 특정적으로 참조로서 편입되는 Angal et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30(1):105-108).

[0096] 일부 구체예에서, 항-CD47 항체는 CD47에 결합에 대해 Hu5F9-G4와 경쟁한다. 일부 구체예에서, 항-CD47은 Hu5F9-G4와 동일한 CD47 애피토프에 결합한다.

[0097] 일부 구체예에서, 본원에서 설명된 방법은 항-CD47 항체 Hu5f9-G4의 투여를 포함한다. 이러한 항체는 본원에서 특정적으로 참조로서 편입되는 US 특허 9,623,079에서 설명되었다. 일부 구체예에서, 본원에서 설명된 방법은 Hu5f9-G4의 서열과 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 서열 (경쇄, 중쇄 및/또는 CDR)을 갖는 항-CD47 항체의 투여를 포함한다. 표 1은 Hu5f9-G4 항체 중쇄와 경쇄의 서열을 내포한다. CDR 영역은 굵은 글씨체로 도시된다.

[0098] 표 1.

표 1

서열 번호	설명 및 서열
1	Hu5f9-G4 항체 중쇄 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTN YN MH WVRQAPGQRLEWMGTIYPGNDTTSYNQKFKDRVTITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR G Y R A M D Y WGQCTLTVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPALQSSGQLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVQSQEDPEVQFNWYVGVEVHNATKPKREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSGK
2	Hu5f9-G4 항체 경쇄 DIVMTQSPLSLPVTPGEPAISCRSSQSIVYNSGNTYLG W YLQKPGQSPQLLIY K V S N R F S GVPDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF Q G S H V P Y T FGQGTKLEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0100] PD-L1 항체

[0101] 본원에서 설명된 방법은 항-PD-L1 항체의 투여를 포함한다.

[0102] PD-L1 (예정된 사멸 리간드 1)은 PD1에 대한 리간드이다. PD-L1 및 PD1 둘 모두 면역 관문 단백질의 실례이다. 면역 관문 단백질은 표적 세포를 향한, 특히 본 발명의 방법에서 종양 세포에 대항하여 면역 반응성을 감소시키는 행동을 하는 면역 저해 분자이다. T 세포에 의한 종양에 대한 내인성 반응은 면역 관문 (면역 저해 단백질)을 활성화하고, 그리고 동시자극성 수용체 (면역 활성화 단백질)를 저해하는 종양 세포에 의해 조절장애가 발생될 수 있다. 당해 분야에서 "면역 관문 저해제"로서 지칭되는 치료제의 부류는 저해 신호의 길항제를 투여하는 것을 통해 면역 반응의 저해를 반전시킨다. 다른 면역요법은 반응성을 증가시키기 위해 면역 동시자극성 분자의 효현제를 투여한다.

[0103] 2가지 면역 관문 단백질은 PD1 및 PD-L1이다. PD1의 주요 역할은 감염에 대한 염증 반응의 시점에서 말초 조직에서 T 세포의 활성을 제한하고, 그리고 자가면역을 제한하는 것이다. PD1 발현은 T 세포가 활성화될 때 유도된다. PD1은 리간드 중에서 한 가지와 맞물릴 때, T 세포 활성화에 관련되는 키나아제를 저해한다. PD1은 T_{Reg} 세포 상에서 고도로 발현되는데, 여기서 이것은 리간드의 존재에서 이들의 증식을 증강할 수 있다. 많은 종양이 T_{Reg} 세포로 고도로 침윤되기 때문에, PD1 경로의 차단은 또한, 종양내 T_{Reg} 세포의 숫자 및/또는 억제 활성을 축소시킴으로써 항종양 면역 반응을 증강할 수 있다.

[0104] PD1에 대한 2가지 리간드는 PD1 리간드 1 (PD-L1; B7-H1 및 CD274로서 또한 알려져 있음) 및 PD-L2 (B7-DC 및 CD273으로서 또한 알려져 있음)이다. 이를 PD1 리간드는 통상적으로, 많은 상이한 인간 종양으로부터 종양 세포 표면상에서 상향조절된다. 고형 종양으로부터 세포 상에서, 발현되는 주요 PD1 리간드는 PD-L1이다. PD-L1은 암 세포 상에서 발현되고, 그리고 T 세포 상에서 수용체 PD1에 결합을 통해, 이것은 T 세포 활성화/기능을 저해한다. 이런 이유로, PD1과 PD-L1 차단제는 이러한 저해 신호전달을 극복하고, 그리고 항종양 T 세포 기능을 유지하거나 또는 복원할 수 있다. 항-CD47 작용제는 특정한 항종양 T 세포 반응을 자극할 수 있다 (Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response; Tseng et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jul 2;110(27):11103-8).

[0105] PD-L1은 암 세포 상에서 발현되고, 그리고 T 세포 상에서 수용체 PD1에 결합을 통해, 이것은 T 세포 활성화/기능을 저해한다. 이런 이유로, PD1과 PD-L1 차단제는 이러한 저해 신호전달을 극복하고, 그리고 항종양 T 세포 기능을 유지하거나 또는 복원할 수 있다. 하지만, PD-L1이 종양 세포 상에서 발현되기 때문에, PD-L1에 결합하고 이를 차단하는 항체는 또한, 종양 세포의 ADCP, ADCC 및 CDC를 가능하게 할 수 있다. 항-CD47 작용제는 표적화된 단일클론 항체와 협력 작용하고, 그리고 ADCP 및 ADCC를 자극하는 이들의 효능을 증강할 수 있다 (Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma, Chao et al., Cell. 2010 Sep 3;142(5):699-713). 따라서 항-PD-L1 작용제의 항-CD47 작용제와의 조합은 항종양 효능을 증강할 수 있다. 이를 작용제는 함께 투여될 수 있다 (치료의 동일한 코스에 걸쳐, 하지만 반드시 동일자와 동일한 빈도인 것은 아님).

[0106] PD-L1에 대항하여 현재 임상적으로 이용 중인 항체는 아테졸리주맙, 더발루맙 및 아벨루맙을 포함한다. 아벨루맙은 백금-내포 화학요법 동안 또는 이후에, 또는 신보조 또는 어쥬번트 백금-내포 화학요법을 제공받은 후 12개월 이내에 질환 진행을 갖는 국부 진행된 또는 전이성 요로 상피 세포 암종 환자의 치료용으로 USA에서 승인

된, 활성 Fc-성분을 갖는 인간 예정된 사멸-리간드 1 (PD-L1) 차단 항체 (Boyerinas, 2015)이다. 이것은 또한, 전이성 메르켈 세포 암종을 앓는 성인 및 12세 이상의 소아 환자에서 이용을 위해 승인된다. 아벨루맙은 T 세포 주도된 항종양 반응을 야기하는 적응성 면역 반응의 PD-L1/PD-1 매개된 저해를 차단한다.

[0107] 일부 구체예에서, 본원에서 설명된 방법은 항-PD-L1 항체, 예를 들면, 아벨루맙의 투여를 포함한다. 일부 구체 예에서, 본원에서 설명된 방법은 아벨루맙의 서열과 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 서열 (경쇄, 중쇄 및/또는 CDR)을 갖는 항-PD-L1 항체의 투여를 포함한다. 표 2는 아벨루맙 항체 중쇄와 경쇄의 서열을 내포한다.

표 2.

표 2

서열 번호	설명 및 서열
3	아벨루맙 항체 중쇄 EVQLLESGGGVLVQPGGLSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPGGITFYADTVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4	아벨루맙 항체 경쇄 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRSGSKS GNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVC LISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

3. 투약

[0111] 본원에서 설명된 방법은 조성물의 치료적으로 유효 용량, 다시 말하면, 항-CD47 항체 및 항-PD-L1 항체 각각의 치료적으로 유효 용량의 투여를 포함한다.

[0112] 조성물은 전술된 바와 같이, 표적화된 세포를 실제적으로 제거하는데 충분한 양으로 환자에게 투여된다. 이것을 달성하는데 적합한 양은 전체 생존율에서 향상을 제공할 수 있는 "치료적으로 유효 용량"으로서 규정된다. 조성물의 단일 또는 복수 투여는 필요에 따른 및 환자에 의해 용인된 용량과 빈도에 따라 투여될 수 있다. 치료에 필요한 특정 용량은 포유동물의 의학적 상태 및 병력뿐만 아니라 다른 인자, 예컨대 연령, 체중, 성별, 투여 루트, 효율 등에 의존할 것이다.

[0113] 암의 치료를 위한 본 발명의 조합된 작용제의 유효 용량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간 또는 동물인 지의 여부, 투여된 다른 약제, 그리고 치료가 방지적 또는 치료적인 지의 여부를 비롯한, 많은 상이한 인자에 따라서 변한다. 통상적으로, 환자는 인간이지만, 비인간 포유동물, 예를 들면, 반려 동물, 예컨대 개, 고양이, 말 등, 실험실 포유동물, 예컨대 토끼, 생쥐, 쥐 등, 기타 등등이 또한 치료될 수 있다. 치료 용량은 안전성 및 효력을 최적화하기 위해 적정될 수 있다.

[0114] 항-CD47 항체의 치료적으로 유효 용량은 이용되는 특정한 작용제에 의존할 수 있지만, 통상적으로 약 20 mg/체중 kg 또는 그 이상 (예를 들면, 약 20 mg/kg 또는 그 이상, 약 25 mg/kg 또는 그 이상, 약 30 mg/kg 또는 그 이상, 약 35 mg/kg 또는 그 이상, 약 40 mg/kg 또는 그 이상, 약 45 mg/kg 또는 그 이상, 약 50 mg/kg 또는 그 이상, 또는 약 55 mg/kg 또는 그 이상, 또는 약 60 mg/kg 또는 그 이상, 또는 약 65 mg/kg 또는 그 이상, 또는 약 70 mg/kg 또는 그 이상), 또는 약 20 mg/kg 내지 약 70 mg/kg (예를 들면, 약 20 mg/kg 내지 약 67.5 mg/kg, 또는 약 20 mg/kg 내지 약 60 mg/kg)이다.

[0115] 일부 구체예에서, 항-CD47 항체의 치료적으로 유효 용량은 20, 30, 45, 60, 또는 67.5 mg/kg이다. 일부 구체예에서, 항-CD47 항체의 치료적으로 유효 용량은 20 내지 60 mg/kg이다. 일부 구체예에서, 항-CD47 항체의 치료적으로 유효 용량은 20 내지 67.5 mg/kg이다.

[0116] 항-PD-L1 항체의 치료적으로 유효 용량은 이용된 특정한 항체에 의존할 수 있지만, 통상적으로 약 10 mg/체중 kg 또는 그 이상 (예를 들면, 약 10 mg/kg 또는 그 이상, 약 15 mg/kg 또는 그 이상, 약 20 mg/kg 또는 그 이-

상, 약 25 mg/kg 또는 그 이상, 약 30 mg/kg 또는 그 이상, 약 35 mg/kg 또는 그 이상, 약 40 mg/kg 또는 그 이상, 약 45 mg/kg 또는 그 이상, 약 50 mg/kg 또는 그 이상, 또는 약 55 mg/kg 또는 그 이상, 또는 약 60 mg/kg 또는 그 이상, 또는 약 65 mg/kg 또는 그 이상, 또는 약 70 mg/kg 또는 그 이상), 또는 약 10 mg/kg 내지 약 70 mg/kg (예를 들면, 약 10 mg/kg 내지 약 67.5 mg/kg, 또는 약 10 mg/kg 내지 약 60 mg/kg)이다.

[0117] 일부 구체예에서, 항-PD-L1 항체의 치료 효과량은 10 mg/kg이다. 일부 구체예에서, 항-PD-L1 항체는 14 일마다 투여된다. 일부 구체예에서, 항-PD-L1 항체는 초회감작 투약 후 7 일에, 그리고 그 후 14 일마다 투여된다. 일부 구체예에서, 항-PD-L1 항체는 초회감작 투약과 동일자에, 그리고 그 후 14 일마다 투여된다.

[0118] 투여된 조성물의 특정 혈청 수준을 달성하고 및/또는 유지하는데 필요한 용량은 투약 사이에 시간의 양에 비례하고, 그리고 투여된 투약의 횟수에 역비례한다. 따라서, 투약의 빈도가 증가함에 따라서, 필요 용량이 감소한다. 투약 전략의 최적화는 당업자에 의해 쉽게 이해되고 실시될 것이다. 예시적인 치료 섭생은 2 주마다 1회 또는 월 1회 또는 3 내지 6 개월마다 1회 투여를 수반한다. 본 발명의 치료적 실체는 통상적으로, 여러 번에 걸쳐 투여된다. 단일 투약 사이에 간격은 주 1회, 월 1회 또는 연 1회일 수 있다. 간격은 또한, 환자에서 치료적 실체의 혈액 수준을 계측함으로써 지시된 바와 같이 불규칙할 수 있다. 대안으로, 본 발명의 치료적 실체는 지속된 방출 제제로서 투여될 수 있는데, 이러한 사례에서는 덜 빈번한 투여가 필요하다. 용량과 빈도는 환자에서 폴리펩티드의 반감기에 따라서 변한다.

[0119] "유지 용량"은 치료적으로 유효 용량이 되도록 의도되는 용량이다. 예를 들면, 치료적으로 유효 용량을 결정하기 위한 실험에서, 복수의 상이한 유지 용량이 상이한 개체에게 투여될 수 있다. 따라서, 유지 용량 중에서 일부는 치료적으로 유효 용량일 수 있고, 그리고 다른 것들은 치료이하 용량일 수 있다.

[0120] 방지적 적용에서, 상대적으로 낮은 용량이 긴 기간에 걸쳐 상대적으로 드문 간격에서 투여될 수 있다. 일부 환자는 그들의 여생 동안 치료를 계속 제공받는다. 다른 치료적 적용에서, 질환의 진행이 감소되거나 또는 종결될 때까지, 그리고 바람직하게는, 환자가 질환의 증상의 부분적인 또는 완전한 개선을 보여줄 때까지, 상대적으로 짧은 간격에서 상대적으로 높은 용량이 때때로 필요하다. 그 후에, 환자는 방지적 섭생으로 투여될 수 있다.

[0121] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 암종, 혈액종, 흑색종, 육종, 신경교종 등을 비롯한 암의 종양 성장, 종양 전이 또는 종양 침습을 치료하거나, 감소시키거나 또는 예방하는 것을 포함한다. 방지적 적용을 위해, 제약 학적 조성물 또는 약제는 질환, 이의 합병증 및 상기 질환의 발달 동안 나타나는 중간 병리학적 표현형의 생화학적, 조직학적 및/또는 행태적 증상을 비롯하여, 질환의 위험을 제거하거나 또는 감소시키거나, 질환의 심각도를 줄이거나, 또는 질환의 착수를 지연시키는데 충분한 양으로, 질환에 감수성인 또는 만약 그렇지 않으면, 질환의 위험에 처해 있는 환자에게 투여된다.

[0122] 본원에서 설명된 조합된 작용제의 독성은 예를 들면, LD₅₀ (개체군의 50%에 치명적인 용량) 또는 LD₁₀₀ (개체군의 100%에 치명적인 용량)을 결정함으로써, 세포 배양액 또는 실험 동물에서 표준 제약학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성과 치료 효과 사이에 용량 비율은 치료 지수이다. 이를 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 획득된 데이터는 인간에서 이용 시에 독성이 아닌 용량 범위를 공식화하는데 이용될 수 있다. 본원에서 설명된 단백질의 용량은 바람직하게는, 독성이 거의 또는 전혀 없이 유효 용량을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다. 용량은 이용된 약형 및 활용된 투여 루트에 따라, 이러한 범위 내에서 변할 수 있다. 정확한 제제, 투여 루트 및 용량은 환자의 상태에 비추어 개별 의사에 의해 선택될 수 있다.

[0123] 프라이머 작용제 및 초회감작 용량

[0124] 본원에서 설명된 방법의 일부 구체예에서, 치료적으로 유효 용량의 항-CD47 항체 및 항-PD-L1 항체를 개체에게 투여하기에 앞서, 프라이머 작용제가 투여된다. 적합한 프라이머 작용제는 적혈구생성-자극제 (ESA) 및/또는 초회감작 용량의 항-CD47 항체를 포함한다. 초회감작 작용제를 투여하고, 그리고 망상적혈구 생산에서 증가에 효과적인 기간을 허용한 이후에, 항-CD47 항체의 치료 용량이 투여된다. 투여는 본원에서 특정적으로 참조로서 편입되는 US 특허 9,623,079에서 기술된 방법에 따라서 이루어질 수 있다.

[0125] 일부 구체예에서, 본 발명의 조합 작용제의 투여는 환자 혈마토크리트를 증가시키는 작용제, 예를 들면, 에리트로포이에틴 자극제 (ESA)의 유효 용량과 조합된다. 예를 들면, Aranesp® (다베포에틴 알파), EpoGen® NF/Procrit® NF (에포에틴 알파), Omontys® (페기네사티드), Procrit® 등을 비롯한, 이런 작용제는 당해 분야에서 알려져 있고 이용된다.

[0126] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "초회감작 용량"은 치료적으로 유효 용량이 RBCs의 심각한 상실 (감소된 혈마

토크리트 또는 감소된 혈색소)을 유발하지 않도록, 치료적으로 유효 용량의 항-CD47 항체의 투여에 대해 개체를 초회감작하는 항-CD47 항체의 용량을 지정한다. 항-CD47 항체의 특정한 온당한 초회감작 용량은 이용되는 항체의 성격 및 다양한 개체-특이적 인자 (예를 들면, 연령, 체중 등)에 따라서 변할 수 있다. 항-CD47 항체의 적합한 초회감작 용량의 실례는 약 0.5 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 4 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 4 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 4 mg/kg, 약 5 mg/kg을 포함한다. 일부 구체예에서, 초회감작 용량은 바람직하게는 1 mg/kg이다.

[0127] 본원에서 설명된 방법의 일부 구체예에서, 항-CD47 항체는 약 0.5 내지 약 5 mg/kg의 항체의 범위에서 변하는 초회감작 용량, 임의적으로 1 mg/kg의 항체의 초회감작 용량으로서 개체에게 투여된다. 일부 구체예에서, 항-CD47 항체는 약 20 내지 약 67.5 mg/kg의 항체의 범위에서 변하는 용량, 임의적으로 20 mg/kg의 항체, 30 mg/kg의 항체, 45 mg/kg의 항체, 60 mg/kg의 항체, 또는 67.5 mg/kg의 항체의 용량으로서 개체에게 투여된다.

[0128] 본 발명의 일부 구체예에서, 치료적으로 유효 용량의 항-CD47 항체를 개체에게 투여하기에 앞서, 프라이머 작용제가 투여된다. 적합한 프라이머 작용제는 적혈구생성-자극제 (ESA) 및/또는 초회감작 용량의 항-CD47 항체를 포함한다. 초회감작 작용제를 투여하고, 그리고 망상적혈구 생산에서 증가에 효과적인 기간을 허용한 이후에, 항-CD47 항체의 치료 용량이 투여된다. 이러한 치료 용량은 다수의 상이한 방식으로 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 프라이머 항체가 투여된 후, 2회 또는 그 이상의 치료적으로 유효 용량이 투여된다. 일부 구체예에서 항-CD47 항체의 치료적으로 유효 용량은 단계적으로 확대되는 농도의 2회 또는 그 이상 용량으로서 투여되고, 다른 것들에서는 이를 용량이 동등하다.

[0129] 본 발명의 일부 구체예에서, Hu-5F9G4의 효과적인 초회감작 용량이 제공되는데, 여기서 인간에게 효과적인 초회감작 용량은 대략 1 mg/kg, 예를 들면, 적어도 약 0.5 mg/kg으로부터 많아야 약 5 mg/kg까지; 적어도 약 0.75 mg/kg으로부터 많아야 약 1.25 mg/kg까지; 적어도 약 0.95 mg/kg으로부터 많아야 약 1.05 mg/kg까지; 그리고 대략 1 mg/kg일 수 있다.

[0130] 본 발명의 일부 구체예에서, 항-CD47 항체의 초기 용량은 적어도 약 2 시간, 적어도 약 2.5 시간, 적어도 약 3 시간, 적어도 약 3.5 시간, 적어도 약 4 시간, 적어도 약 4.5 시간, 적어도 약 5 시간, 적어도 약 6 시간 또는 그 이상의 기간에 걸쳐 주입된다. 일부 구체예에서 초기 용량은 약 2.5 시간 내지 약 6 시간; 예를 들면, 약 3 시간 내지 약 4 시간의 기간에 걸쳐 주입된다. 일부 이런 구체예에서, 주입액에서 항체의 용량은 약 0.05 mg/ml 내지 약 0.5 mg/ml; 예를 들면, 약 0.1 mg/ml 내지 약 0.25 mg/ml이다.

[0131] 일부 구체예에서 초회감작 용량은 당해 분야에서 공지된 바와 같이, 피하 루트, 주사에 의해, 패치, 삼투성 펌프, 기타 등을 통해 전달될 수 있다.

[0132] 초회감작 항체를 투여하고, 그리고 망상적혈구 생산에서 증가에 효과적인 기간을 허용한 이후에, 항-CD47 항체의 치료 용량이 투여된다. 이러한 치료 용량은 다수의 상이한 방식으로 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 프라이머 작용제가 예를 들면, 주 1회 투약 일정에서 투여된 후, 2회 또는 그 이상의 치료적으로 유효 용량이 투여된다. 일부 구체예에서 항-CD47 항체의 치료적으로 유효 용량은 단계적으로 확대되는 농도의 2회 또는 그 이상 용량으로서 투여되고, 다른 것들에서는 이를 용량이 동등하다.

[0133] 다른 구체예에서, CD47 결합 항체의 초기 용량, 예를 들면, 초회감작 용량은 예를 들면, 삼투성 펌프, 전달 패치 등으로서 연속 주입에 의해 투여되는데, 여기서 상기 용량은 적어도 약 6 시간, 적어도 약 12 시간, 적어도 약 24 시간, 적어도 약 2 일, 적어도 약 3 일의 기간에 걸쳐 투여된다. 많은 이런 시스템은 당해 분야에서 공지된다. 예를 들면, DUROS 기술은 피스톤에 의해 분리된 이중 구획 시스템을 제공한다. 이를 구획 중에서 하나는 파이프의 고체 NaCl로 특수하게 만들어진 삼투성 엔진으로 구성되고, 따라서 이것은 전달 기간 내내 존속하고 일정한 삼투성 구배를 유발한다. 상기 구획은 또한, 물이 삼투성 엔진 내로 끌려 들어오고, 그리고 조직수 및 삼투성 엔진 사이에 크고 일정한 삼투성 구배를 확립하는, 한쪽 단부 상에 반투과성 막으로 구성된다. 다른 구획은 약물이 삼투성 구배로 인해 방출되는 구멍을 갖는 약물 용액으로 구성된다. 이것은 인간에서 이식될 때 부위 특이적 전달 및 전신 약물 전달을 제공하는데 도움을 준다. 바람직한 이식 부위는 위팔의 내부에서 피하 배치이다.

[0134] 초회감작 작용제를 투여하고, 그리고 망상적혈구 생산에서 증가에 효과적인 기간을 허용한 이후에, 항-CD47 항체의 치료 용량이 투여된다. 이러한 치료 용량은 다수의 상이한 방식으로 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 프라이머 작용제가 예를 들면, 주 1회 투약 일정에서 투여된 후, 2회 또는 그 이상의 치료적으로 유효 용량이 투

여된다. 일부 구체예에서 항-CD47 항체의 치료적으로 유효 용량은 단계적으로 확대되는 농도의 2회 또는 그 이상 용량으로서 투여되고, 다른 것들에서는 이들 용량이 동등하다. 초회감작 투약 후 적혈구응집이 감소하고, 그리고 이런 이유로, 연장된 주입 시간이 필요하지 않다.

[0135] 투여

[0136] 본원에서 설명된 방법에서, 조성물, 예를 들면, 항-CD47 항체 및 항 PD-L1 항체가 개체에게 투여된다. 이들 조성물은 비경구, 국소, 정맥내, 복강내, 종양내, 경구, 피하, 동맥내, 두개내, 복막내, 비내 또는 근육내 수단에 의해 투여될 수 있다. 비록 다른 루트가 동등하게 효과적일 수 있긴 하지만, 전형적인 투여 루트는 정맥내 또는 종양내이다.

[0137] 일부 구체예에서 항-CD47 항체 및/또는 항 PD-L1 항체는 복강내 투여된다. 일부 구체예에서 항-CD47 항체 및/또는 항 PD-L1 항체는 정맥내 투여된다. 일부 구체예에서 항-CD47 항체 및/또는 항 PD-L1 항체는 종양내 투여된다. 한 구체예에서, 항-CD47 항체의 초회감작 용량이 투여되고, 그리고 이러한 초회감작 용량은 피하 전달된다. 일부 구체예에서, 항-CD47 항체 및 항 PD-L1 항체는 동시에 투여된다. 일부 구체예에서, 항-CD47 항체 및 항 PD-L1 항체는 순차적으로 투여된다.

[0138] 이들 활성제는 숙주에서 암 세포의 고갈에 대한 부가 또는 상승 효과를 발생시키는 기간 내에 투여된다. 투여 방법은 전신 투여, 종양내 투여 등을 제한 없이 포함한다. 통상적으로 항-CD47 항체는 약 45 일, 약 30 일, 약 21 일, 약 14 일, 약 10 일, 약 8 일, 약 7 일, 약 6 일, 약 5 일, 약 4 일, 약 3 일, 약 2 일, 약 1 일의 기간 이내에, 또는 항 PD-L1 항체와 실체적으로 동일한 일자에 투여된다. 일부 구체예에서 항-CD47 항체는 항 PD-L1 항체에 앞서 투여된다. 일부 구체예에서 항-CD47 항체는 항 PD-L1 항체 후 투여된다. 이들 작용제는 만약 투여 일정관리가 양쪽 작용제의 혈청 수준이 동시에 치료 수준에 있도록 하는 그런 것이면, 조합된 것으로 고려될 수 있다. 암 세포 개체군의 고갈을 위해, 필요에 따라 투여가 반복될 수도 있다.

[0139] 제약학적 조성물

[0140] 본원에서 설명된 방법은 항-CD47 항체 및/또는 항 PD-L1 항체를 포함하는 제약학적 조성물의 투여를 포함한다.

[0141] 전형적으로, 이들 조성물은 액체 용액 또는 혼탁액 중에서 어느 하나로서 주사가능물질로서 제조된다; 주사에 앞서 액체 운반제에서 용해 또는 혼탁에 적합한 고체 형태 역시 제조될 수 있다. 이러한 제조물은 또한, 상기 논의된 바와 같이, 증강된 어쥬번트 효과를 위해 리포솜 또는 마이크로 입자, 예컨대 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 또는 공중합체 내에 유화되거나 또는 캡슐화될 수 있다. Langer, Science 249: 1527, 1990 및 Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997. 본 발명의 작용제는 활성 성분의 지속된 또는 박동성 방출을 허용하는 방식으로 조제될 수 있는 저장소 주사 또는 이식 제조물의 형태에서 투여될 수 있다. 제약학적 조성물은 일반적으로 무균이고, 실제적으로 등장성이고, 그리고 미국 식품의약국의 모든 의약품 제조 품질 관리 기준 (GMP) 규정을 완전히 준수하도록 조제된다.

[0142] 제약학적 조성물은 투여 방법에 따라 다양한 단위 약형에서 투여될 수 있다. 예를 들면, 경구 투여에 적합한 단위 약형은 분말, 정제, 알약, 캡슐 및 로젠지를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 본 발명의 조성물은 경구 투여될 때, 소화로부터 보호되어야 하는 것으로 인식된다. 이것은 전형적으로, 문자를 조성물과 복합화하여 이들이 산성 및 효소적 가수분해에 저항하도록 만듦으로써, 또는 이들 문자를 적절하게 내성인 담체, 예컨대 리포솜 또는 보호 장벽 내에 포장함으로써 달성된다. 작용제를 소화로부터 보호하는 수단은 당해 분야에서 널리 공지된다.

[0143] 투여용 조성물은 통상적으로, 제약학적으로 허용되는 담체, 바람직하게는 수성 담체에서 용해되는 항체 또는 다른 절제제를 포함할 것이다. 다양한 수성 담체, 예를 들면, 완충된 식염수 등이 이용될 수 있다. 이들 용액은 무균이고, 그리고 일반적으로, 바람직하지 않은 물질이 없다. 이들 조성물은 전통적인, 널리 공지된 살균 기술에 의해 살균될 수 있다. 조성물은 생리학적 상태에 근접하기 위해 필요에 따라 제약학적으로 허용되는 보조 물질, 예컨대 pH 조정제 및 완충제, 독성 조정제 등, 예를 들면, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 유산나트륨 등을 내포할 수 있다. 이들 제제에서 활성제의 농도는 폭넓게 변할 수 있고, 그리고 선택된 특정 투여 방식 및 환자의 요구에 따라서, 유체 체적, 점성, 체중 등에 일차적으로 기초하여 선별될 것이다 (예를 들면, Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., 1980) 및 Goodman & Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman et al., eds., 1996)).

[0144] "제약학적으로 허용되는 부형제"는 일반적으로 안전하고, 비-독성이고, 그리고 바람직한 제약학적 조성물을 제조하는데 유용한 부형제를 의미하고, 그리고 수의학적 용도뿐만 아니라 인간 제약학적 용도를 위해 허용되는 부

형제를 포함한다. 이런 부형제는 고체, 액체, 반고체, 또는 에어로졸 조성물의 경우에, 가스일 수 있다.

[0145] "제약학적으로 허용되는 염과 에스테르"는 제약학적으로 허용되고 원하는 약리학적 성질을 갖는 염과 에스테르를 의미한다. 이런 염은 화합물 내에 존재하는 산성 양성자가 무기 또는 유기 염기와 반응할 수 있는 경우에 형성될 수 있는 염을 포함한다. 적합한 무기 염은 알칼리 금속, 예컨대 나트륨 및 칼륨, 마그네슘, 칼슘, 그리고 알루미늄으로 형성된 것들을 포함한다. 적합한 유기 염은 유기 염기, 예컨대 아민 염기, 예를 들면, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 트로메타민, N 메틸글루카민 등으로 형성된 것들을 포함한다. 이런 염은 또한, 무기 산 (예를 들면, 염화수소산 및 브롬화수소산) 및 유기 산 (예를 들면, 아세트산, 구연산, 말레산, 그리고 알칸- 및 아렌-술폰산, 예컨대 메탄술폰산 및 벤젠술폰산)으로 형성된 산 부가염을 포함한다. 제약학적으로 허용되는 에스테르는 화합물, 예컨대 C₁₋₆ 알킬 에스테르 내에 존재하는 카르복시, 술포닐옥시 및 포스포노옥시 기로부터 형성된 에스테르를 포함한다. 2개의 산성 기가 존재할 때, 제약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르는 모노-산-모노-염 또는 에스테르, 또는 디-염 또는 에스테르일 수 있다; 그리고 유사하게, 2개 이상의 산성 기가 존재하는 경우에, 이런 기 중에서 일부 또는 전부는 염화 또는 에스테르화될 수 있다. 본 발명에서 명명된 화합물은 비염화 또는 비에스테르화 형태, 또는 염화 및/또는 에스테르화 형태에서 존재할 수 있고, 그리고 이런 화합물의 명명은 본래 (비염화와 비에스테르화) 화합물 및 이의 제약학적으로 허용되는 염과 에스테르 둘 모두를 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 본 발명에서 명명된 일정한 화합물은 하나 이상의 입체이성질체 형태에서 존재할 수 있고, 그리고 이런 화합물의 명명은 모든 단일 입체이성질체 및 이런 입체이성질체의 모든 혼합물 (라세미인지 또는 다른 것인 지에 상관없이)을 포함하는 것으로 의도된다.

[0146] 용어 "제약학적으로 허용되는", "생리학적으로 내약성" 및 이들의 문법적 변이체는 이들이 조성물, 담체, 희석제 및 시약을 지칭할 때 교체가능하게 이용되고, 그리고 이를 물질이 조성물의 투여를 금지시킬 정도까지 바람직하지 않은 생리학적 효과의 발생 없이 인간에게 투여될 수 있다는 것을 나타낸다.

키트

[0148] 활성제, 예를 들면, 항-CD47 항체 및 항-PD-L1 항체, 그리고 이들의 제제, 그리고 사용설명서를 포함하는 키트 또한 본원에서 설명된다. 키트는 적어도 하나의 추가 시약, 예를 들면, 화학요법 약물, ESA 등을 더욱 내포할 수 있다. 키트는 전형적으로, 키트의 내용물의 의도된 용도를 지시하는 표지를 포함한다. 용어 표지는 키트 상에 또는 키트와 함께 공급되거나, 또는 만약 그렇지 않으면, 키트에 동반되는 임의의 서면 또는 기록된 자료를 포함한다.

서열

[0150] 일부 구체예에서, 본원에서 설명된 방법은 본원에서 설명된 서열을 갖는 항체; 예를 들면, 본원에서 설명된 중쇄, 경쇄 및/또는 CDR 서열의 투여를 포함한다. 투여된 항체의 서열은 예를 들면, 본원에서 설명된 서열과 적어도 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일할 수 있다.

[0151] 2개 또는 그 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열의 맥락에서, 용어 "동일성" 퍼센트는 아래에 설명된 서열 비교 알고리즘 (예를 들면, BLASTP 및 BLASTN 또는 당업자에게 가용한 다른 알고리즘) 중에서 한 가지를 이용한 계측에 의해 또는 시각적 검사에 의해 비교되고 최대 상응하도록 정렬될 때, 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기의 특정된 백분율을 갖는 2개 또는 그 이상의 서열 또는 하위서열을 지칭한다. 적용에 따라서, "동일성" 퍼센트는 예를 들면, 기능적 도메인에 걸쳐 비교되는 서열의 영역에 걸쳐 존재하거나, 또는 대안으로, 비교되는 두 서열의 전장에 걸쳐 존재할 수 있다.

[0152] 서열 비교를 위해, 전형적으로 한 서열은 검사 서열이 비교되는 참조 서열로서 행동한다. 서열 비교 알고리즘을 이용할 때, 검사 서열 및 참조 서열은 컴퓨터 내로 입력되고, 필요하면, 하위서열 좌표가 지정되고, 그리고 서열 알고리즘 프로그램 파라미터가 지정된다. 서열 비교 알고리즘은 이후, 지정된 프로그램 파라미터에 근거하여, 참조 서열에 비하여 검사 서열(들)에 대한 서열 동일성 퍼센트를 계산한다.

[0153] 비교를 위한 서열의 최적 정렬은 예를 들면, Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)의 국부 상동성 알고리즘에 의해, Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)의 유사성에 대한 검색 방법에 의해, 이를 알고리즘의 컴퓨터화 실행 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.에서 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA)에 의해, 또는 시각적 검사 (참조: 일반적으로 Ausubel et al., 하기)에 의해 수행될 수 있다.

[0154] 서열 동일성과 서열 유사성 퍼센트를 결정하는데 적합한 알고리즘의 한 가지 실례는 BLAST 알고리즘인데, 이것은 Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)에서 설명된다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 미국 국립 생물공학 정보 센터 (National Center for Biotechnology Information)(www.ncbi.nlm.nih.gov/)를 통해 공개적으로 사용된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0155] 실시예

[0156] 실시예 1

[0157] 시험관내 상승작용 실험

[0158] 생쥐 또는 인간 NK 세포 (작동체) 및 생쥐 또는 인간 암 세포 (표적 세포)를 이용하여 ADCC 검정이 수행된다. 생쥐 NK 세포는 말초혈, 골수, 또는 비장으로부터 단리된다; 인간 NK 세포는 말초혈로부터 단리된다. 인간 암 세포주 또는 일차 표본은 표적 세포로서 이용을 위해 표지화된다 (예를 들면, 크롬 또는 형광 염료로).

[0159] NK 세포 및 암 세포는 시험관내에서 조합되고, 그리고 하기의 치료제와 함께 공동배양한다:

- 운반체 대조 (예를 들면, PBS)

- 아벨루맙을 비롯한, 항-PD-L1 항체 단독

- 항-CD47 항체 단독

- 항-CD47 항체 플러스 항-PD-L1 항체

[0164] ADCC는 크롬-방출 검정 또는 유세포분석법 세포 사멸 검정 (예를 들면, 아넥신 V/DAPI 염색)을 통해 계측된다. NK 세포 사이토kin (예를 들면, IFN-감마) 방출은 ELISA를 통해 계측된다. 항-CD47과 조합된 판문 저해제의 존재에서 세포 사멸 및 사이토kin 방출에서 변화는 상기 열거된 단일요법에 상대적으로 결정된다.

[0165] 실시예 2

[0166] 생체내 실험 프로토콜

[0167] 피하, 복막후방, 또는 말초혈 주사를 통해 암 세포가 생쥐 내로 주사되고 이식되도록 허용된다. 이들 동물은 4 개 치료군으로 무작위배정된다:

- 운반체 대조 (예를 들면, PBS)

- 아벨루맙을 비롯한, 항-PD-L1 항체 단독

- 항-CD47 항체 단독

- 항-CD47 항체 플러스 항-PD-L1 항체

[0172] 생쥐는 개별 치료제로 매일, 주 3회, 주 2회, 또는 주 1회 치료된다. 종양 부담은 종양 체적 계측, 표지화된 암 세포 (예를 들면, 루시페라아제 양성 세포)를 이용한 생물발광 및/또는 말초혈의 분석에 의해 계측된다. 생쥐의 전체 생존 또한 계측된다.

[0173] 실시예 3

[0174] 난소암에서 항-CD47 항체와 조합으로 아벨루맙의 연구

[0175] 이것은 사전 백금 화학요법의 6 개월 이내에 이미 진행된 고령 종양 환자에서 및 판문-미경험 난소, 난관암 및 원발성 복막 암종 환자에서 CD47 차단과 조합으로 아벨루맙 (MSB0010718C)의 안전성, 약물동력학, 약력학 및 항종양 활성을 평가하는 용량-최적화 연구이다. 일차 목적은 CD47 차단과의 다양한 조합의 안전성 및 효력을 사정하고, 타당하면 한정된 일련의 지표에서 투약 섭생을 최적화하는 것이다. 초기에, 본 연구는 CD47 및 SIRP알과 사이에 상호작용을 차단하는 인간화 항체인 5F9-G4와 조합으로, 항-PD-L1 단일클론 항체 (mAb)인 아벨루맙의 안전성 및 항종양 활성을 평가할 것이다. 이차 목적은 고령 종양 환자에서 Hu5F9-G4 + 아벨루맙의 권장된 용량을 결정하고, 아벨루맙과 조합으로 Hu5F9-G4의 약동학적 (PK) 및 약력학적 (PD) 프로필을 조사하고, 아벨루맙과 조합으로 Hu5F9-G4의 면역원성을 평가하고, 그리고 백금-저항성 난소암을 앓는 환자에서 순차적 종양 생검에서 사정될 때 종양 미세환경에서 골수 세포 개체군에 대한 이러한 조합의 영향을 평가하는 것을 포함한다.

[0176]

일차 목적 척도: 용량 제한 독성 (DLT)을 갖는 참가자의 숫자가 초기 초회감작 용량의 Hu5F9-G4로 시작하여, 치료 중 첫 5 주 동안 모니터링될 것이다. 첫 번째 주기는 지속 기간에서 5 주일 것이고, 그리고 차후 주기는 4 주마다 일 것이다. 초기 종양 반응 사정은 치료의 10 주차 직전에 (주기 3에 앞서), 그리고 치료의 8 주마다 (2 주기마다) 이후에 이루어질 것이다. 모든 독성은 NCI CTCAE 버전 4.03에 따라서 등급 분류될 것이다. DLT는 4-주 DLT 관찰 기간 동안 발생하는, 연구 치료에 관련된 것으로 사정되는 임의의 등급 3 또는 그 이상의 AE로서 규정된다.

[0177]

이차 목적 척도: 난소암 코호트에서, 선별검사 동안 기준선에서 및 주기 2의 종결 후 (\pm 2 주), 모든 환자에서 의학적으로 실현가능한 경우에 종양 생검이 획득될 것이다. 종양 생검은 안전성 런인 환자의 경우에 선택적이다. 선별검사는 연구 약물의 첫 번째 투약 전 30 일까지 지속될 것인데, 그 시간 동안 환자의 적격 및 기준선 특징이 결정될 것이다. 효력은 iRECIST, 기준을 이용하여 평가될 것이다. 연구 약물로 치료는 받아들일 수 없는 약물 관련된 독성이 발생할 때까지 또는 iRECIST에 의한 질환 진행 때까지 지속될 수 있다. 초기 질환 진행을 경험하는 환자는 다음의 모든 조건이 부합되면, 그들이 iRECIST에 의해 진행성 질환을 앓는 것으로 간주될 때까지 연구에 계속 참여할 수 있다: 그들의 종양으로부터 증상 악화의 부재, 연구 치료에 관련된 받아들일 수 없는 또는 비가역적 독성 없음, 임상적 악화 또는 쇠퇴하는 수행 상태의 증거 없음, 그리고 종양 성장으로부터 발생하는 임박한 치명적인 합병증 없음. 치료 후, 환자는 사망, 동의의 철회, 또는 연구의 종결 (어느 쪽이든 먼저 발생하는 것) 때까지 생존에 대해 관찰될 것이다.

[0178]

표 2.

용량 코호트	약물/용량 (IV)	투약 일정	
		주기 1 (35 일)	주기 2+ (28 일)
-1	Hu5F9-G4 1 mg/kg (초회감작)	1 일자	-
	Hu5F9-G4 20 mg/kg (유지)	8, 15, 22, 29 일자	1, 8, 15, 22 일자
	2 주마다 아벨루맙 10 mg/kg	8, 22 일자	1, 15 일자
1 (시작 용량)	Hu5F9-G4 1 mg/kg (초회감작)	1 일자	-
	Hu5F9-G4 30 mg/kg (유지)	8, 15, 22, 29 일자	1, 8, 15, 22 일자
	2 주마다 아벨루맙 10 mg/kg	8, 22 일자	1, 15 일자

[0179]

실시예 4

[0180]

T 세포 검정

[0181]

항원 제시 검정. 시험관내 항원 제시 검정을 위해, 10^4 대식세포가 혈청 없는 RPMI 배지에서 하룻밤 동안 동등한 숫자의 DLD1-cOVA-GFP 암 세포와 공동배양된다. 다음 날, 동등한 체적의 RPMI + 20% FCS가 배양액에 첨가된다. 말초 림프절이 OT-I 또는 OT-II TCR 유전자도입 생쥐로부터 수확되고 0.5 mM CFSE (Molecular Probes)로 표지화된다. T 세포가 비오틴화된 항-CD8 또는 항-CD4 항체를 이용하여 단리되고, 그 이후에 항비오틴 자성 비드 (Miltenyi Biotec)로 농축된다. 5×10^4 T 세포가 배양액에 첨가되고 3 일자 (OT-I T 세포의 경우) 또는 4 일자 (OT-II T 세포의 경우)에서 분석된다. 생체내 항원 제시 검정을 위해, 2×10^6 CFSE-표지화된 OT-I T 세포 (CD45.2)가 수용자 생쥐 (CD45.1) 내로 iv 입양 전달된다. 대식세포가 암 세포와의 공동배양으로부터 단리되고 생쥐의 발바닥 내로 주사된다. 슬와 림프절이 CD45.2+ 세포 내에 CFSE 희석에 대해 4 일자에서 분석된다.

[0182]

생체내 세포 죽음 검정. 간단히 말하면, C57BL/Ka (CD45.1) 생쥐로부터 비장세포가 10 μ M CFSE (CFSE-높음) 및 1 μ M CFSE (CFSE-낮음)로 표지화된다. CFSE-높음 비장세포가 6-웰 평판에서 1 시간 동안 1 μ M SIINFEKL 펩티드 (서열 번호: 5)로 펄싱된다. 세포는 iv 전달 전 비펩티드-펄싱된 CFSE-낮음 세포와 1:1 비율로 혼합된다. 펩티드-특이적 용해의 부재에서 CFSE 높음/낮음 비율에서 변이를 설명하기 위해, 대조 생쥐는 CFSE-낮음 비장세포와 1:1 비율로 혼합하고 생쥐로 전달하기 전, SIINFEKL 펩티드 (서열 번호: 5)로 펄싱되지 않은 CFSE-높음 비장세포를 제공받는다. 배수 림프절이 16 시간 후 분석된다. SIINFEKL 펩티드 (서열 번호: 5)로 펄싱되지 않은 비장

세포를 제공받는 대조 생쥐에서 비율에 대해 정규화된 $(1 - \frac{\%CFSE_{\text{높음}}}{\%CFSE_{\text{낮음}}})$ 로서 세포독성 퍼센트가 계산되었다.

[0184] 종양 공격접종. 1×10^6 CD8-농축된 OT-I T 세포가 수용자 C57BL/Ka 생쥐 내로 iv 입양 전달된다. 동계 C57BL/Ka 생쥐로부터 대식세포가 DLD1-cOVA-GFP 암과 공동배양되고, 그리고 이후, 자성 농축에 의해 단리되고 생쥐의 발바닥 내로 주사된다. 종양 세포주 E.G7 (닭 OVA cDNA를 발현하는 EL.4 세포)이 생쥐 (ATCC)의 종양 공격접종에 이용된다. 1×105 E.G7 세포가 규칙적인 매트리겔과 1:1 비율로 생쥐의 오른쪽 뒷다리 내로 s.c. 주사된다. 종양 크기가 미세 캘리퍼스를 이용함으로써 매일 계측되고, 그리고 체적이 길이 * 너비 * 높이 * $\pi/6$ 에 근거하여 계산된다.

[0185] T 세포 증식. 성숙 T 세포는 그들의 항원 특이적 수용체 (TCR)를 통해 항원/MHC 복합체를 인식하고 이것에 반응한다. TCR 활성화의 가장 즉각적인 결과는 특이적 단백질 티로신 키나아제 (PTKs)의 유도, 포스파티딜이노시톨 4,5-비인산염 (PIP2)의 파괴, 단백질 키나아제 C (PKC)의 활성화 및 세포내 칼슘 이온 농도의 상승을 포함하는 신호전달 경로의 개시이다. 이들 초기 사건은 핵으로 전파되고 T 세포의 클론 확장; 세포 표면상에서 활성화 마커의 상향조절; 작동체 세포로의 분화; 세포독성 또는 사이토kin 분비의 유도; 아폽토시스의 유도를 유발한다.

[0186] TCR에 항원 또는 효현성 항체를 통한 T 세포의 시험관내 자극 시에 T 세포 증식을 계측함으로써, T 세포 활성화가 사정된다. 이러한 프로토콜은 CD3을 통해 자극된 생쥐 비장 T-세포 및 인간 말초 T 세포의 시험관내 증식을 조사하기 위한 시작점으로서 기재된다. 결정적인 파라미터는 세포 밀도, 항체 역가 및 활성화 동역학을 포함한다.

[0187] 무균 PBS에서 항-CD3e (145-2C11)의 5-10 $\mu\text{g/mL}$ 용액을 준비한다. 각 실험 조건을 위해 필요한 웰의 숫자를 계산하고, 그리고 각 조건에 대해 삼중 표본을 고려한다. 예를 들면, 절반의 평판 (48 웰)을 코팅하기 위해 2.6mL의 항체 용액이 필요하다. 50 μL 의 항체 용액을 96-웰 검정 평판의 각 웰에 분여한다. 자극되지 않은 대조 웰의 경우에, 50 μL 의 무균 PBS를 첨가한다. 표본 증발을 방지하기 위해 평판을 ParafilmTM으로 완전히 덮고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2 시간 동안 배양하거나 또는 평판을 하루 전에 준비하고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 유지한다. 세포를 첨가하기 직전에, 50 μL 항체 용액을 멀티채널 피펫터로 제거한다. 각 웰을 200 μL 의 무균 PBS로 행구고 PBS를 폐기한다.

[0188] 비장을 수확하고, 무균 조건 하에 단일 세포 혼탁액을 준비하고, 그리고 원하는 작용제, 예를 들면, 항-CD47, 판문 저해제 등의 존재에서 완전 RPMI-1640에서 $10^6/\text{mL}$ 로 재현탁한다. 200 μL 의 세포 혼탁액을 각 웰에 첨가하고 가습된 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO2 인큐베이터 내에 배치한다. 가용성 항-CD28을 세포에 2 $\mu\text{g/mL}$ 로 첨가한다. 2-4 일 동안 배양한다. 세포는 수확되고 정량을 위해 처리될 수 있다.

[0189] 본 명세서에서 인용된 각 간행물은 본원에서 전체적으로 모든 점에서 참조로서 편입된다.

[0190] 본 발명은 설명된 특정 방법, 프로토콜, 세포주, 동물 종 또는 속, 그리고 시약에 한정되지 않는 것으로 이해되는데, 그 이유는 이들이 변할 수 있기 때문이다. 또한, 본원에서 이용된 용어는 단지 특정 구체예를 설명하기 위한 것이고, 그리고 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 의도되지 않으며, 상기 범위는 첨부된 청구범위에 의해 서만 한정되는 것으로 이해된다.

[0191] 본원에서 이용된 바와 같이, 단수 형태 ("a," "and," 및 "the")는 문맥에서 별도로 명시되지 않으면 복수 지시 대상을 포함한다. 따라서 예를 들면, "세포"에 대한 참조는 복수의 이런 세포를 포함하고, 그리고 "배양액"에 대한 참조는 하나 또는 그 이상의 배양액 및 당업자에게 공지된 이들의 등가물에 대한 참조를 포함하고, 기타 등등이다. 별도로 명시되지 않으면, 본원에서 이용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속하는 당해 분야의 평균적 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다.

서 열 목 록

- <110> FORTY SEVEN, INC.
- <120> TREATMENT OF OVARIAN CANCER WITH ANTI-CD47 AND ANTI-PD-L1
- <130> 32458-41404/W0
- <150> 62/574,073

<151> 2017-10-18

<160> 5

<170> Patent In version 3.5

<210> 1

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20	25	30
----	----	----

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35	40	45
----	----	----

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50	55	60
----	----	----

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85	90	95
----	----	----

Ala Arg Gly Gly Tyr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100	105	110
-----	-----	-----

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115	120	125
-----	-----	-----

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130	135	140
-----	-----	-----

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165	170	175
-----	-----	-----

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

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

435 440
 <210> 2
 <211> 219
 <
 212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
 <400> 2

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gly Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

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

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 3

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<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 Ser Tyr

20 25 30

Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr 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 Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

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

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Lys

450

<210> 4

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 4

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser

85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys

145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215
<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Gallus gallus
<400> 5
Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5