



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0103959  
(43) 공개일자 2022년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C07K 16/2803 (2013.01)  
A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-7017357  
(22) 출원일자(국제) 2022년10월23일  
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년05월23일  
(86) 국제출원번호 PCT/CN2020/123027  
(87) 국제공개번호 WO 2021/078219  
국제공개일자 2021년04월29일

(30) 우선권주장  
PCT/CN2019/113296 2019년10월25일 중국(CN)

(71) 출원인  
우시 바이올로지스 아일랜드 리미티드  
아일랜드 에이91 엑스56에프 코 라우스 던독 물러  
할린

(72) 발명자  
메이, 킨  
중국 상하이 200131 푸둥 뉴 디스트릭트 푸테 중  
로드 넘버 299  
후, 파젠  
중국 상하이 200131 푸둥 뉴 디스트릭트 푸테 중  
로드 넘버 299  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
공병욱

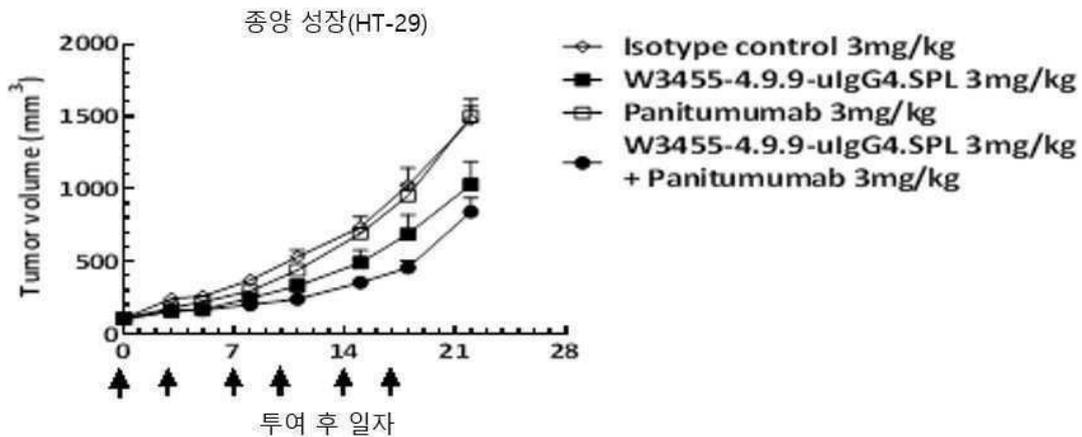
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 신규한 항-CD47 항체 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 항-CD47 항체, 항-CD47 항체를 인코딩하는 핵산 분자, 항-CD47 항체의 발현에 사용되는 발현 벡터 및 숙주 세포를 제공한다. 본 발명은 항체의 기능을 검증하는 방법을 추가로 제공한다. 본 개시내용의 항체는 면역 기능 조절을 통한 암 치료를 위한 강력한 제제를 제공한다.

대표도 - 도17



(52) CPC특허분류

**C07K 16/286** (2013.01)

**G01N 33/574** (2013.01)

*C07K 2317/24* (2013.01)

*C07K 2317/52* (2013.01)

*C07K 2317/73* (2013.01)

*C07K 2317/76* (2013.01)

*C07K 2317/90* (2013.01)

*C07K 2317/92* (2013.01)

*C07K 2317/94* (2013.01)

(72) 발명자

**리, 징**

중국 상하이 200131 푸둥 뉴 디스트릭트 푸테 중  
로드 넘버 299

**샤오, 지아시양**

중국 상하이 200131 푸둥 뉴 디스트릭트 푸테 중  
로드 넘버 299

**셴, 유홍**

중국 상하이 200131 푸둥 뉴 디스트릭트 푸테 중  
로드 넘버 299

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

다음을 포함하는 단리된 (isolated) 항체 또는 그의 항원 결합 부위:

A) 다음과 같이 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 중쇄 CDR (heavy chain CDR, HCDR):

(i) 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 또는 2개 이하 아미노산의 아미노산 첨가, 결실 또는 치환에 의해 HCDR1과 아미노산 서열이 다른 HCDR1;

(ii) 서열번호 2의 서열을 포함하는 HCDR2, 또는 2개 이하 아미노산의 아미노산 첨가, 결실 또는 치환에 의해 HCDR2와 아미노산 서열이 다른 HCDR2; 및

(iii) 서열번호 3의 서열을 포함하는 HCDR3, 또는 2개 이하 아미노산의 아미노산 첨가, 결실 또는 치환에 의해 HCDR3과 아미노산 서열이 다른 HCDR3;

B) 다음과 같이 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 경쇄 CDR (light chain CDR, LCDR):

(i) 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 또는 2개 이하 아미노산의 아미노산 첨가, 결실 또는 치환에 의해 LCDR1과 아미노산 서열이 다른 LCDR1;

(ii) 서열번호 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 또는 2개 이하 아미노산의 아미노산 첨가, 결실 또는 치환에 의해 LCDR2와 아미노산 서열이 다른 LCDR2; 및

(iii) 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 2개 이하 아미노산의 아미노산 첨가, 결실 또는 치환에 의해 LCDR3과 아미노산 서열이 상이한 LCDR3; 또는

C) A)의 1개 이상의 HCDR 및 B)의 1개 이상의 LCDR.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단리된 항체 또는 그의 항원 결합부위는 다음을 포함하는 것인, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위:

(a) 서열번호 1에 제시된 HCDR1;

(b) 서열번호 2에 제시된 HCDR2;

(c) 서열번호 3에 제시된 HCDR3;

(d) 서열번호 4에 제시된 LCDR1;

(e) 서열번호 5에 제시된 LCDR2; 및

(f) 서열번호 6에 제시된 LCDR3.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 다음을 포함하는 것인, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위:

(A) 중쇄 가변 영역 (heavy chain variable region):

(i) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함;

(ii) 서열번호 7과 적어도 85%, 90%, 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함; 또는

- (iii) 서열번호 7과 비교해 1개 이상의 아미노산이 첨가, 결실 및/또는 치환된 아미노산 서열을 포함; 및/또는
- (B) 경쇄 가변 영역 (light chain variable region):
  - (i) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함;
  - (ii) 서열번호 8과 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함; 또는
  - (iii) 서열번호 8과 비교해 1개 이상의 아미노산이 첨가, 결실 및/또는 치환된 아미노산 서열을 포함.

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 서열번호 7을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항에 있어서, 상기 항체는 IgG4와 같은 인간 IgG의 Fc 영역을 추가적으로 포함하는 것인, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 인간 IgG4의 Fc 영역은 EU 넘버링에 따른 S228P의 치환을 포함하는 것인, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위.

**청구항 7**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 1이상의 다음과 같은 특징을 갖는, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위:

- (a) 가용성 단백질로서 발현되거나 또는 세포 표면에서 발현되는, 인간 CD47 및 시노몰구스 원숭이 (cynomolgus monkey) CD47에 특이적으로 결합;
- (b) 85% 정도의 억제율로 SIRP α에 대한 CD47의 결합을 차단;
- (c) 적혈구 (red blood cell, RBC)에 대해 약하게 결합 및 인간 RBC의 혈구응집을 유도하지 않음;
- (d) 인간 RBC의 식세포 작용 (phagocytosis)이 감소된, 종양 세포의 대식세포 매개 식세포 작용을 유도;
- (e) 생체내에서 종양 성장 억제를 유의하게 유도; 및
- (f) 다른 항-종양 분자, 특히 파니투무맙 (panitumumab)과 병용 투여시 상승 효과를 나타냄.

**청구항 8**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 단일 클론 항체(monoclonal antibody)인 것인, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 키메라 항체(chimeric antibody), 인간화 항체 (humanized antibody), 또는 완전한 인간 항체 (fully human antibody)인 것인, 단리된 항체 또는 그의 항원

결합 부위.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 서열번호 11을 포함하는 중쇄 및 서열번호 12를 포함하는 경쇄를 포함하는 것인, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위.

#### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따라 정의된 단리된 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따라 정의된 단리된 항체의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 상기 핵산 서열은 다음의 군에서 선택되는 것인, 단리된 핵산 분자:

(A) 서열번호 7에 기재된 중쇄 가변영역을 인코딩하는 핵산 서열;

(B) 서열번호 9에 기재된 핵산 서열; 또는

(C) (A) 또는 (B)의 핵산 서열의 상보적 가닥에 높은 엄격성 조건 (high stringency condition) 하에 혼성화된 핵산 서열.

#### 청구항 13

제11항에 있어서, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따라 정의된 단리된 항체의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 상기 핵산 서열은 다음의 군에서 선택되는 것인, 단리된 핵산 분자:

(A) 서열번호 8에 기재된 경쇄 가변영역을 인코딩하는 핵산 서열;

(B) 서열번호 10에 기재된 핵산 서열; 또는

(C) (A) 또는 (B)의 핵산 서열의 상보적 가닥에 높은 엄격성 조건 (high stringency condition) 하에 혼성화된 핵산 서열.

#### 청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

#### 청구항 15

제14항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 16

제1항 내지 제10항에 따라 정의된 항체 또는 항원 결합 부위 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 약제학적 조성물.

**청구항 17**

다음 단계를 포함하는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따라 정의된 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 생산하는 방법:

- 제15항의 숙주 세포에서 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 발현시키는 단계; 및
- 숙주 세포에서 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 단리시키는 단계.

**청구항 18**

대상의 면역 반응이 조절되도록 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따라 정의된 항체 또는 그의 항원 결합 부위, 또는 제16항에 따른 약제학적 조성물을 대상에 투여하는 단계를 포함하는, 선택적으로 면역 반응은 CD47과 관련된 것인, 대상의 면역 반응을 조절하는 방법.

**청구항 19**

유효량의 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따라 정의된 항체 또는 그의 항원 결합 부위, 또는 제16항에 따른 약제학적 조성물을 대상에 투여하는 단계를 포함하는, 대상의 종양 세포의 성장을 억제하는 방법.

**청구항 20**

유효량의 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따라 정의된 항체 또는 그의 항원 결합 부위, 또는 제16항의 약제학적 조성물을 대상에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료 또는 예방이 필요한 대상에 대한 암의 치료 또는 예방 방법.

**청구항 21**

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 화학요법제 또는 치료 항체와 병용 투여되는 것인, 방법.

**청구항 22**

제20항에 있어서, 상기 암은 혈액암 또는 고형 종양인 것인, 치료 또는 예방 방법.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 상기 혈액암은 급성 림프모구성 백혈병 (acute lymphoblastic leukemia, ALL), 급성 골수성 백혈병 (acute myelogenous leukemia, AML), 비호지킨 림프종 (Non-Hodgkin lymphoma)(예: 버킷 림프종), B-림프모구성 백혈병/림프종 (B-lymphoblastic leukemia/lymphoma); B 세포 만성 림프구성 백혈병 (B-cell chronic lymphocytic leukemia), 만성 림프구성 백혈병 (chronic lymphocytic leukemia, CLL), 만성 골수성 백혈병 (chronic myelocytic leukemia, CML), 여포성 림프종 (follicular lymphoma), 소림프성 림프종 (small lymphocytic lymphoma, SLL), 중추신경계 림프종 (central nervous system lymphoma), 리히터 증후군 (Richter's syndrome), 다발성 골수종 (multiple myeloma), 면역모세포성 대세포 림프종 (immunoblastic large cell lymphoma), 전구체 B 림프모구 림프종 (precursor B-lymphoblastic lymphoma) 및 역형성 대세포 림프종 (anaplastic large cell lymphoma)으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 치료 또는 예방 방법.

**청구항 24**

제22항에 있어서, 상기 고형 종양은 폐암, 췌장암, 유방암, 간암, 난소암, 고환암, 신장암, 방광암, 뇌암, 자궁경부암, 결장/직장암, 위장관 암, 피부암, 및 전립선 암으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 치료 또는 예방 방법.

**청구항 25**

대상의 면역 반응을 조절하기 위한 약제의 제조에서 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따라 정의된 항체 또는 그의 항원 결합 부위의 용도, 선택적으로 면역 반응은 CD47와 관련됨.

**청구항 26**

대상의 종양 세포의 성장을 억제하기 위한 약제의 제조에서 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따라 정의된 항체 또는 그의 항원 결합 부위의 용도.

**청구항 27**

암 치료 또는 예방용 약제의 제조에서 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따라 정의된 항체 또는 그의 항원 결합 부위의 용도.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 상기 암은 혈액암 또는 고형 종양인 것인, 용도.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 상기 혈액암은 급성 림프모구성 백혈병 (acute lymphoblastic leukemia, ALL), 급성 골수성 백혈병 (acute myelogenous leukemia, AML), 비호지킨 림프종 (Non-Hodgkin lymphoma)(예: 버킷 림프종), B-림프모구성 백혈병/림프종 (B-lymphoblastic leukemia/lymphoma); B 세포 만성 림프구성 백혈병 (B-cell chronic lymphocytic leukemia), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia, CLL), 만성 골수성 백혈병 (chronic myelocytic leukemia, CML), 여포성 림프종 (follicular lymphoma), 소림프성 림프종 (small lymphocytic lymphoma, SLL), 중추신경계 림프종 (central nervous system lymphoma), 리히터 증후군 (Richter's syndrome), 다발성 골수종 (multiple myeloma), 면역모세포성 대세포 림프종 (immunoblastic large cell lymphoma), 전구체 B 림프모구 림프종 (precursor B-lymphoblastic lymphoma) 및 역형성 대세포 림프종 (anaplastic large cell lymphoma)으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 용도.

**청구항 30**

제28항에 있어서, 상기 고형 종양은 폐암, 췌장암, 유방암, 간암, 난소암, 고환암, 신장암, 방광암, 뇌암, 자궁경부암, 결장/직장암, 위장관 암, 피부암, 및 전립선 암으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 용도.

**청구항 31**

CD47 관련 암의 진단, 치료 또는 예방용 제1항 내지 제10항에 따라 정의된 항체 또는 그의 항원 결합 부위.

**청구항 32**

적어도 하나의 제1항 내지 제10항에 따라 정의된 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 포함하는 컨테이너(container)를 포함하는, 암 치료 또는 진단용 키트.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 일반적으로 항체에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 출원은 CD47에 대한 단일 클론 항체, 그의 제조 방법 및 항체의 용도에 관한 것이다.

[0002] **우선권 주장**

[0003] 본 발명은 2019년 10월 25일에 출원된 국제출원 PCT/CN2019/113296에 대한 우선권을 주장하며, 그 전체 내용은 여기에 참조로 포함된다.

[0004] **서열목록**

[0005] 본 출원은 전자적 형태의 서열목록과 함께 출원된다. 서열목록의 전체 내용은 여기에 참조로 포함된다.

**배경 기술**

[0006] 인테그린 관련 단백질 (integrin-associated protein, IAP)이라고도 하는 분화 클러스터 47 (Cluster of differentiation 47, CD47)은 대부분의 정상 세포 유형에서 발견되는 유비쿼터스 세포 표면 당단백질인 ~50kDa 면역글로불린 슈퍼패밀리 막 단백질이다. CD47은 그의 리간드인 대식세포에서 발견되는 신호 조절 단백질 알파 (signal regulatory protein alpha, SIRP $\alpha$ )와 상호작용한 다음 항-식세포 또는 "나를 먹지마" 신호를 대식세포에 보내서 면역 감시를 회피한다 [1]. 다양한 악성 종양의 분석은, CD47이 AML, NHL, 유방암, NSCC 및 난소 세포에서 과발현됨과, 증가된 CD47 발현이 더 나쁜 임상 예후와 상관관계가 있음을 나타낸다. 이 데이터는 CD47이 CD47-SIRP $\alpha$  상호작용을 차단하고 "나를 먹지마" 신호를 차단함으로써 암 치료를 위한 새로운 면역 체크포인트로 기능할 수 있음을 나타낸다.

[0007] CD47은 대식세포 및 수지상 세포와 같은 선천성 및 후천성 면역계의 세포를 통해 식세포작용의 매개체로서 기능하는, 광범위하게 발견되는 세포 표면 단백질이다. CD47은 혈액 악성 종양 및 고형 종양을 비롯한 많은 종류의 종양에서 과도하게 발현된다. 더욱 많은 연구 결과는 암 면역 요법에서 CD47-SIRP $\alpha$  신호 축을 표적으로 삼는 것이 새로운 면역 체크포인트 역할을 할 수 있으며, 단일 또는 병용 요법으로 강력한 항-종양 능력을 가질 수 있어, CD47을 여러 인간 악성 암에서 보편적인 표적으로 할 수 있음을 나타낸다.

[0008] 여러 항-CD47 단일 클론 항체 (monoclonal antibody, mAb)는 AML, NHL, 유방 세포 및 난소 세포에 대한 효과적인 대식세포 관여 식세포 작용 (macrophage involved phagocytosis)을 수행했다. 게다가, 항-CD47 mAb를 승인된 항체 (항-종양 관련 항원)와 병용하거나 또는 이중 표적 이중특이성 항체를 사용하는 것은 항-종양 활성을 효율적으로 향상시켰다 [2-4]. 이러한 전임상 연구를 기반으로 인간 혈액 악성 종양 및 고형 종양을 다루는 6개 이상의 항-CD47 mAb 및 3개의 SIRP $\alpha$  융합 단백질의 I상 또는 II상 임상 시험이 진행 중이다.

[0009] 그러나, 암을 포함한 다양한 질병의 예방 또는 치료에 사용하기 위해 CD47-SIRP $\alpha$  상호작용을 차단하고 종양 세포의 강력한 식세포 작용(phagocytosis)을 유도할 수 있는 새로운 항-CD47 분자를 개발할 필요가 여전히 존재한다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

**과제의 해결 수단**

[0010] 본 명세서에 개시된 발명에 의해 제공되는 이들 및 기타 목적은 넓은 의미에서 개선된 효능을 갖는 항체를 제공

하는 화합물, 방법, 조성물 및 제조 물품에 관한 것이다. 본 발명에 의해 제공되는 이점을 항체 치료 및 진단 분야에서 광범위하게 적용가능하고, 다양한 표적과 반응하는 항체와 함께 사용할 수 있다.

- [0011] 본 발명에서, 완전한 인간 항-CD47 단일 클론 항체가 생성되었다. 본 발명의 항체는 높은 친화도로 인간 CD47 또는 시노몰구스 원숭이 CD47에 결합할 수 있고; CD47과 그의 리간드 SIRP $\alpha$  사이의 상호작용을 효과적으로 차단하며; 인간 적혈구(RBC)에 대한 약한 결합을 나타내고 인간 RBC의 혈구응집을 유도하지 않으며; 적혈구의 식세포 작용이 감소된 종양 세포의 강력한 대식세포 매개 식세포 작용을 유도하며; 강력한 종양 성장 억제를 나타낸다.
- [0012] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 CD47에 대한 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 다음을 포함한다:
- [0014] A) 다음과 같이 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 중쇄 CDR(HCDR):
- [0015] (i) 서열번호 1에 기재된 HCDR1에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 HCDR1;
- [0016] (ii) 서열번호 2에 기재된 HCDR2에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 HCDR2; 및
- [0017] (iii) 서열번호 3에 기재된 HCDR3에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 HCDR3;
- [0018] B) 다음과 같이 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 경쇄 CDR(LCDR):
- [0019] (i) 서열번호 4에 기재된 LCDR1에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 LCDR1;
- [0020] (ii) 서열번호 5에 기재된 LCDR2에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 LCDR2; 및
- [0021] (iii) 서열번호 6에 제시된 LCDR3에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 LCDR3; 또는
- [0022] C) A)의 1 이상의 HCDR 및 B)의 1 이상의 LCDR.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 다음을 포함한다:
- [0024] A) 다음과 같이 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 중쇄 CDR(HCDR):
- [0025] (i) 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 또는 2개 이하 아미노산의 아미노산 첨가, 결실 또는 치환에 의해 HCDR1과 아미노산 서열이 다른 HCDR1;
- [0026] (ii) 서열번호 2의 서열을 포함하는 HCDR2, 또는 2개 이하 아미노산의 아미노산 첨가, 결실 또는 치환에 의해 HCDR2와 아미노산 서열이 다른 HCDR2; 및
- [0027] (iii) 서열번호 3의 서열을 포함하는 HCDR3, 또는 2개 이하 아미노산의 아미노산 첨가, 결실 또는 치환에 의해 HCDR3과 아미노산 서열이 다른 HCDR3;
- [0028] B) 다음과 같이 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 경쇄 CDR(light chain CDR, LCDR):
- [0029] (i) 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 또는 2개 이하 아미노산의 아미노산 첨가, 결실 또는 치환에 의해 LCDR1과 아미노산 서열이 다른 LCDR1;
- [0030] (ii) 서열번호 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 또는 2개 이하 아미노산의 아미노산 첨가, 결실 또는 치환에 의해 LCDR2와 아미노산 서열이 다른 LCDR2; 및
- [0031] (iii) 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 2개 이하 아미노산의 아미노산 첨가, 결실 또는 치환에 의해 LCDR3과 아미노산 서열이 상이한 LCDR3; 또는
- [0032] C) A)의 1개 이상의 HCDR 및 B)의 1개 이상의 LCDR.
- [0033] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기
- [0034] (A) VH는 다음을 포함한다:
- [0035] (i) 서열번호 1을 포함하는 HCDR1;
- [0036] (ii) 서열번호 2를 포함하는 HCDR2; 및

- [0037] (iii) 서열번호 3을 포함하는 HCDR3; 및/또는
- [0038] (B) VL은 다음을 포함한다:
- [0039] (i) 서열번호 4를 포함하는 LCDR1;
- [0040] (ii) 서열번호 5를 포함하는 LCDR2; 및
- [0041] (iii) 서열번호 6을 포함하는 LCDR3.
- [0042] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 다음을 포함한다:
- [0043] (A) 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:
- [0044] (i) 서열번호 7의 아미노산 서열;
- [0045] (ii) 서열번호 7과 적어도 85%, 90%, 또는 95% 동일한 아미노산 서열; 또는
- [0046] (iii) 서열번호 7과 비교하여 1개 이상의 아미노산이 첨가, 결실 및/또는 치환된 아미노산 서열; 및/또는
- [0047] (B) 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:
- [0048] (i) 서열번호 8의 아미노산 서열;
- [0049] (ii) 서열번호 8과 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열; 또는
- [0050] (iii) 서열번호 8과 비교하여 1개 이상의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환이 있는 아미노산 서열.
- [0051] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 서열 7에 기재된 중쇄 가변 영역 및 서열 8에 기재된 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0052] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 인간 IgG, 예컨대 IgG4의 Fc 영역을 추가로 포함한다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 인간 IgG4의 Fc 영역은 EU 넘버링에 따른 S228P의 치환을 포함하는 것이다.
- [0053] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 다음 특성 중 1개 이상을 갖는다:
- [0054] (a) 가용성 단백질로서 발현되거나 또는 세포 표면에서 발현되는, 인간 CD47 및 시노몰구스 원숭이 CD47에 특이적으로 결합;
- [0055] (b) SIRP  $\alpha$ 에 대한 CD47의 결합을 효과적으로 차단, 예를 들면 85% 이상의 억제율;
- [0056] (c) 적혈구(RBC)에 대해 약하게 결합 및 인간 RBC의 혈구응집을 유도하지 않음;
- [0057] (d) 인간 RBC의 식세포 작용이 감소된, 종양 세포의 강력한 대식세포 매개 식세포 작용을 유도;
- [0058] (e) 종양 세포의 ADCC 및 CDC 활성을 약하게 또는 전혀 유도하지 않음;
- [0059] (f) 우수한 열 안정성을 갖고 인간 혈청에서 안정적임;
- [0060] (g) 동물 종양 모델에서 생체내 종양 성장 억제를 유의하게 유도; 및
- [0061] (h) 다른 항-종양 분자, 특히 파니투무맙(panitumumab)과 병용 투여시 상승 효과를 나타냄.
- [0062] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 SIRP  $\alpha$ 에 대한 CD47의 결합을 효과적으로 차단한다. 예를 들어, CD47과 SIRP  $\alpha$ 의 결합의 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 또는 적어도 85%는 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부위에 의해 차단될 수 있다. 한편, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 벤치마크 항-CD47 항체보다 인간 RBC의 혈구응집을 상당히 덜 유발할 수 있으며, 예를 들어, 벤치마크 항-CD47 항체와 비교하여 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 그 이하의 인간 RBC의 혈구응집을 유발할 수 있다. 벤치마크 항체의 예시는 표 2에 나타난 바와 같이 BMK1, BMK2, BMK4 및 BMK8 항체를 포함한다.
- [0063] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 단리된 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

- [0064] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명의 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0065] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0066] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 적어도 1개의 항체 또는 그의 항원 결합 부위 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.
- [0067] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 숙주 세포에서 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 발현시키는 단계, 및 숙주 세포로부터 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 단리시키는 단계를 포함하는, 항-CD47 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0068] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 대상의 면역 반응이 조절되도록 대상에게 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 투여하는 단계를 포함하는, 대상의 면역 반응을 조절하는 방법에 관한 것이며, 선택적으로 면역 반응은 CD47과 관련이 있다.
- [0069] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부위 또는 약제학적 조성물을 대상에 투여하는 단계를 포함하는, 대상의 종양 세포 성장을 억제하는 방법에 관한 것이다.
- [0070] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부위 또는 약제학적 조성물을 대상에 투여하는 단계를 포함하는, 대상의 증식성 장애 (예를 들어, 암)를 포함하는 질병을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.
- [0071] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부위는 화학요법제 또는 치료 항체, 예를 들면 파니투무맙과 (예를 들어, 순차적으로 또는 동시에) 병용 투여될 수 있다.
- [0072] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 증식성 장애 (예를 들어, 암)를 포함하는 질병을 치료 또는 예방하기 위한 의약의 제조에서 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부위의 용도에 관한 것이다.
- [0073] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 암은 혈액암 또는 고형 종양일 수 있다. 혈액암은 예를 들어 급성 림프모구성 백혈병 (acute lymphoblastic leukemia, ALL), T-ALL, B-ALL, 급성 골수성 백혈병 (acute myelogenous leukemia, AML), 비호지킨 림프종 (Non-Hodgkin lymphoma), B-림프모구성 백혈병/림프종 (B-lymphoblastic leukemia/lymphoma); B 세포 만성 림프구성 백혈병 (B-cell chronic lymphocytic leukemia), 만성 림프구성 백혈병 (chronic lymphocytic leukemia, CLL), 만성 골수성 백혈병 (chronic myelocytic leukemia, CML), 버킷 림프종 (Burkitt's lymphoma), 여포성 림프종 (follicular lymphoma), 소림프성 림프종 (small lymphocytic lymphoma, SLL), 중추신경계 림프종 (central nervous system lymphoma), 리히터 증후군 (Richter's syndrome), 다발성 골수종 (multiple myeloma) 및 면역모세포성 대세포 림프종 (immunoblastic large cell lymphoma)일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 치료 대상 암은 버킷 림프종이다. 고형 종양은 예를 들어 폐암, 췌장암, 유방암, 간암, 난소암, 고환암, 신장암, 방광암, 뇌암, 자궁경부암, 결장/직장암, 위장관암, 피부암, 전립선암으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 치료 대상 암은 결장암이다.
- [0074] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 암을 포함하는 질병의 치료에 유용한, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부위, 및 본 발명의 약제학적 조성물을 사용하는 키트 또는 장치 및 관련 방법에 관한 것이다.
- [0075] 전술한 내용은 요약이므로 필요에 따라 세부 사항의 단순화, 일반화 및 생략을 포함한다; 결과적으로, 당업자는 요약이 단지 예시적이며 어떤 식으로든 본 발명을 한정하려는 의도가 아님을 이해할 것이다. 본 발명의 다른 양태, 특징, 및 방법의 이점, 조성물 및/또는 장치 및/또는 본 명세서에 기재된 다른 청구된 발명은 본 명세서에 기재된 교시에 따라 명백해질 것이다. 요약은 아래 추가로 기재된 발명의 상세한 설명의 단순화된 형태로 개념 선택을 소개하기 위해 제공된다. 이 요약은 청구된 발명의 주요 특징 또는 필수 기능을 식별하기 위한 것이 아니며 청구된 발명의 범위를 결정하는 데 도움을 주기 위한 것도 아니다.

**도면의 간단한 설명**

- [0076] 도 1은 ELISA로 측정된, 리드 항체 W3455-4.9.9-uIgG4.SPL (본 명세서에서 "W3455"로 약칭됨)의 인간 CD47에 대한 결합을 나타낸다. W345-BMK1.uIgG4PE.K, W345-BMK2.uIgG4.SP 및 W345-BMK4.uIgG4.SP는 항-CD47 벤치마크 항체이다. IgG4 이소타입은 이소타입 대조군이다. "Neg" 열은 블랭크 대조군의 최대 OD이다.

도 2는 FACS로 측정한, 리드 항체 W3455의 인간 CD47-발현 세포에 대한 결합을 보여준다. "Neg" 열은 블랭크 대조군의 최대 MFI이다.

도 3은 FACS로 측정한, 시노물구스 원숭이 리드 항체 W3455의 CD47-발현 세포에 대한 결합을 나타낸다.

도 4는 FACS로 측정한, 리드 항체 W3455의 인간 적혈구에 대한 결합을 나타낸다.

도 5는 리드 항체 W3455의 인간 RBC 혈구응집 활성 (HA)을 나타낸다.

도 6은 리간드 경쟁 분석에서 ELISA로 측정한, 리드 항체 W3455의 SIRP $\alpha$  차단 활성을 나타낸다. "Min OD"는 최소 OD450 값을 나타내고 "리간드" 열은 리간드만 존재할 때의 Min OD 결과를 나타낸다.

도 7은 리간드 경쟁 분석에서 FACS로 측정한, 리드 항체 W3455의 SIRP $\alpha$  차단 활성을 나타낸다. "Min MFI"는 최소 MFI 값을 나타내고, "리간드" 열은 리간드만 존재할 때의 Min MFI 결과를 나타낸다.

도 8은 SPR로 측정한, 리드 항체 W3455 및 벤치마크 항체 W345-BMK2.uIgG4.SP의 인간 CD47에 대한 결합 동역학 곡선을 나타낸다.

도 9는 차동 스캔 형광 측정 (differential scanning fluorometry, DSF)으로 측정된 두 가지 다른 완충액에서 리드 항체 W3455의 열 안정성 결과를 나타낸다.

도 10은 FACS로 테스트 한, 인간 혈청에서 리드 항체 W3455의 안정성을 나타낸다.

도 11a, 도 11b, 및 도 11c는 Raji 세포 (a), Jurkat 세포 (b) 및 인간 RBC (c)에서 리드 항체 W3455에 의해 유도된 대식세포 매개 식세포작용을 나타낸다.

도 12는 리드 항체 W3455 및 벤치마크 항체의 CCRF-CEM 및 Raji 세포에 대한 ADCC 및 CDC 활성을 나타낸다.

도 13은 상이한 농도에서 리드 항체 W3455 또는 벤치마크 항체 처리 후 Raji-Luc 림프계 암 세포 접종된 B-NDG 마우스의 체중 변화를 나타낸다.

도 14는 상이한 농도에서 리드 항체 W3455 또는 벤치마크 항체 처리 후 발광 신호 강도 (종양 성장에 상응)의 변화를 나타낸다.

도 15는 그룹화 후 B-NDG 마우스 모델에서 개별 동물의 라이브 이미징 사진을 나타낸다. 이 그래프에서 "BMK2"는 W345-BMK2.uIgG4.SP (또는 "W345-BMK2"로 약칭)를 지칭한다.

도 16은 그룹화 후 0 - 32일 동안 B-NDG 마우스 모델에서 동물 생존율을 나타낸다.

도 17은 리드 항체 W3455를 단독으로 또는 파니투무맙과 병용 투여한 후 HT-29 세포로 접종된 NCG 마우스의 종양 부피 변화를 나타낸다.

도 18은 리드 항체 W3455를 단독으로 또는 파니투무맙과 병용 투여한 후 종양 성장 억제 (TGI)의 백분율을 나타낸다.

도 19a, 도 19b는 리드 항체 W3455, BMK2 또는 BMK8을 투여한 후 Raji 세포 접종된 CB-17 SCID 마우스에서 체중 변화 (a) 및 종양 부피 변화 (b)를 나타낸다.

도 20은 시노물구스 원숭이 PK 연구에서 리드 항체 W3455의 혈청 농도를 나타낸다.

도 21a, 도 21b, 도 21c는 시노물구스 원숭이의 임상 혈액학에서 리드 항체 W3455의 투여 후 적혈구 수 (a), 헤모글로빈 수준 (b) 및 망상적혈구 수 (c)의 변화를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0077] 당업자는 본 명세서의 기재 내용이 구체적으로 기재된 것 이외의 변형 및 수정이 가능하다는 것을 이해할 것이다. 본 명세서의 기재 내용은 이러한 모든 변형 및 수정을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 또한 본 명세서는 개별적 또는 집합적으로 본 명세서에서 언급되거나 표시된 모든 단계, 특징, 조성물 및 화합물, 및 상기 단계 또는 특징 중 임의의 및 모든 조합 또는 임의의 둘 이상을 포함한다.

[0078] 본 명세서에서 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 과학 기술 용어는 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 또한, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함하고 복수 용어는 단수를 포함한다. 보다 구체적으로, 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와

같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "단백질"에 대한 언급은 복수의 단백질을 포함하고; "세포"에 대한 언급은 세포의 혼합물 등을 포함한다. 본 명세서에서 "또는"의 사용은 달리 명시되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 또한, 용어 "포함하는(comprising)", 및 "포함한다(comprises)" 및 "포함된(comprised)"과 같은 "포함하는"의 다른 형태의 사용은 제한적이지 않다. 또한, 명세서 및 첨부된 청구범위에 제공된 범위는 끝 지점 및 끝 지점 사이의 모든 지점을 모두 포함한다.

[0079] 일반적으로, 본 명세서에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학 및 혼성화와 관련하여 사용되는 명명법 및 기술은 당업계에 널리 공지되고 일반적으로 사용되는 것이다. 본 명세서에 기재된 방법 및 기술은 일반적으로 당업계에 널리 공지된 통상적인 방법에 따라, 그리고 달리 지시되지 않는 한 본 명세서 전체에 걸쳐 인용 및 논의되는 다양한 일반적이고 보다 구체적인 참고문헌에 기재된 바와 같이 수행된다. 예를 들어, Abbas *et al.*, *Cellular and Molecular Immunology*, 6<sup>th</sup> ed., W.B. Saunders Company (2010); Sambrook J. & Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); and Coligan *et al.*, *Short Protocols in Protein Science*, Wiley, John & Sons, Inc. (2003)와 같다. 본 명세서에 기술된 분석 화학, 합성 유기 화학, 의약 및 약학 화학과 관련하여 사용되는 명명법, 실험실 절차 및 기술은 당업계에 잘 알려져 있고 일반적으로 사용되는 것들이다. 또한, 여기에 사용된 모든 항목의 제목은 조직화 목적만을 위한 것이며 청구된 발명을 한정하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0080] 정의

[0081] 관련 용어 또는 표현에 대한 정의 및 설명은 다음과 같다.

[0082] 본 명세서의 용어 "항체" 또는 "Ab"는 일반적으로 공유 이황화 결합 및 비공유 상호작용에 의해 함께 유지되는 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L) 폴리펩타이드 체인을 포함하는 Y형 사량체성 (tetrameric) 단백질을 의미한다. 항체의 경쇄는  $\kappa$  및  $\lambda$  경쇄로 분류될 수 있다. 중쇄는  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  및  $\epsilon$ 로 분류될 수 있으며, 이는 항체의 이소타입을 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 정의한다. 경쇄 및 중쇄에서 가변 영역 (variable region)은 약 12개 이상 아미노산의 "J" 영역을 통해 불변 영역 (constant region)에 연결되고, 중쇄는 약 3개 이상 아미노산의 "D" 영역을 추가적으로 포함한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역 ( $V_H$ )과 중쇄 불변 영역 ( $C_H$ )으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인 ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  및  $C_{H3}$ )으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역 ( $V_L$ )과 경쇄 불변 영역 ( $C_L$ )으로 구성된다.  $V_H$  및  $V_L$  영역은 초가변 영역 (hypervariable region, 상보적 결정 영역 (CDR)이라고 함)으로 더 나눌 수 있으며, 이 영역은 비교적 보수적인 (conservative) 영역 (프레임워크 영역 (FR)이라고 함)에 의해 이격되어 있다. 각각의  $V_H$  및  $V_L$ 은 N-말단에서 C-말단 방향으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성된다. 각 중쇄/경쇄 쌍의 가변 영역 ( $V_H$  및  $V_L$ )은 각각 항원 결합 부위를 형성한다. 다양한 영역 또는 도메인에서의 아미노산 분포는 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), or Chothia & Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia *et al.*, (1989) *Nature* 342:878-883의 정의를 따른다. 항체는 상이한 항체 이소타입, 예를 들어, IgG (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 하위유형), IgA1, IgA2, IgD, IgE 또는 IgM 항체일 수 있다.

[0083] 본 명세서의 맥락에 따라 상호교환가능하게 사용될 수 있는 용어인 항체의 "항원 결합 부위" 또는 "항원 결합 단편"은, 전장 항체 (full-length antibody)가 특이적으로 결합하는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는, 및/또는 동일한 항원에 결합하기 위해 전장 항체와 경쟁하는, 전장 항체의 단편을 포함하는 폴리펩타이드를 의미한다. 일반적으로 *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., the second edition, Raven Press, N.Y. (1989))를 참조하며, 이는 모든 목적을 위해 본 명세서에 참고로 포함된다. 항체의 항원 결합 단편은 재조합 DNA 기술, 또는 온전한 효소의 효소적 또는 화학적 방법 분리 (cleavage)에 의해 생성될 수 있다. 일부 조건에서 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, dAb 및 상보적 결정 영역 (CDR) 단편, 단일 사슬 항체 (예: scFv), 키메라 항체, 디아바디 (diabody) 및 폴리펩타이드에 특이적 항원 결합 능력을 부여하기에 충분한 적어도 항체의 일부를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 항체의 항원 결합 단편은 당업자에게 공지된 통상적인 기술 (예를 들어, 재조합 DNA 기술, 또는 효소적 또는 화학적 분리 기술)에 의해 주어진 항체 (예를 들어,

본 발명에서 제공되는 단일 클론 항-인간 X 항체)로부터 수득될 수 있고, 온전한 항체가 스크리닝되는 것과 동일한 방식으로 특이성에 대해 스크리닝될 수 있다.

- [0084] 본 명세서의 용어 "단일 클론 항체" 또는 "mAb"는 단일 분자 조성의 항체 분자의 제제를 의미한다. 단일 클론 항체는 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화성을 나타낸다.
- [0085] 본 명세서의 용어 "인간 항체" 또는 "완전한 인간 항체(fully human antibody)"는 프레임워크 및 CDR 영역 모두가 인간 생식 계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 더욱이, 항체가 불변 영역을 포함하는 경우, 불변 영역 또한 인간 생식 계열 면역글로불린 서열로부터 유래된다. 인간 항체는 인간 생식 계열 면역글로불린 서열에 의해 인코딩되지 않은 아미노산 잔기를 포함할 수 있다 (예를 들어, 시험관내 무작위 돌연변이 또는 부위-특이적 돌연변이 생성에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이). 그러나, 본 명세서의 용어 "인간 항체"는 마우스와 같은 다른 포유동물 종의 생식 계열로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 이식된 항체를 포함하도록 의도되지 않는다.
- [0086] 본 명세서의 용어 "인간 단일 클론 항체"는 프레임워크 및 CDR 영역 모두가 인간 생식 계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역을 갖는 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 의미한다.
- [0087] 본 명세서의 용어 "인간화 항체"는 마우스와 같은 다른 포유동물 종의 생식 계열로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 이식된 항체를 지칭하도록 의도된다. 인간 프레임워크 서열 내에서 추가적인 프레임워크 영역 변형이 이루어질 수 있다.
- [0088] 본 명세서의 용어 "키메라 항체"는 가변 영역 서열이 한 종으로부터 유래되고 불변 영역 서열이 다른 종으로부터 유래된 항체, 예를 들어 가변 영역 서열이 마우스 항체로부터 유래되고, 불변 영역 서열이 인간 항체로부터 유래된 항체를 지칭한다.
- [0089] 본 명세서의 용어 "재조합 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체, 예를 들어 다른 종의 면역글로불린 유전자에 대해 형질전환된 동물로부터 단리된 항체, 재조합 발현 벡터를 사용하여 숙주 세포에서 발현된 항체, 재조합, 조합 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 또는 면역글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열에 스플라이싱하는 단계를 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체를 의미한다.
- [0090] 본 명세서의 용어 "Ka"는 특정 항체-항원 상호작용의 회합 속도 (association rate)를 나타내는 것으로 의도되는 반면, 본 명세서의 용어 "Kd"는 특정 항체-항원 상호 작용의 해리 속도 (dissociation rate)를 나타내는 것으로 의도된다. 항체에 대한 Kd 값은 당업계에서 잘 확립된 방법을 사용하여 결정할 수 있다. 본 명세서의 용어 "K<sub>D</sub>"는 Kd 대 Ka의 비율 (즉, Kd/Ka)로부터 얻어지고, 몰 농도 (M)로 표현된다. 항체의 Kd를 결정하기 위한 바람직한 방법은 표면 플라즈몬 공명을 사용하는 것이고, 바람직하게는 Biacore® 시스템과 같은 바이오센서 시스템을 사용하는 것이다.
- [0091] 본 명세서의 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"은 예를 들어 항체와 항원 사이와 같은 2개의 분자 사이의 비-무작위 결합 반응을 지칭한다.
- [0092] 본 명세서의 용어 "결합 억제" 또는 "결합 차단"의 능력은 2개의 분자 (예를 들어, CD47 및 그의 리간드) 간의 결합 상호작용을 임의의 검출가능한 수준으로 억제하는 항체의 능력을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 2개의 분자의 결합은 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 의해 50% 이상 억제될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 이러한 억제 효과는 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 또는 90% 초과일 수 있다.
- [0093] 본 명세서의 IgG 항체에 대한 용어 "고친화성"은 SPR에 의해 결정된, 표적 항원에 대해  $1 \times 10^{-7}$  M 이하, 바람직하게는  $5 \times 10^{-8}$  M 이하, 보다 더 바람직하게는  $1 \times 10^{-8}$  M 이하, 보다 더 바람직하게는  $5 \times 10^{-9}$  M 이하, 보다 더 바람직하게는  $1 \times 10^{-9}$  M 이하, 보다 더 바람직하게는  $5 \times 10^{-10}$  M 이하, 보다 더 바람직하게는  $1 \times 10^{-10}$  M 이하, 보다 더 바람직하게는  $5 \times 10^{-11}$  M 이하, 보다 더 바람직하게는  $4 \times 10^{-11}$  M 이하, 보다 더 바람직하게는  $3 \times 10^{-11}$  M 이하, 보다 더 바람직하게는  $2.5 \times 10^{-11}$  M 이하의 K<sub>D</sub>를 갖는 항체를 지칭한다.
- [0094] 본 명세서의 용어 "EC<sub>50</sub>"은 "최대 유효 농도의 절반"으로도 지칭되며, 특정 노출 시간 후에 기준선과 최대값 사이의 중간 반응을 유도하는 약물, 항체 또는 독성 물질의 농도를 의미한다. 본 명세서에서 EC<sub>50</sub>은 "nM" 단위로

표시된다.

- [0095] 본 명세서의 용어 "에피토프"는 면역글로불린 또는 항체가 특이적으로 결합하는 항원 상의 부분을 의미한다. 또한 "에피토프"는 "항원 결정기" 라고 알려져 있다. 에피토프 또는 항원 결정기는 일반적으로 아미노산, 탄수화물 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적 활성 표면 그룹으로 구성되며 일반적으로 특정 3차원 구조 및 특정 전하 특성을 갖는다. 예를 들어, 에피토프는 일반적으로 다음과 같은 독특한 입체 구조에서 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 연속적 또는 비연속적 아미노산을 포함하며, 이는 "선형" 또는 "형태적 (conformational)"일 수 있다. 예를 들어, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)를 참조한다. 선형 에피토프에서 단백질과 상호작용 분자 (예를 들어, 항체) 사이의 모든 상호작용 부위는 단백질의 1차 아미노산 서열을 따라 선형으로 존재한다. 형태적 에피토프에서 상호작용 부위는 단백질에서 서로 분리된 아미노산 잔기에 걸쳐 있다. 항체는 동일한 에피토프에 대한 결합 경쟁력에 따라 당업자에게 공지된 통상적인 기술로 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, 경쟁 또는 교차 경쟁에 대한 연구는 항원 결합에 대해 서로 경쟁하거나 교차 경쟁하는 항체 (예를 들어, RSV 융합 단백질)를 얻기 위해 수행될 수 있다. 교차 경쟁을 기반으로 하는 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 얻기 위한 고속 처리 방법은 국제 특허 출원 WO 03/48731에 설명되어 있다.
- [0096] 본 명세서의 용어 "단리된"은 인공적인 수단에 의해 자연 상태에서 획득된 상태를 의미한다. 특정 "단리된" 물질 또는 구성 요소가 자연 상태에 존재한다면, 이는 자연 환경의 변화, 자연 환경에서의 물질의 분리, 또는 두 경우 모두에 의해 가능하다. 예를 들어, 어떤 단리되지 않은 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 어떤 살아있는 동물의 체내에 자연적으로 존재하고, 이러한 자연 상태에서 단리된 고순도 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드를 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드라고 한다. 용어 "단리된"은 혼합된 인공 또는 합성 물질, 또는 단리된 물질의 활성에 영향을 미치지 않는 기타 불순물을 포함하지 않는다.
- [0097] 본 명세서의 용어 "벡터"는 내부에 삽입된 폴리뉴클레오타이드를 가질 수 있는 핵산 운반체를 의미한다. 벡터가 그 안에 삽입된 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 단백질의 발현을 허용하는 경우, 벡터를 발현 벡터라고 한다. 벡터는 형질전환, 형질도입 또는 숙주 세포로의 형질감염에 의해 숙주 세포에서 발현되는 운반된 유전 물질 요소를 가질 수 있다. 벡터는 당업자에게 잘 알려진 플라스미드, 파지, 코스미드 (cosmid), 효모 인공 염색체 (YAC), 박테리아 인공 염색체 (BAC) 또는 P1 유래 인공 염색체 (PAC);  $\lambda$  파지 또는 M13 파지와 같은 파지 및 동물 바이러스와 같은 인공 염색체를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 벡터로 사용할 수 있는 동물 바이러스에는 레트로바이러스 (렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 헤르페스 바이러스 (예를 들어, 단순 헤르페스 바이러스), 수두 바이러스, 배콜로바이러스, 유두종바이러스, 파포바 바이러스 (SV40과 같은)가 포함되지만 이에 한정되는 것은 아니다. 벡터는 유전자 발현 조절을 위한 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 선별 요소 및 리포터 유전자를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 벡터는 복제 원점 (origin of replication)을 포함할 수 있다.
- [0098] 본 명세서의 용어 "숙주 세포"는 관심 있는 단백질, 단백질 단편 또는 펩타이드를 생성하도록 조작될 수 있는 세포 시스템을 의미한다. 숙주 세포는 배양된 세포, 예를 들어 설치류 (쥐, 마우스, 기니피그 또는 햄스터)로부터 유래된 CHO, BHK, NSO, SP2/0, YB2/0와 같은 포유동물 배양 세포; 또는 인간 조직 또는 하이브리도마 세포, 효모 세포 및 곤충 세포, 및 형질전환 동물 또는 배양된 조직 내에 포함된 세포를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 이 용어는 특정 대상 세포뿐만 아니라 그러한 세포의 자손도 포함한다. 돌연변이나 환경적 영향으로 인해 다음 세대에서 특정 변형이 발생할 수 있기 때문에 이러한 자손은 모세포와 동일하지 않을 수 있지만 여전히 "숙주 세포"라는 용어의 범위에 포함된다.
- [0099] 본 명세서의 용어 "동일성"은 서열을 정렬하고 비교함으로써 결정되는 2개 이상의 폴리펩타이드 분자 또는 2개 이상의 핵산 분자 서열 사이의 관계를 의미한다. "퍼센트 동일성"은 비교되는 분자의 아미노산 또는 뉴클레오타이드 사이의 동일한 잔기의 퍼센트를 의미하며, 비교되는 가장 작은 분자의 크기를 기준으로 계산된다. 이러한 계산을 위해 정렬의 간격 (있는 경우)은 특정 수학적 모델 또는 컴퓨터 프로그램 (즉, "알고리즘")에 의해 처리되는 것이 바람직하다. 정렬된 핵산 또는 폴리타이드의 동일성을 계산하기 위해 사용될 수 있는 방법은 문헌 in Computational Molecular Biology, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton

Press; and Carillo et al, 1988, SIAMJ. Applied Math. 48:1073. 에 기재된 내용을 포함한다.

- [0100] 본 명세서의 용어 "면역원성"은 유기체에서 특정 항체 또는 감작된 (sensitized) 림프구의 형성을 자극하는 능력을 의미한다. 이는 특정 면역세포를 자극하여 활성화, 증식 및 분화하여 최종적으로 항체 및 감작된 림프구와 같은 면역학적 효과물질을 생성하는 항원의 특성뿐만 아니라, 항원으로 유기체를 자극한 후 유기체의 면역계에서 항체 또는 감작된 T림프구가 생성될 수 있는 특정 면역반응을 의미한다. 면역원성은 항원의 가장 중요한 특성이다. 항원이 숙주에서 면역반응의 발생을 성공적으로 유도할 수 있는지 여부는 항원의 성질, 숙주의 반응성, 면역수단의 3가지 요인에 의해 결정된다.
- [0101] 본 명세서의 용어 "형질전환(transfection)"은 핵산이 진핵 세포, 특히 포유동물 세포 내로 도입되는 과정을 지칭한다. 형질전환을 위한 프로토콜 및 기술에는 지질 형질전환 및 전기천공과 같은 화학적 및 물리적 방법이 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. 다수의 형질전환 기술이 당업계에 잘 알려져 있고 본 명세서에 개시되어 있다. 예를 들어, Graham et al., 1973, Virology 52:456; Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, supra; Davis et al., 1986, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier; Chu et al, 1981, Gene 13:197. 를 참조로 한다.
- [0102] 본 명세서의 용어 "하이브리도마" 및 용어 "하이브리도마 세포주"는 상호교환적으로 사용될 수 있다. "하이브리도마" 및 "하이브리도마 세포주"라는 용어가 언급되는 경우, 하이브리도마의 서브클론 (subclone) 및 자손 세포도 포함된다.
- [0103] 본 명세서의 용어 "SPR" 또는 "표면 플라즈몬 공명"은 예를 들면, BIAcore system (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.)을 사용하는 것과 같이, 바이오센서 매트릭스 내의 단백질 농도의 변화를 검출함으로써 실시간 바이오특이적 (biospecific) 상호작용의 분석을 가능케하는 광학 현상을 지칭 및 포함한다. 추가 설명은 실시예 5 및 Jonsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jonsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; and Johnson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.에 제시되어 있다.
- [0104] 본 명세서의 용어 "형광 활성화 세포 분류 (fluorescence-activated cell sorting)" 또는 "FACS"는 전문화된 유형의 유세포 분석을 의미한다. 각 세포의 특정 광산란 및 형광 특성을 기반으로 생물학적 세포의 이종 혼합물을 두 개 이상의 용기에 한 번에 한 세포씩 분류하는 방법을 제공한다 (FlowMetric. "Sorting Out Fluorescence Activated Cell Sorting". Retrieved 2017-11-09.). FACS를 수행하기 위한 기구는 당업자에게 알려져 있고 대중에게 상업적으로 입수가능하다. 이러한 기구의 예로는 Becton Dickinson (Foster City, CA.)의 FACS Star Plus, FACScan 및 FACSsort 기기, Coulter Epics Division (Hialeah, Fla.)의 Epics C, Cytomation (Colorado Springs, Colo.)의 MoFlo가 포함된다.
- [0105] 본 명세서의 용어 "항체 의존적 세포 매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 세포독성 효과기 세포가 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합하고 후속적으로 세포독소 (cytotoxin)로 표적 세포를 죽일 수 있도록 특정 세포독성 세포 (예를 들어, 자연살해 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비된 Ig의 세포독성 형태를 의미한다. 항체는 세포독성 세포를 "무장 (arm)"시키며 세포의 사멸에 절대적으로 필요하다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc $\gamma$ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII 및 Fc $\gamma$ RIII를 발현한다. 조혈 세포에 대한 FcR 발현은 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)의 464페이지 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기술된 것과 같은 시험관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 이러한 분석에 유용한 효과기 세포에는 말초혈액 단핵세포 (PBMC) 및 자연살해 (NK) 세포가 포함된다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내, 예를 들어, in an animal model such as that disclosed in Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998). 에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 평가될 수 있다.
- [0106] 본 명세서의 용어 "보체 의존적 세포독성" 또는 "CDC"는 보체 존재 하의 표적 세포의 용해를 지칭한다. 고전적 보체 경로의 활성화는 보체 시스템의 첫 번째 성분(C1q)이 동족 항원 (cognate antigen)에 결합된 항체 (적절한 서브클래스의)에 결합함으로써 시작된다. 보체 활성화를 평가하기 위해 CDC 분석, 예를 들어 Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996)에 기재된 방법을 수행할 수 있다.
- [0107] 본 명세서의 용어 "EU 넘버링"은 Kabat et al.에서와 같은 EU 넘버링을 의미한다. Kabat 넘버링 시스템은 일반적으로 가변 도메인의 잔기 (대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)를 지칭할 때 사용된다 (예를 들어, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes

of Health, Bethesda, Md. (1991)). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 인덱스"는 일반적으로 면역글로불린 중쇄 불변 영역의 잔기를 지칭할 때 사용된다 (예를 들어, Kabat et al., 상기 기재된 EU 인덱스). 본 명세서에서 달리 언급되지 않는 한, 항체의 불변 도메인에서 잔기 번호에 대한 언급은 EU 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다. 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 Fc 변형, 예를 들어 EU 넘버링에 따른 인간 IgG4 Fc 영역의 아미노산 서열의 위치 228에서 세린 ("S")의 프롤린 ("P")으로의 돌연변이를 포함한다.

- [0108] 본 명세서의 용어 "대상"은 인간 또는 인간이 아닌 동물, 바람직하게는 인간을 의미한다.
- [0109] 본 명세서의 용어 "암"은 임의의 또는 종양 또는 악성 세포 성장, 증식 또는 전이-매개된 고형 종양 및 백혈병과 같은 비-고형 종양 및 의학적 상태를 개시하는 것을 지칭한다.
- [0110] 본 명세서의 용어 "치료", "치료하는" 또는 "치료된"은 상태를 치료하는 맥락에서 사용되며, 일반적으로 인간이든 동물이든 간에 원하는 치료 효과가 달성되는 치료 및 요법에 관한 것이며, 예를 들어, 상태의 진행 억제는 진행률의 감소, 진행률의 정지, 상태의 퇴행, 상태의 개선, 및 상태의 치유를 포함한다. 예방 조치 (즉, 프로필락시스 (prophylaxis), 예방)로서의 치료도 포함된다. 암의 경우, "치료하는"은 종양 또는 악성 세포의 성장, 증식 또는 전이, 또는 이들의 일부 조합을 약화시키거나 늦추는 것을 의미할 수 있다. 종양의 경우, "치료"는 종양의 전부 또는 일부의 제거, 종양 성장 및 전이의 억제 또는 지연, 종양 발달의 예방 또는 지연, 또는 이들의 일부 조합을 포함한다.
- [0111] 본 명세서의 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 투여시 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 일부 목적하는 치료 효과를 얻기 위해 효과적인 활성 화합물, 또는 활성 화합물을 포함하는 물질, 조성물 또는 투여량의 양에 관한 것이다. 예를 들어, "유효량"은 표적 항원-관련 질병 또는 상태의 치료와 관련하여 사용될 때 상기 질병 또는 상태를 치료하기에 효과적인 양 또는 농도의 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 의미한다.
- [0112] 본 명세서의 용어 "예방하다", "예방" 또는 "예방하는" 포유동물의 특정 질병 상태와 관련하여 본 명세서에서 사용되며, 질병의 발병을 예방 또는 지연시키거나 그의 임상적 또는 무증상 증상의 징후를 예방하는 것을 의미한다.
- [0113] 본 명세서의 용어 "약제학적으로 허용되는"은 운반체, 희석제, 부형제 및/또는 그의 염이 제제의 다른 성분과 화학적 및/또는 물리적으로 양립할 수 있으며 수용자와 생리학적으로 양립할 수 있음을 의미한다.
- [0114] 본 명세서의 용어 "약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제"는 대상 및 활성제와 약리학 및/또는 생리학적으로 양립할 수 있는 담체 및/또는 부형제를 의미하며, 이는 당업계에 널리 공지되어 있고, (예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), pH 조절제, 계면활성제, 보조제 및 이온 강도 향상제를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 예를 들어, pH 조절제는 인산염 완충액을 포함하지만 이에 한정되지는 않으며; 계면활성제는 양이온성, 음이온성 또는 비이온성 계면활성제를 포함하지만 이에 한정되지는 않으며, 예를 들어 Tween-80; 이온 강도 증강제는 염화나트륨을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.
- [0115] 본 명세서의 용어 "어주버트"는 항원과 함께 유기체에 전달되거나 미리 유기체에 전달될 때 항원에 대한 면역 반응을 향상시키거나 유기체의 면역 반응 유형을 변경할 수 있는 비특이적 면역증강제를 지칭한다. 알루미늄 보조제 (예를 들어, 수산화알루미늄), 프로인트 보조제 (Freund's adjuvant) (예를 들어, 프로인트 완전 보조제 및 프로인트 불완전 보조제), 코리네 박테리아 파르부름 (coryne bacterium parvum), 지질다당류, 사이토카인 등을 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 보조제가 있다. 프로인트 보조제 (Freund's adjuvant)는 현재 동물 실험에서 가장 일반적으로 사용되는 어주버트이다. 수산화알루미늄 보조제는 임상 시험에서 더 일반적으로 사용된다.
- [0116] **I. 항-CD47 항체**
- [0117] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 항-CD47항체 또는 그의 항원 결합 부위를 포함한다.
- [0118] 본 명세서의 맥락에서, "항체"는 폴리클로날 항체, 멀티클로날 항체, 단일 클론 항체, 키메라 항체, 인간화 및 영장류화 항체, CDR 이식된 항체, 인간 항체, 재조합적으로 생성된 항체, 인트라바디 (intrabody), 다중특이적 항체, 이중특이적 항체, 1가 항체 (monovalent antibody), 다가 항체 (multivalent antibody), 항이디오타입 항체 (anti-idiotypic antibody), 뮤테인 및 그의 변이체를 포함하는 합성 항체; 및 Fc 융합 및 기타 변형을 포함하는 그의 유도체, 및 CD47과의 우선적인 회합 또는 결합을 나타내는 임의의 다른 면역 반응성 분자를 포함한다. 더욱이, 본 명세서에서 달리 언급되지 않는 한, 용어 "항체"는 모든 타입의 항체 (즉, IgA, IgD, IgE, IgG

및 IgM) 및 모든 서브 타입의 항체 (즉, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2)를 추가적으로 포함한다. 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 항체는 단일 클론 항체이다. 본 발명의 보다 바람직한 일 구현예에서, 항체는 완전한 인간 단일 클론 항체이다.

[0119] 단일 클론 항체는 하이브리도마 기술, 재조합 기술, 파지 디스플레이 기술, 형질전환 동물 (예를 들어, Xenomouse®) 또는 이들의 일부 조합을 포함하는 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 단일 클론 항체는 하이브리도마 및 당업계에 널리 알려진 생화학적 및 본 명세서에 참조로 포함되는 An, Zhigiang (ed.) *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, John Wiley and Sons, 1<sup>st</sup> ed. 2009; Shire et. al. (eds.) *Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing*, Springer Science + Business Media LLC, 1<sup>st</sup> ed. 2010; Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988; Hammerling, et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) 에 구체적으로 기재되어 있는 유전 공학 기술을 사용해 제작할 수 있다. 선별된 결합 서열은 예를 들어 표적에 대한 친화도를 개선하고, 표적 결합 서열을 인간화하고, 세포 배양에서 생산성을 개선하고, 생체내 면역원성을 감소시키고, 다중특이성을 생성하기 위해 추가로 변경될 수 있음을 이해해야 한다. 항체 등을 포함하고, 변경된 표적 결합 서열을 포함하는 항체는 또한 본 발명의 항체이다. 본 발명의 일 구현예에서, 항-인간CD47 단일 클론 항체는 하이브리도마 기술을 사용하여 제작된다. 하이브리도마의 생성은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York를 참조한다.

[0120] **항-CD47 항체의 특성**

[0121] 본 발명의 항체는 항체의 특정한 기능적 특징 또는 특성을 특징으로 한다. 본 발명의 일 구현예에서, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 다음 특성 중 1개 이상을 갖는다:

[0122] (a) 가용성 단백질로서 발현되거나 또는 세포 표면에서 발현되는, 인간 CD47 및 시노몰구스 원숭이 CD47에 특이적으로 결합;

[0123] (b) SIRP α에 대한 CD47의 결합을 효과적으로 차단, 예를 들어 억제율은 85%이상;

[0124] (c) 적혈구 (RBC)에 대해 약하게 결합 및 인간 RBC의 혈구응집을 유도하지 않음;

[0125] (d) 인간 RBC의 식세포 작용이 감소된, 종양 세포의 강력한 대식세포 매개 식세포 작용을 유도;

[0126] (e) 종양 세포의 ADCC 및 CDC 활성을 약하게 또는 전혀 유도하지 않음;

[0127] (f) 우수한 열 안정성을 갖고 인간 혈청에서 안정적;

[0128] (g) 동물 종양 모델에서 생체내에서 강력한 종양 성장 억제를 유도; 및

[0129] (h) 다른 항-종양 분자, 특히 파니투무맙(panitumumab)과 병용 투여될 때 상승 효과를 나타냄.

[0130] CD47에 특이적으로 결합

[0131] 본 발명의 항체는 높은 친화도로 인간 및 시노몰구스 원숭이 CD47 모두에 결합한다. 본 명세서에 기재된 CD47에 대한 항체의 결합은 당업계에 잘 확립된 1 이상의 기술, 예를 들어 ELISA를 사용하여 평가될 수 있다. 본 명세서에 기재된 항체의 결합 특이성은 또한 CD47 단백질을 발현하는 세포에 대한 항체의 결합, 예를 들어 유세포분석을 모니터링함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어, 항체는 세포 표면에서 CD47을 발현하도록 형질전환된 CHO 또는 CHOK1 세포와 같은 인간 CD47을 발현하는 세포주와 항체를 반응시키는 유세포 분석법에 의해 테스트될 수 있다. 추가적 또는 대안적으로, 결합 동역학 (예를 들어,  $K_d$  값)을 포함하는 항체의 결합은 BIAcore 결합 분석에서 테스트될 수 있다. 또 다른 적합한 결합 분석법은 예를 들어 재조합 CD47 단백질을 사용하는 ELISA 분석법을 포함한다.

[0132] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 항체는 ELISA에 의한 측정시 0.1 nM 이하, 0.09 nM 이하, 0.08 nM 이하, 0.07 nM 이하, 0.06 nM 이하, 0.05 nM 이하, 또는 보다 바람직하게는 0.04 nM 이하의 EC50에서 인간 CD47에 결합한다. 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 SPR에 의한 측정시  $1 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD47에 결합하고,  $5 \times 10^{-10}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD47에 결합하고,  $1 \times 10^{-10}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD47에 결합하고, 5

$x \times 10^{-11}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD47에 결합하고,  $4 \times 10^{-11}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD47에 결합하고, 또는 보다 바람직하게는  $3 \times 10^{-11}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD47에 결합한다.

[0133] SIRP  $\alpha$ 에 대한 CD47의 결합 차단

[0134] 주로 대식세포의 표면에서 발견되는 신호 조절 단백질 알파 (Signal regulatory protein alpha, SIRP  $\alpha$ , CD172a로도 알려짐)는 CD47에 대한 수용체이다. 본 발명의 항체는 예를 들어, 신호 조절 단백질 알파 (SIRP  $\alpha$ )에 대한 CD47의 결합을 차단, 억제, 감소, 길항, 중화 또는 방해한다. CD47은 SIRP  $\alpha$ 와 상호작용하는 것으로 알려져 있어 면역 감시 (immune surveillance)를 피할 수 있다. CD47-SIRP  $\alpha$  상호작용의 차단, 예를 들어 본 명세서에 기재된 항-CD47 항체의 사용은 면역 탈출을 개선하거나 극복할 수 있다.

[0135] 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 항-CD47 항체는 SIRP  $\alpha$ 에 대한 CD47의 상호작용을 효과적으로 차단할 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 억제율은 항-CD47 항체를 포함하는 차단 샘플과 리간드 단독 샘플의 OD450 값을 비교함으로써 얻을 수 있다. 더 높은 억제율은 더 높은 차단 능력을 나타낸다. 예를 들어, 억제율은 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 또는 85% 이상일 수 있다. 즉, 항-CD47 항체는 본 명세서에 기재된 바와 같이 항-CD47 항체의 부재 하에 CD47과 SIRP  $\alpha$  사이의 상호작용의 적어도 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 또는 85% 이상을 차단할 수 있다.

[0136] 인간 적혈구(RBC)에 대한 약한 결합 및 적혈구의 혈구응집 방지

[0137] 특히 RBC에서, CD47의 흔한(ubiquitous) 발현은 항-CD47 항체 요법의 사용을 제한한다. 많은 항-CD47 항체가 인간 적혈구의 혈구응집을 일으키는 것으로 보고되었다. 전임상 연구에서, 일시적 용혈성 빈혈은 항-CD47 요법의 RBC 제거율 증가와 관련이 있었다.

[0138] 놀랍게도, 본 발명의 항체는 인간 적혈구에 약하게만 결합하고 바람직하지 않은 혈구 응집 효과를 피한다. 실시예의 FACS assay에 나타난 바와 같이, 본 발명 항체의 IC50 값 및 최대 MFI 값은 벤치마크 항-CD47 항체와 비교하여 적혈구에 대한 결합이 상당히 더 낮다는 것을 나타내었다. 또한, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 부위는 벤치마크 항-CD47 항체보다 인간 RBC의 혈구 응집을 상당히 덜 유발할 수 있으며, 예를 들어 벤치마크 항-CD47 항체와 비교하여 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 또는 그 이하의 인간 RBC의 혈구 응집을 유발할 수 있다. 예시적인 벤치마크 항체는 표 2에 나타난 바와 같이 BMK1, BMK2 및 BMK4 항체를 포함한다.

[0139] 또한, 실시예에서 입증된 바와 같이, 시노몰구스 원숭이에 본 발명의 항체를 투여하면 경미하고 일시적인 용혈 의존성 빈혈만 유발되며, 이는 단기간 후에 정상 기준선 수준으로 자발적으로 회복될 수 있다.

[0140] 종양 세포의 강력한 대식세포 매개 식세포작용 유도

[0141] CD47이 SIRP  $\alpha$ 에 결합하면 SIRP  $\alpha$ 의 세포내 면역수용체 티로신 기반 억제 모티프 (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM)가 인산화되고 SHP-1 및 SHP-2와 같은 티로신 포스파타아제가 보충 (recruitment) 및 활성화된다. 이후, 인단백질 기질이 탈인산화되어 다운스트림 신호 전달 경로에 영향을 미치고 "나를 먹지 마" 신호를 전송하여 대식세포의 식세포 작용을 억제한다. 축적된 증거에 따르면 CD47은 많은 악성 종양에서 면역 공격을 피하기 위해 상향 조절 (upregulated)되었으며 과발현은 나쁜 예후와 관련이 있다. 게다가, CD47과 SIRP  $\alpha$ 의 라이게이션 (ligation)의 중단은 다양한 악성 종양에서 대식세포에 의한 종양 세포의 식세포를 촉진한다.

[0142] 본 발명의 항체는 종양 세포의 강력한 식세포 작용을 유도할 수 있다. 본 명세서에 개시된 바와 같이 종양 세포는 혈액암 또는 고형 종양의 종양 세포를 포함하는 매우 다양한 종양 세포를 포함한다. 혈액암은 예를 들어 급성 림프모구성 백혈병 (acute lymphoblastic leukemia, ALL), T-ALL, B-ALL, 급성 골수성 백혈병 (acute myelogenous leukemia, AML), 비호지킨 림프종 (Non-Hodgkin lymphoma), B-림프모구성 백혈병/림프종 (B-lymphoblastic leukemia/lymphoma); B 세포 만성 림프구성 백혈병 (B-cell chronic lymphocytic leukemia), 만성 림프구성 백혈병 (chronic lymphocytic leukemia, CLL), 만성 골수성 백혈병 (chronic myelocytic leukemia, CML), 버킷 림프종 (Burkitt's lymphoma), 여포성 림프종 (follicular lymphoma), SLL, CNS 림프종, 리히터 증후군 (Richter's Syndrome), 다발성 골수종 (multiple myeloma) 및 면역아세포 대세포 림프종 (immunoblastic large cell lymphoma)로 이루어진 군에서 선택되는 것이다. 고형 종양은 예를 들어 폐암, 췌장암, 유방암, 간암, 난소암, 고환암, 신장암, 방광암, 뇌암, 자궁경부암, 결장/직장암, 위장관암, 피부암, 전립선암, 위암 등으로 이루어진 군에서 선택되는 것이다.

- [0143] ADCC 또는 CDC 활성의 매개
- [0144] 위에서 기재한 바와 같이, "ADCC"는 세포독성 효과기 세포가 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합하고 후속적으로 세포독소 (cytotoxin)로 표적 세포를 죽일 수 있도록 특정 세포독성 세포 (예: 자연살해 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비된 Ig의 세포독성 형태를 의미한다. "CDC"는 보체 존재 하의 표적 세포의 용해를 지칭한다.
- [0145] 본 발명의 항체가 CCRF-CEM (급성 림프구성 백혈병) 세포 또는 Raji 세포와 같은 종양 세포에 대한 ADCC 또는 CDC 활성을 매개하지 않는다는 것이 본 발명의 발명자들에 의해 발견되었다.
- [0146] 혈청에서의 안정성
- [0147] 안정성은 또한, 특히 항체가 치료제에 사용될 때 항체의 중요한 특성이다. 본 발명의 항체가 인간 혈청에서 적어도 14일 동안 안정적이라는 것이 본 발명의 발명자들에 의해 발견되었다.
- [0148] 강력한 종양 성장 억제 유도
- [0149] 종양 성장 억제의 평가는 다수의 매개변수를 측정함으로써 수행될 수 있다. 예를 들면, 체중 변화, 종양 부피, 종양 성장과 상관된 라이브 영상 값, 동물 생존 시간 등이 있다. 실시예에 나타난 바와 같이, 본 발명 항체는 상이한 종양 모델에서 상당한 종양 성장 억제를 달성할 수 있다.
- [0150] 시너지 효과
- [0151] 놀랍게도, 본 발명 항체는 다른 항종양 분자, 특히 파니투무맙과 병용 투여될 때 상승 효과를 나타낸다. 본 명세서에 개시된 NCG의 HT-29 결장직장 선암종 모델에서, 리드 항체 (lead antibody) W3455 및 파니투무맙의 병용 투여가 W3455 또는 파니투무맙 단독에 비해 유의하게 더 우수한 종양 성장 억제를 달성하였음을 입증하였다 (도 18 및 19).
- [0152] **항-CD47 항체의 CDR**
- [0153] 본 발명의 일 구현예에서, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 다음을 포함한다:
- [0154] A) 다음과 같이 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 중쇄 CDR (HCDR):
- [0155] (i) 서열번호 1을 포함하는 HCDR1;
- [0156] (ii) 서열번호 2를 포함하는 HCDR2; 및
- [0157] (iii) 서열번호 3을 포함하는 HCDR3;
- [0158] B) 다음과 같이 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 경쇄 CDR (LCDR):
- [0159] (i) 서열번호 4를 포함하는 LCDR1;
- [0160] (ii) 서열번호 5를 포함하는 LCDR2; 및
- [0161] (iii) 서열번호 6을 포함하는 LCDR3; 또는
- [0162] C) 1이상의 A)의 HCDR 및 1이상의 B)의 LCDR.
- [0163] 항체 서열의 가변 영역 및 CDR은 당업계에서 개발된 일반 규칙 (예를 들어, Kabat 넘버링 시스템, 및 상기 설명한 바와 같음)에 따라 또는 공지된 가변 영역의 데이터베이스에 대해 서열을 정렬함으로써 확인될 수 있다. 이러한 영역을 식별하는 방법은 Kontermann and Dubel, eds., *Antibody Engineering*, Springer, New York, NY, 2001 and Dinarello *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ, 2000.에 설명되어 있다. 항체 서열의 예시적인 데이터베이스는 [www.bioinf.org.uk/abs](http://www.bioinf.org.uk/abs)의 "Abyasis" 웹사이트 (University College London의 생화학 및 분자생물학부 A.C. Martin에서 유지 관리, 런던, 영국) 및 Retter *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 33 (Database issue) : D671 -D674 (2005) 에 설명되어 있는 VBASE2 웹사이트에 설명되어 있으며 이를 통해 액세스할 수 있다. 바람직하게는 서열은 Kabat, IMGT 및 PDB (Protein Data Bank)의 서열 데이터를 PDB의 구조적 데이터와 통합하는 Abyasis 데이터베이스를 사용하여 분석된다. *Antibody Engineering Lab Manual*(Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg, ISBN-13: 978-3540413547, 웹사이트 [bioinforg.uk/abs](http://bioinforg.uk/abs)에서도 이용 가능)의 Andrew C. R. Martin 박사의 서적 *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains* 챕터를 참조한다. Abyasis 데이터베이스 웹사이트는 본 명세

서의 교시에 따라 사용될 수 있는 CDR을 식별하기 위해 개발된 일반 규칙을 추가적으로 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 본 명세서 기재된 모든 CDR은 Kabat 넘버링 시스템에 따른다.

- [0164] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기
- [0165] (a) VH는 다음을 포함한다: 서열번호 1에 기재된 HCDR1; 서열번호 2에 기재된 HCDR2; 및 서열번호 3에 기재된 HCDR3; 및
- [0166] (b) VL은 다음을 포함한다: 서열번호 4에 기재된 LCDR1; 서열번호 5에 기재된 LCDR2; 및 서열번호 6에 기재된 LCDR3.
- [0167] **항-CD47 항체의 가변 영역**
- [0168] 본 발명의 일 구현예에서, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 다음을 포함한다:
- [0169] (A) 중쇄 가변 영역:
- [0170] (i) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함;
- [0171] (ii) 서열번호 7과 적어도 85%, 90%, 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함; 또는
- [0172] (iii) 서열번호 7과 비교하여 1 이상의 아미노산이 첨가, 결실 및/또는 치환된 아미노산 서열을 포함; 및/또는
- [0173] (B) 경쇄 가변 영역:
- [0174] (i) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함;
- [0175] (ii) 서열번호8과 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함; 또는
- [0176] (iii) 서열번호 8과 비교하여 1 이상의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환이 있는 아미노산 서열을 포함.
- [0177] 두 아미노산 서열 간의 퍼센트 동일성은 ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 통합된 E. Meyers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988))의 알고리즘, PAM120 가중치 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티 (gap length penalty of 12) 및 4의 갭 페널티 (gap penalty of 4)를 사용해 결정되었다. 또한, 두 아미노산 서열 간의 동일성 백분율은 GCG 소프트웨어 패키지 (<http://www.gcg.com>에서 사용 가능)의 GAP 프로그램에 통합된 Needleman 및 Wunsch (J. Mol. Biol 48:444-453 (1970)) 알고리즘, Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 가중치 (gap weight), 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치 (length weight)를 사용해 결정되었다.
- [0178] 추가적 또는 대안적으로, 본 명세서에 개시된 단백질 서열은 예를 들어 관련 서열을 식별하기 위해 공개 데이터 베이스에 대한 검색을 수행하기 위한 "쿼리 서열 (query sequence)"로서 추가로 사용될 수 있다. 이러한 검색은 Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. 의 XBLAST 프로그램(버전 2.0)을 사용하여 수행할 수 있다. BLAST 단백질 검색은 XBLAST 프로그램, 스코어 = 50, 단어 길이 (wordlength) = 3으로 수행되어 본 명세서에 개시된 항체 분자와 상동성이 있는 아미노산 서열을 얻을 수 있다. 비교 목적을 위한 갭 정렬 (gapped alignment)을 얻기 위해 Gapped BLAST는 Altschul et al, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402에 설명된 Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. 가 사용될 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 사용할 때 각 프로그램의 기본 매개변수 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)를 사용할 수 있다. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)를 참조한다.
- [0179] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 단리된 항체의 중쇄 가변 영역 또는 그의 항원 결합 부위는 서열번호 7의 아미노산 서열로 구성되며, 단리된 항체의 경쇄 가변 영역 또는 그의 항원 결합 부위는 서열번호 8의 아미노산 서열로 구성된다.
- [0180] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 위에 기재된 각 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다.
- [0181] 본 발명의 추가적인 일 구현예에 있어서, 단리된 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 영역에서 아미노산의 보존적 치환 또는 변형을 함유할 수 있다. 항원 결합을 제거하지 않는 특정 보존적 서열 변형이 이루어질 수 있음이 당업계에서 이해된다. 예를 들어, Brummell et al. (1993) Biochem 32:1180-8; de Wildt et al. (1997) Prot. Eng. 10:835-41; Komissarov et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:26864- 26870;

Hall et al. (1992) J. Immunol. 149:1605-12; Kelley and O' Connell (1993) Biochem. 32:6862-35; Adib-Conquy et al. (1998) Int. Immunol. 10:341-6 and Beers et al. (2000) Clin. Can. Res. 6:2835-43를 참조한다.

[0182] 상기 기재된 바와 같이, 본 명세서의 용어 "보존적 치환"은 아미노산 서열을 포함하는 단백질/폴리펩타이드의 필수 특성을 변화시키지 않거나 불리한 영향을 미치지 않는 아미노산 치환을 지칭한다. 예를 들어, 보존적 치환은 부위-지정 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발과 같은 당업계에 공지된 표준 기술에 의해 도입될 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기의 유사한 측쇄를 갖는 다른 아미노산 잔기로의 치환을 포함하며, 예를 들면 물리적으로 또는 기능적으로 유사한 잔기 (예를 들어, 유사한 크기, 모양, 전하, 공유 결합 또는 수소 결합을 형성하는 특성 등)로의 치환을 의미한다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당업계에 정의되어 있다. 이러한 패밀리에는 알칼리 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 라이신, 아르기닌 및 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 아스파르트산 및 글루탐산), 전하를 띠지 않는 극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌),  $\beta$ -분지 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다. 따라서, 상응하는 아미노산 잔기는 바람직하게는 동일한 측쇄 패밀리로부터의 다른 아미노산 잔기로 치환된다. 아미노산 보존적 치환을 확인하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다 (예를 들어, Brummell et al., Biochem. 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al., Protein Eng. 12(10): 879- 884 (1999); and Burks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412-417 (1997), 이는 본 명세서에 참조로서 포함됨).

[0183] **Fc 영역**

[0184] 바람직하게는, 본 명세서에 개시된 항체의 Fc 영역은 야생형 인간 Fc 영역 또는 그의 변이체와 같은 인간 Fc 영역이다. Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 포함하는 임의의 이소타입일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 본 발명의 일 구현예에서, Fc 영역은 IgG4 이소타입이다.

[0185] Fc 영역 변이체는 원하는 기능을 변화시키지 않으면서 야생형 Fc 영역과 비교하여 1개 이상의 아미노산 변화 (예를 들어, 삽입, 결실 또는 치환)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서의 개시내용은 Fc 영역에 1 이상의 변형을 포함하는 항체를 포함하며, 그 결과 Fc와 FcRn 사이에 변형된 결합 상호작용 (예를 들어, 강화되거나 감소된)을 가질 수 있는 변형된 Fc 영역을 포함할 수 있다. Fc 변형의 비제한적 예시는 또한, 예를 들어 인간 IgG4 Fc 영역의 아미노산 서열의 위치 228에서 세린 ("S")의 프롤린 ("P")으로의 돌연변이를 포함한다. S228P 돌연변이는 IgG4 분자의 코어 힌지 (core-hinge)에 있는 이황화물을 안정화시켜 Fab-arm 교환을 감소시키므로, 반항체 (half-antibody) 형성을 방지하는 데 도움이 되는 IgG4 안정화 돌연변이에 속한다.

[0186] **II. 항-CD47 항체를 인코딩하는 핵산 분자**

[0187] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 단리된 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

[0188] 본 발명의 핵산은 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 하이브리도마에 (예를 들어, 아래에 추가로 기재되는 인간 면역글로불린 유전자를 보유하는 형질전환 마우스로부터 제조된 하이브리도마) 의해 발현되는 항체의 경우, 하이브리도마에 의해 제조된 항체의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 cDNA는 표준 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝 기술을 통해 얻을 수 있다. 면역글로불린 유전자 라이브러리 (예를 들어, 파지 디스플레이 기술의 사용)로부터 얻은 항체의 경우, 이러한 항체를 코딩하는 핵산은 유전자 라이브러리로부터 회수될 수 있다.

[0189] VH 영역을 인코딩하는 단리된 핵산은 VH-인코딩 핵산을 중쇄 불변 영역 (CH1, CH2 및 CH3)을 코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결함으로써 전장 (full-length) 중쇄 유전자로 변환될 수 있다. 인간 중쇄 불변 영역 유전자의 서열은 당업계에 공지되어 있고 (예를 들어, Kabat et al.(1991), 상기 참조) 이러한 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭을 통해 얻을 수 있다. 중쇄 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역일 수 있지만, 보다 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4 불변 영역이다.

[0190] VL 영역을 인코딩하는 단리된 핵산은 VL-인코딩 DNA를 경쇄 불변 영역, CL을 인코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결함으로써 전장 경쇄 유전자 (및 Fab 경쇄 유전자)로 변환될 수 있다. 인간 경쇄 불변 영역 유전자의 서열은 당업계에 공지되어 있고 (예를 들어, Kabat et al., 상기 참조) 이러한 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭을 통해 얻을 수 있다. 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 경쇄 불변 영역은 카파 ( $\kappa$ ) 또는 랬

다 ( $\lambda$ )불변 영역일 수 있다.

- [0191] VH 및 VL 절편을 인코딩하는 DNA 절편이 얻어지면, 이들 DNA 절편은 표준 재조합 DNA 기술에 의해 추가로 조작되어 Fab 절편 유전자 또는 scFv 유전자로 변환할 수 있으며, 예를 들면 가변 영역 유전자가 전장 항체 사슬 유전자 (full-length antibody chain gene)로 변환될 수 있다. 이러한 조작에서, VL- 또는 VH-인코딩 DNA 단편은 항체 불변 영역 또는 플렉서블 링커 (flexible linker)와 같은 다른 단백질을 인코딩하는 또 다른 DNA 단편에 작동 가능하게 연결된다. 이러한 맥락에서 용어 "작동적으로 연결된"은 2개의 DNA 단편에 의해 인코딩된 아미노산 서열이 프레임 내에 남아 있도록 2개의 DNA 단편이 결합됨을 의미하는 것으로 의도된다.
- [0192] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 단리된 항체의 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0193] 본 발명의 일 구현예에서, 단리된 핵산 분자는 단리된 항체의 중쇄 가변 영역을 인코딩하고 다음과 같이 이루어진 균으로부터 선택된 핵산 서열을 포함한다:
- [0194] (A) 서열번호 7에 기재된 중쇄 가변영역을 인코딩하는 핵산 서열;
- [0195] (B) 서열번호 9에 기재된 핵산 서열; 또는
- [0196] (C) (A) 또는 (B)의 핵산 서열의 상보적 가닥에 높은 엄격성 조건(high stringency condition) 하에 혼성화된 핵산 서열.
- [0197] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 단리된 항체의 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0198] 본 발명의 일 구현예에서, 단리된 핵산 분자는 단리된 항체의 경쇄 가변 영역을 인코딩하고 다음과 같이 이루어진 균으로부터 선택된 핵산 서열을 포함한다:
- [0199] (A) 서열번호 8에 기재된 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 서열;
- [0200] (B) 서열번호 10에 기재된 핵산 서열; 또는
- [0201] (C) (A) 또는 (B)의 핵산 서열의 상보적 가닥에 높은 엄격성 조건 (high stringency condition) 하에 혼성화된 핵산 서열.
- [0202] 예를 들어, 핵산 분자는 서열번호 9 또는 서열번호 10으로 구성된다. 대안적으로, 핵산 분자는 서열번호 9 또는 서열번호 10과 적어도 80% (예를 들어, 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%)의 서열 동일성을 갖는다. 본 발명의 일 구현예에서, 동일성 백분율은 유전자 코드의 축퇴에서 파생되며 암호화된 단백질 서열은 변경되지 않은 상태로 유지된다.
- [0203] 예시적인 높은 엄격성 조건은 5X SSPE 및 45% 포름아미드 45°C에서의 혼성화, 및 0.1 X SSC 65°C에서의 최종 세척을 포함한다. 동등한 엄격성 조건은 Ausubel, et al. (Eds.), *Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1994), pp. 6.0.3 to 6.4.10. 에 기재된 것과 같이 온도 및 완충액, 또는 염 농도의 변경으로 달성될 수 있음이 당업계에 알려진 사실이다. 혼성화 조건의 수정은 프로브의 구아노신/시토신 (GC) 염기 쌍의 길이 및 백분율을 기반으로 경험적으로 결정되거나 정확하게 계산될 수 있다. 혼성화 조건은 Sambrook, et al, (Eds.), *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1989), pp. 9.47 to 9.51.에 기재된 바와 같이 계산될 수 있다.
- [0204] **III. 숙주 세포**
- [0205] 본 발명의 숙주 세포는 본 발명 항체를 발현하기에 적합한 임의의 세포, 예를 들어 포유동물 세포일 수 있다. 본 발명 항체를 발현시키기 위한 포유동물 숙주 세포는 중국 햄스터 난소 (CHO 세포) (예를 들면 R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621에 기재된DHFR selectable marker와 함께 사용되는 Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 77:4216-4220 에 기재된, dhfr CHO 세포 포함), NSO 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포를 포함한다. 특히, NSO 골수종 세포에 사용하기 위한 또 다른 발현 시스템은 WO 87/04462, WO 89/01036 및 EP 338,841에 개시된 GS 유전자 발현 시스템이다. 항체를 인코딩하는 재조합 발현 벡터가 포유동물 숙주 세포에 도입될 때, 항체는 숙주 세포에서 항체의 발현 또는 배양 배지 내로 항체의 분비를 허용하기에 충분한 기간 동안 숙주 세포가 자라는 곳에서 숙주 세포를 배양함으로써 생산된다. 항체는 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 배양 배지에서 회수할 수 있다.

[0206] **IV. 약제학적 조성물**

[0207] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 적어도 1개의 본 발명 항체 또는 그의 항원 결합 부위 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0208] **조성물의 성분**

[0209] 약제학적 조성물은 선택적으로 다른 항체 또는 약물 같은 하나 이상의 추가적인 약제학적 활성 성분을 함유할 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 또한, 예를 들어, 다른 면역 자극제, 항암제, 항바이러스제, 또는 백신과의 병용 요법으로 투여되어 항-CD47 항체가 백신에 대한 면역 반응을 향상시키도록 할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는, 예를 들어 약제학적으로 허용되는 액체, 겔 또는 고체 담체, 수성 매질, 비수성 매질, 항미생물제, 등장제, 완충제, 항산화제, 마취제, 현탁/분산제, 킬레이트제, 희석제, 보조제, 부형제 또는 무독성 보조 물질, 기타 당업계에 공지된 다양한 성분의 조합을 포함할 수 있다.

[0210] 적합한 성분은 예를 들어 항산화제, 충전제, 결합제, 붕해제, 완충제, 보존제, 윤활제, 향미제, 증점제, 착색제, 유화제 또는 당 및 시클로덱스트린 같은 안정제를 포함할 수 있다. 적합한 항산화제는 예를 들어 메티오닌, 아스코르브산, EDTA, 티오황산나트륨, 백금, 카탈라제, 시트르산, 시스테인, 메르캅토 글리세롤, 티오글리콜산, 메르캅토 소르비톨, 부틸 메틸 아니솔, 부틸화 히드록시 톨루엔 및/또는 프로필갈락트를 포함할 수 있다. 본 명세서에 개시된 바와 같이, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 용매에서 메티오닌과 같은 1 이상의 항산화제를 포함하는 조성물이 개시되어 있고, 환원 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 산화될 수 있다. 산화 환원은 결합 친화도의 감소를 방지하거나 감소시켜 항체 안정성을 향상시키고 저장 기간을 연장할 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명은 1 이상의 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 1 이상의 항산화제, 예를 들면 메티오닌을 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 메티오닌과 같은 1이상의 항산화제와 혼합되어 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 산화를 예방해 보관기간을 연장 및/또는 활성도를 증가시키는 다양한 방법을 추가로 제공한다.

[0211] 추가 설명을 위해, 약제학적으로 허용되는 담체는, 예를 들어 염화나트륨 주사, 링거 주사 (Ringer's injection), 등장성 텍스트로스 주사, 멸균수 주사 또는 텍스트로스 및 젖산 링거 주사와 같은 수성 운반체, 식물 유래 고정유 (fixed oil), 면실유, 옥수수유, 참기름 또는 땅콩유 같은 비수성 운반체, 정균 또는 진균 농도의 항균제, 염화나트륨 또는 포도당과 같은 등장제, 인산염 또는 시트르산 완충액과 같은 완충제, 중황산나트륨과 같은 항산화제, 염산프로카인 (procaine hydrochloride)과 같은 국소 마취제, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스 또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 현탁 및 분산제, 폴리소르베이트 80 (TWEEN-80)과 같은 유화제, EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산) 또는 EGTA (에틸렌 글리콜 테트라아세트산), 에틸알코올, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 수산화나트륨, 염산, 시트르산 또는 젖산 같은 격리 (sequestering) 또는 킬레이트제를 포함할 수 있다. 담체로 사용되는 항미생물제는 페놀 또는 크레졸, 수은, 벤질 알코올, 클로로부탄올, 메틸 및 프로필 p-히드록시벤조산 에스테르, 티메로살 (thimerosal), 벤잘코늄 클로라이드 (benzalkonium chloride) 및 벤제토늄 클로라이드 (benzethonium chloride)를 포함하는 다중 용량 용기의 약제학적 조성물에 첨가될 수 있다. 적합한 부형제는, 예를 들어 물, 식염수, 텍스트로스, 글리세롤 또는 에탄올을 포함할 수 있다. 적합한 무독성 보조 물질은, 예를 들어 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 안정화제, 용해도 향상제, 또는 아세트산나트륨, 소르비탄 모노라우레이트 (sorbitan monolaurate), 트리에탄올아민 올레이트 (triethanolamine oleate) 또는 시클로덱스트린과 같은 제제를 포함할 수 있다.

[0212] **투여, 제형 및 투여량**

[0213] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 투여, 정맥내 투여, 동맥내 투여, 피하 투여, 비경구 투여, 비강내 투여, 근육내 투여, 두개내 투여, 심장내 투여, 뇌실내 투여, 기관내 투여, 협측 투여, 직장 투여, 복강내 투여, 피내 투여, 국소 투여, 경피 및 척추강내 투여, 또는 이식 또는 흡입에 의한 투여를 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 경로에 의해 이를 필요로 하는 대상체에 생체내 투여될 수 있다. 대상 조성물은 고체, 반고체, 액체 또는 기체 형태의 제제로 제형화될 수 있으며; 정제, 캡슐, 분말, 과립, 연고, 용액, 좌약, 관장제, 주사제, 흡입제 및 에어로졸을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 적절한 제형 및 투여 경로는 의도된 적용 및 치료 요법에 따라 선택될 수 있다.

[0214] 장내 투여에 적합한 제형은 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐, 환제, 코팅 정제를 포함하는 정제, 엘릭시르 (elixir), 현탁액, 시럽 또는 흡입제 및 그의 제어 방출 형태를 포함한다.

[0215] 비경구 투여 (예를 들면, 주사)에 적합한 제형은 수성 또는 비수성, 등장성, 발열원이 없는 멸균 액체 (예를 들

면, 용액, 현탁액)를 포함하며, 여기서 활성 성분이 용해되거나 현탁되거나 다른 방식으로 제공된다 (예를 들면, 리포솜 또는 기타 미립자). 이러한 액체는 항산화제, 완충제, 방부제, 안정제, 정균제, 현탁제, 증점제, 및 제형을 의도된 수용자의 혈액 (또는 기타 관련 체액)과 등장성으로 만드는 용질과 같은 기타 약제학적으로 허용되는 성분을 추가로 함유할 수 있다. 부형제의 예는, 예를 들어 물, 알코올, 폴리올, 글리세롤, 식물성 오일 등을 포함한다. 이러한 제형에 사용하기에 적합한 등장성 담체의 예는 염화나트륨 주사액, 링거액 또는 젯산 링거 주사액을 포함한다. 유사하게, 용량, 시기 및 반복을 포함하는 특정 투여 요법은 특정 개인 및 해당 개인의 병력은 물론 약동학 (예를 들면, 반감기, 제거율 등)과 같은 경험적 고려 사항에 따라 달라질 것이다.

[0216] 투여 빈도는 치료 과정에 걸쳐 결정 및 조정될 수 있으며, 증식성 또는 종양성 세포의 수 감소, 이러한 신생물성 (neoplastic) 세포의 감소 유지, 신생물성 세포의 증식 감소, 또는 전이 진행 지연을 기초로 한다. 본 발명의 일 구현예에서, 투여량은 잠재적인 부작용 및/또는 독성을 관리하기 위해 조정 또는 약화될 수 있다. 대안적으로, 대상 치료 조성물의 지속된 연속 방출 제형이 적절할 수 있다.

[0217] 당업자는 적절한 투여량이 환자마다 다양할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 최적의 투여량을 결정하는 것은 일반적으로 위험이나 유해한 부작용에 대한 치료 이점 수준의 균형을 유지하는 것을 포함한다. 선택된 투여량 수준은 특정 화합물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 화합물의 배설 속도, 치료 기간, 약물, 화합물 및/또는 기타 병용되는 물질, 상태의 중증도, 환자의 종, 성별, 연령, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 이전 병력에 따라 달라질 수 있다. 화합물의 양과 투여 경로는 궁극적으로 의사, 수의사 또는 임상사의 재량에 달려 있지만 일반적으로 투여량은 작용 부위에서 실질적으로 유해하거나 유해한 부작용 없이 원하는 효과를 위한 국소 농도를 달성하도록 선택된다.

[0218] 일반적으로, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 다양한 범위로 투여될 수 있다. 다양한 범위는 용량당 약 5 $\mu$ g/kg 체중 내지 약 100mg/kg 체중; 용량당 약 50 $\mu$ g/kg 체중 내지 약 5mg/kg 체중; 용량당 약 100 $\mu$ g/kg 체중 내지 약 10mg/kg 체중을 포함한다. 다른 범위는 용량당 약 100 $\mu$ g/kg 체중 내지 약 20mg/kg 체중 및 용량당 약 0.5mg/kg 체중 내지 약 20mg/kg 체중을 포함한다. 특정 구현예에서, 투여량은 적어도 약 100 $\mu$ g/kg 체중, 적어도 약 250 $\mu$ g/kg 체중, 적어도 약 750 $\mu$ g/kg 체중, 적어도 약 3mg/kg 체중, 적어도 약 5 mg/kg 체중, 적어도 약 10 mg/kg 체중이다.

[0219] 여하튼, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 바람직하게는 이를 필요로 하는 대상에게 필요에 따라 투여된다. 투여 빈도의 결정은 치료대상의 상태, 치료대상의 연령, 치료대상의 중증도, 치료대상의 일반적인 건강 상태 등을 고려하여 주치의와 같은 당업자에 의해 이루어질 수 있다.

[0220] 본 발명의 일 바람직한 구현예에 있어서, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 포함하는 치료 과정은 수 주 또는 수개월의 기간에 걸쳐 선택된 약물 제품의 다중 투여를 포함할 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 매일, 2일마다, 4일마다, 매주, 10일마다, 2주마다, 3주마다, 매월, 6주마다, 2개월마다, 10주마다 또는 3개월마다 한 번 투여될 수 있다. 이와 관련하여, 투여량이 변경될 수 있거나 환자 반응 및 임상 관행에 기초하여 투여 간격이 조정될 수 있음이 이해될 것이다.

[0221] 투여량 및 요법은 또한 1회 이상의 투여를 받은 개체에서 개시된 치료 조성물에 대해 경험적으로 결정될 수 있다. 예를 들어, 개인에게 본 명세서에 기재된 바와 같이 생성된 치료 조성물의 증분 투여량이 제공될 수 있다. 본 발명의 선택된 일 구현예에 있어서, 투여량은 각각 경험적으로 결정되거나 관찰된 부작용 또는 독성에 기초하여 점진적으로 증가 또는 감소 또는 감소될 수 있다. 선택된 조성물의 효능을 평가하기 위해, 특정 질병, 장애 또는 상태의 마커를 앞서 기재된 바와 같이 따를 수 있다. 암의 경우 촉진 또는 육안 관찰을 통한 종양 크기의 직접적인 측정, x-선 또는 기타 영상 기술에 의한 종양 크기의 간접적 측정; 종양 샘플의 직접적인 종양 생검 및 현미경 검사에 의해 평가된 개선; 간접 종양 마커 (예를 들어, 전립선암에 대한 PSA) 또는 본 명세서에 기재된 방법에 따라 확인된 종양원성 항원의 측정, 통증 또는 마비의 감소; 종양과 관련된 언어, 시력, 호흡 또는 기타 장애의 개선; 식욕 증가; 또는 허용된 테스트 또는 생존기간 연장에 의해 측정된 삶의 질 증가를 포함한다. 투여량이 개인, 신생물(neoplastic) 상태의 유형, 신생물 상태의 단계, 신생물 상태가 개인의 다른 위치로 전이되기 시작했는지 여부, 및 과거 및 동시 치료의 사용에 따라 다양한 것은 당업자에게 명백할 것이다.

[0222] 비경구 투여 (예를 들어, 정맥내 주사)에 적합한 제형은 약 10 $\mu$ g/ml 내지 약 100mg/ml의 농도로 본 명세서에 개시된 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 포함할 것이다. 본 발명의 선택된 일 구현예에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 부위의 농도는 20 $\mu$ g/ml, 40 $\mu$ g/ml, 60 $\mu$ g/ml, 80 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml, 300 $\mu$ g/ml, 400 $\mu$ g/ml, 500 $\mu$ g/ml, 600 $\mu$ g/ml, 700 $\mu$ g/ml, 800 $\mu$ g/ml, 900 $\mu$ g/ml 또는 1mg/ml을 포함한다. 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 부위의 농도는 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 8 mg/ml, 10

mg, 12 mg/ml, 14 mg/ml, 16 mg/ml, 18 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml, 50mg/ml, 60mg/ml, 70mg/ml, 80mg/ml, 90mg/ml 또는 100mg/ml을 포함할 것이다.

**[0223] V. 적용 (application)/표시 (indication)**

**[0224]** 본 명세서에 개시된 항체, 항체 조성물 및 방법은, 예를 들어 CD47의 검출 또는 면역 반응의 향상을 포함하는 수많은 시험관내 및 생체내 유용성을 갖는다. 예를 들어, 이들 분자는 다양한 상황에서 면역력을 향상시키기 위해 배양된 세포, 시험관내 또는 생체의, 또는 인간 대상에, 예를 들어 생체내, 투여될 수 있다. 면역 반응은 조절될 수 있으며, 예를 들어 증강, 자극 또는 상향 조절될 수 있다.

**[0225]** 예를 들어, 대상은 면역 반응의 증강이 필요한 인간 환자를 포함한다. 상기 방법은 면역 반응 (예를 들어, T-세포 매개 면역 반응)을 증가시킴으로써 치료될 수 있는 장애를 갖는 인간 환자를 치료하는데 특히 적합하다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 생체내 암의 치료에 특히 적합하다. 항원-특이적 면역력 향상을 위해, 항-CD47 항체는 관심 항원 또는 치료될 대상(예를 들어, 종양 보유 또는 바이러스 보유 대상)에 이미 존재하는 항원과 함께 투여될 수 있다. CD47에 대한 항체를 다른 약제와 함께 투여하는 경우, 두 가지를 순서대로 또는 동시에 투여할 수 있다.

**[0226]** 본 발명은 항체 또는 그의 부분과 인간 CD47 사이에 복합체를 형성할 수 있는 조건에서 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 인간 단일 클론 항체 또는 그의 항원 결합 부위를, 샘플 및 대조군 샘플과 접촉시키는 단계를 포함하는 샘플 내의 인간 CD47 항원의 존재를 검출하거나 인간 CD47 항원의 양을 측정하는 방법을 추가로 제공한다. 그런 다음, 복합체의 형성이 검출되며, 상기 대조군 샘플과 비교한 샘플 간의 복합체 형성의 차이는 샘플 내의 인간 CD47 항원의 존재를 나타낸다. 더욱이, 본 명세서에 개시된 항-CD47 항체는 면역친화성 정제를 통해 인간 CD47을 정제하는데 사용될 수 있다.

**[0227] 암을 포함한 장애 치료**

**[0228]** 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 치료적 유효량의 본 발명 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 치료를 필요로 하는 대상 (예를 들어, 인간)에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 장애 또는 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 장애 또는 질병은 증식성 장애 (예를 들어, 암)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 장애는 암일 수 있다.

**[0229]** 악성이든 양성이든, 원발성이든 속발성이든 다양한 암이 본 명세서 개시내용에 의해 제공된 방법으로 치료되거나 예방될 수 있다. 암은 고형 종양 또는 혈액암일 수 있다. 이러한 암의 예로는 기관지 암종 (bronchogenic carcinoma) (예를 들면, 비소세포 폐암 (non-small cell lung cancer), 편평 세포 암종 (squamous cell carcinoma), 소세포 암종 (small cell carcinoma), 대세포 암종 (large cell carcinoma) 및 선암종 (adenocarcinoma)), 폐포 세포 암종 (alveolar cell carcinoma, 기관지 선종 (bronchial adenoma), 연골종 과오종 (chondromatous hamartoma) (비암성), 및 육종 (sarcoma) (암성) 과 같은 폐암; 점액종 (myxoma), 섬유종 (fibromas) 및 횡근근종 (rhabdomyomas)과 같은 심장암; 골연골종 (osteochondromas), 연골종 (condromas), 연골모세포종 (chondroblastomas), 연골점액성 섬유종 (chondromyxoid fibromas), 골성 골종 (osteoid osteomas), 거대 세포 종양 (giant cell tumors), 연골육종 (chondrosarcoma), 다발성 골수종 (multiple myeloma), 골육종 (osteosarcoma), 섬유육종 (fibrosarcomas), 악성 섬유성 조직구종 (malignant fibrous histiocyctomas), 유잉 종양 (Ewing's tumor, Ewing's sarcoma), 그물 세포 육종 (reticulum cell sarcoma)과 같은 골암; 신경교종 (gliomas) (예를 들면, 다형성 교모세포종 (glioblastoma multiforme)), 역형성 성상세포종 (anaplastic astrocyctomas), 성상세포종 (astrocyctomas), 희소돌기아교종 (oligodendrogliomas), 수모세포종 (medulloblastomas), 척색종 (chordoma), 신경초종 (Schwannomas), 뇌실막종 (ependymomas), 수막종 (meningiomas), 낭포종 (pituitary adenoma), 송과체종 (pinealoma), 골종 (osteomas), 혈관모세포종 (hemangioblastomas), 머리인두종 (craniopharyngiomas), 척색종 (chordomas), 배세포종 (germinomas), 기형종 (teratomas), 유피포낭 (dermoid cysts), 및 혈관종 (angiomas)과 같은 뇌암; 결장암 (colon cancer), 평활근종 (leiomyoma), 표피양 암종 (epidermoid carcinoma), 선암종 (adenocarcinoma), 평활근육종 (leiomyosarcoma), 위 선암종 (stomach adenocarcinomas), 장 지방종 (intestinal lipomas), 장 신경섬유종 (intestinal neurofibromas), 장 섬유종 (intestinal fibromas), 대장 폴립 (polyps in large intestine) 및 결장직장암 (colorectal cancers)과 같은 소화기 계통의 암; 간세포 선종 (hepatocellular adenomas), 혈관종 (hemangioma), 간세포 암종 (hepatocellular carcinoma), 섬유층상 암종 (fibrolamellar carcinoma), 담관암종 (cholangiocarcinoma), 간모세포종 (hepatoblastoma) 및 혈관육종 (angiosarcoma)과 같은 간암; 신장 선암종 (kidney adenocarcinoma), 신세포 암종 (renal cell carcinoma), 신우신종 (hypernephroma) 및 신우의 이행 세

포 암종 (transitional cell carcinoma of the renal pelvis)과 같은 신장암; 방광암; 예를 들어 급성 림프구성 (림프모구) 백혈병 (acute lymphocytic (lymphoblastic) leukemia), 급성 골수성 (골수구성, 골수성, 골수아세포, 골수단핵구) 백혈병 (acute myeloid (myelocytic, myelogenous, myeloblasts, myelomonocytic) leukemia), 만성 림프구성 백혈병 (예를 들어, 세자리 증후군 및 모세포 백혈병) (chronic lymphocytic leukemia (e.g., Sezary syndrome and hairy cell leukemia)), 만성 골수성 백혈병 (chronic myelocytic (myeloid, myelogenous, granulocytic) leukemia), 호지킨림프종 (Hodgkin's lymphoma), 비호지킨 림프종 (non-Hodgkin's lymphoma), B 세포 림프종 (B cell lymphoma), 균상식육종 (mycosis fungoides) 및 골수증식성 장애 (진성적혈구증가증, 골수섬유증, 혈소판증가증 및 만성 골수성 백혈병과 같은 골수증식성 장애 포함) (myeloproliferative disorders (including myeloproliferative disorders such as polycythemia vera, myelofibrosis, thrombocythemia, and chronic myelocytic leukemia))와 같은 혈액암; 기저 세포 암종 (basal cell carcinoma), 편평 세포 암종 (squamous cell carcinoma), 흑색종 (melanoma), 카포시 육종 (Kaposi's sarcoma) 및 파제트병 (Paget's disease)과 같은 피부암; 두경부암; 망막모세포종 (retinoblastoma) 및 안구내 흑색암종 (intraocular melanocarcinoma)과 같은 눈 관련 암; 양성 전립선 비대증 (benign prostatic hyperplasia), 전립선암 및 고환암 (예를 들어, 정액종, 기형종, 배아 암종 및 용모막암종 (seminoma, teratoma, embryonal carcinoma, and choriocarcinoma))과 같은 남성 생식계 암; 유방암; 자궁암 (자궁내막암), 자궁경부암 (자궁경부암), 난소암 (난소암), 외음부암, 질암, 나팔관암, 포상암 (hydatidiform mole) 등의 여성 생식기암; 갑상선암 (유두암, 여포암, 역형성암 (anaplastic) 또는 수질암 포함); 갈색세포종 (pheochromocytomas) (부신); 부갑상선의 비암성 성장; 췌장암; 및 백혈병, 골수종, 비호지킨 림프종 및 호지킨 림프종과 같은 혈액암을 포함한다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 암은 결장암이다.

[0230] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 암의 예시에는 경도/여포성 비호지킨 림프종 (non-Hodgkin's lymphoma, NHL)을 포함하는 B세포 림프종; 소림프구성 NHL (small lymphocytic (SL) NHL); 중등도/여포성 NHL(intermediate grade/follicular NHL); 중급 확산 NHL (intermediate grade diffuse NHL); 고도 면역모세포 NHL (high grade immunoblastic NHL); 고도 림프모구 NHL (high grade lymphoblastic NHL); 고도 소형 비절단 세포 NHL (high grade small non-cleaved cell NHL); 부피가 큰 질병 NHL (bulky disease NHL); 외투 세포 림프종 (mantle cell lymphoma); AIDS 관련 림프종 (AIDS-related lymphoma); 및 발덴스트롬 거대 글로블린 혈증 (Waldenstrom's Macroglobulinemia); 만성 림프구성 백혈병 (chronic lymphocytic leukemia, CLL); 급성 림프구성 백혈병 (acute lymphoblastic leukemia, ALL); 헤어리 세포 백혈병 (Hairy cell leukemia); 만성 골수성 백혈병 (chronic myeloblastic leukemia); 및 이식 후 림프증식성 장애 (post-transplant lymphoproliferative disorder, PTLD), 식세포종과 관련된 비정상적인 혈관 증식, 부종 (뇌종양과 관련된 부종), B세포 증식성 장애 (B-cell proliferative disorder), 및 메이그 증후군 (Meigs' syndrome)이 포함되나, 이에 한정되지는 않는다. 더 구체적인 예시에는 재발성 또는 불응성 NHL (relapsed or refractory NHL), 전선 경도 NHL (front line low grade NHL), 3/4기 NHL, 화학요법 내성 NHL, 전구체 B 림프구성 백혈병 및/또는 림프종, 소림프구성 림프종, B 세포 만성 림프구성 백혈병 및/또는 전림프구성 백혈병 및/또는 소림프구성 림프종, B 세포 전림프구성 림프종, 면역세포종 및/또는 림프형질구성 림프종, 림프형질구성 림프종 (lymphoplasmacytic lymphoma), 변연부 B 세포 림프종 (marginal zone B-cell lymphoma), 비장 변연부 림프종 (splenic marginal zone lymphoma), 림프절 외 변연부-MALT 림프종 (extranodal marginal zone-MALT lymphoma), 결절 변연부 구역 림프종(nodal marginal zone lymphoma), 헤어리 세포 백혈병 (hairy cell leukemia), 형질세포종 (plasmacytoma) 및/또는 형질 세포 골수종 (plasma cell myeloma), 경도/여포성 림프종, 중등도/여포성 NHL, 외투 세포 림프종, 여포 중심 림프종 (여포성), 중등도 분산 NHL (intermediate grade diffuse NHL), 분산 거대 B-세포 림프종 (diffuse large B-cell lymphoma), 공격적인 NHL (공격적인 최전선 NHL 및 공격적인 재발성 NHL 포함) (aggressive NHL (including aggressive front-line NHL and aggressive relapsed NHL)), 자가 줄기 세포 이식 후 또는 불응성 인 NHL(NHL relapsing after or refractory to autologous stem cell transplantation), 1차 종격 거대 B 세포 림프종 (primary mediastinal large B-cell lymphoma), 원발성 삼출성 림프종 (primary effusion lymphoma), 고도 면역모세포 NHL, 고도 림프모구 NHL, 고도 소형 비절단 세포 NHL, 부피가 큰 질병 NHL, 버킷 림프종 (Burkitt's lymphoma), 전구체 (말초) 거대 과립 림프구성 백혈병, 균상 식육종 (mycosis fungoides) 또는 세자리 증후군 (Sezary syndrome), 피부 림프종, 역형성 대세포 림프종, 혈관 중심성 림프종이 포함되나, 이에 한정되지는 않는다.

[0231] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 암의 예시에는 림프종 (예를 들어, B-세포 비호지킨 림프종 (NHL)) 및 림프구성 백혈병이 추가로 포함되지만, 이에 한정되지 않으며, B-세포 증식성 장애가 추가로 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 이러한 림프종 및 림프구성 백혈병에는, 예를 들어 다음이 포함된다. a) 여포성 림프종, b) 작은 비

절단 세포 림프종/버킷 림프종 (풍토성 버킷 림프종, 산발성 버킷 림프종 및 비버킷 림프종 포함) (Small Non-Cleaved Cell Lymphomas/ Burkitt's lymphoma (including endemic Burkitt's lymphoma, sporadic Burkitt's lymphoma and Non-Burkitt's lymphoma)), c) 변연부 림프종 (비결절 변연부 B 세포 림프종 (점막 관련 림프종, Mucosa-associated lymphatic tissue lymphomas, MALT), 결절 변연부 B 세포 림프종, 및 비장 변연부 림프종 포함), d) 외투 세포 림프종 (Mantle cell lymphoma, MCL), e) 대세포 림프종 (B 세포 분산 대세포 림프종 (diffuse large cell lymphoma, DLCL), 분산 혼합 세포 림프종 (Diffuse Mixed Cell Lymphoma), 면역모세포 림프종, 원발성 종격 B-세포 림프종, 혈관 중심성 림프종-폐 B세포 림프종 포함), f) 헤어리 세포 백혈병, g) 림프구성 림프종, 발덴스트롬 거대글로불린혈증 (Waldenstrom's macroglobulinemia), h) 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL)/소림프구성 림프종 (SLL), B 세포 전림프구성 백혈병, i) 형질 세포 종양 (plasma cell neoplasm), 형질 세포 골수종, 다발성 골수종, 형질세포종, 및/또는 j) 호지킨병.

[0232] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 장애는 자가면역 질환이다. 항체 또는 그의 항원 결합 부위로 치료될 수 있는 자가면역 질환의 예는 자가면역 뇌척수염, 홍반성 루푸스, 및 류마티스 관절염을 포함한다. 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 또한 감염성 질환, 염증성 질환 (예를 들어, 알레르기성 천식) 및 만성 이식편대숙주 질환을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다.

[0233] **면역 반응의 자극**

[0234] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 또한 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 대상에 투여하여 대상에서의 면역 반응을 향상시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 대상은 포유류이다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 대상은 인간이다.

[0235] 본 명세서의 용어 "면역 반응 증진" 또는 그 문법적 변형은 포유동물의 면역 체계의 반응을 자극, 유발, 증가, 개선 또는 증대시키는 것을 의미한다. 면역 반응은 세포 반응 (즉, 세포 매개, 예를 들어 세포독성 T 림프구 매개) 또는 체액성 반응 (즉, 항체 매개 반응)일 수 있으며, 1차 또는 2차 면역 반응일 수 있다. 면역 반응 증진의 예로는 CD4+ 헬퍼 T 세포 활성화 증가 및 세포용해성 T 세포 생성이 있다. 면역 반응의 증진은 세포독성 T 림프구 분석, 사이토카인의 방출 (예를 들어, IL-2 생산 또는 IFN- $\gamma$  생산), 종양 퇴행, 종양 보유 동물의 생존, 항체 생산, 면역 세포 증식, 세포 표면 마커의 발현 및 세포독성의 분석과 같은 당업자에게 공지된 다수의 시험 관내 또는 생체내 측정 방법을 사용하여 평가할 수 있으나 이에 한정되지는 않는다. 전형적으로, 본 발명의 방법은 치료되지 않은 포유동물, 또는 본 명세서에 개시된 방법으로 치료되지 않은 포유동물과 비교할 때 포유동물의 면역 반응을 향상시킨다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 미생물 병원체 (예를 들면, 바이러스)에 대한 인간의 면역 반응을 증진시키는 데 사용된다. 또 다른 일 구현예에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 백신에 대한 인간의 면역 반응을 향상시키는 데 사용된다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 방법은 세포 면역 반응, 특히 세포독성 T 세포 반응을 향상시킨다. 또 다른 실시양태에서, 세포 면역 반응은 T 헬퍼 세포 반응이다. 본 발명의 또 다른 일 구현예에 있어서, 면역 반응은 사이토카인 생산, 특히 IFN- $\gamma$  생산 또는 IL-2 생산이다. 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 미생물 병원체 (예를 들면, 바이러스) 또는 백신에 대한 인간의 면역 반응을 향상시키는 데 사용될 수 있다.

[0236] 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 단독 요법으로서 단독으로 사용될 수 있거나, 또는 화학 요법 또는 방사선 요법과 병용하여 사용될 수 있다.

[0237] **화학 요법과 병용**

[0238] 항체 또는 그의 항원 결합 부위는 항암제, 세포독성제 또는 화학요법제와 병용하여 사용될 수 있다.

[0239] 본 명세서의 용어 "항암제" 또는 "항증식제"는 암과 같은 세포 증식성 장애를 치료하는 데 사용할 수 있는 모든 제제를 의미하며, 세포독성제, 세포증식억제제, 항혈관신생제, 용적축소제, 화학요법제, 방사선요법 및 방사선요법제, 표적 항암제, BRM, 치료 항체, 암 백신, 사이토카인, 호르몬 요법, 방사선 요법 및 항-전이제 및 면역요법제를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 상기 논의된 바와 같은 선택된 일 구현예에 있어서, 이러한 항암제는 접합체를 포함할 수 있고 투여 전에 개시된 부위-특이적 항체와 관련될 수 있음이 이해될 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명의 일 구현예에서 선택된 항암제는 조작된 항체의 짝을 이루지 않은 시스템에 연결되어 본 명세서에 기재된 조작된 접합체를 제공할 것이다. 따라서, 이러한 조작된 접합체는 본 명세서의 범위 내에 있는 것으로 명시적으로 고려된다. 본 발명의 다른 일 구현예에 있어서, 개시된 항암제는 상기 기재된 바와 같은 상이한 치료제를 포함하는 부위 특이적 접합체와 병용하여 제공될 것이다.

[0240] 본 명세서의 용어 "세포독성제"는 세포에 독성이 있고 세포의 기능을 감소 또는 억제하고/하거나 세포의 파괴를

유발하는 물질을 의미한다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 물질은 살아있는 유기체로부터 유래된 자연 발생 분자이다. 세포독성제의 예시에는 박테리아의 소분자 독소 또는 효소 활성 독소 (예를 들면, 디프테리아 독소, 슈도모나스 내독소 및 외독소 (Pseudomonas endotoxin and exotoxin), 포도상구균 장독소 A), 진균 (예를 들면, α-사르신 (α-sarcin), 레스트릭토신 (restrictocin)), 식물 (예를 들면, 아브린 (abrin), 리신 (ricin), 모데신 (modeccin), 비스큐민 (viscumin), 포케위드 항바이러스 단백질 (pokeweed anti-viral protein), 사포린 (saporin), 젤로닌 (gelonin), 모모리딘 (momoridin), 트리코산틴, 보리 독소, 아루리트 포디 단백질 (Aleurites fordii proteins), 디안틴 단백질 (dianthin protein), 파이토라카 메리카나 (Phytolacca americana) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모마이어드 (Momiaord) 억제제, 커신 (curcin), 크로틴 (crotin), 사포나리아 오피시날리스 (saponaria officinalis) 억제제, 젤로닌 (gelonin), 미테젤린 (mitegellin), 레스트릭토신 (restrictocin), 페노마이신 (phenomycin), 네오마이신 (neomycin) 및 트리코테센 (tricothecene)) 또는 동물(예를 들면, 세포독성 RNase, 예를 들어 세포외 채장 RNase, DNase I, 그의 단편 및/또는 변이체 포함)

[0241]

본 명세서에 개시된 목적을 위해, "화학요법제"는 암 세포의 성장, 증식 및/또는 생존을 비특이적으로 감소시키거나 억제하는 화학적 화합물을 포함한다 (예를 들어, 세포독성제 또는 세포증식억제제). 이러한 화학 작용제는 종종 세포 성장 또는 분열에 필요한 세포 내 과정으로 유도되므로, 따라서 일반적으로 빠르게 성장하고 분열하는 암 세포에 특히 효과적이다. 예를 들어, 빈크리스틴 (vincristine)은 미세소관을 탈중합시켜 세포가 유사분열에 들어가는 것을 억제한다. 일반적으로, 화학요법제는 암세포 또는 암이 될 가능성이 있는 세포 또는 종양원성 자손 (예를 들어, TIC)을 생성할 가능성이 있는 세포를 억제하거나 억제하도록 설계된 임의의 화학 제제를 포함할 수 있다. 이러한 제제는 종종 투여되며, 예를 들어 CHOP 또는 FOLFIRI와 같은 요법과 병용하는 것이 가장 효과적인 경우가 많다.

[0242]

본 명세서에 개시된 부위 특이적 컨스트럭트와 병용하여 사용될 수 있는 항암제 (부위 특이적 접합체의 성분으로서 또는 비접합 상태로)의 예는 알킬화제 (alkylating agents), 알킬 설포네이트 (alkyl sulfonates), 아지리딘 (aziridines), 에틸렌이민 (ethylenimines) 및 메틸아멜라민 (methylamelamines), 아세토게닌 (acetogenins), 캄프토테신 (camptothecin), 브리오스타틴 (bryostatins), 칼리스타틴 (callystatin), CC-1065, 크립토포신 (cryptophycins), 돌라스타틴 (dolastatin), 듀오카르마이신 (duocarmycin), 엘레우테로빈 (eleutherobin), 판크라티스타틴 (pancratistatin), 사르코딕틴 (sarcodictyin), 스폰지스타틴 (spongistatin), 니트로젠 머스타드 (nitrogen mustards), 항생제 (antibiotics), 엔디인 항생제 (enediynes), 다이네미신 (dynemicin), 비스포스포네이트 (bisphosphonates), 에스페라미신 (esperamicin), 크로모프로테인 엔디인 안티바이오틱 크로모포어 (chromoprotein enediynes antiobiotic chromophores), 아클라시노마이신 (aclacinomysins), 악티노마이신 (actinomycin), 아우트라마이신 (authramycin), 아자세린 (azaserine), 블레오마이신 (bleomycins), 카티노마이신 (cactinomycin), 카라비신 (carabicin), 카르미노마이신 (carminomycin), 카르지노필린 (carzinophilin), 크로모마이신 (chromomycin), 닥티노마이신 (dactinomycin), 다우노루비신 (daunorubicin), 데토루비신 (detorubicin), 6-디아조-5-옥소-L-노르류신 (6-diazo-5-oxo-L-norleucine), 아드리아마이신 (ADRIAMYCIN), 독소루비신 (doxorubicin), 에피루비신 (epirubicin), 에소루비신 (esorubicin), 이다루비신 (idarubicin), 마르셀로마이신 (marcellomycin), 미토마이신 (mitomycins), 마이코페놀산 (mycophenolic acid), 노갈라마이신 (nogalamycin), 올리보마이신 (olivomycins), 페플로마이신 (peplomycin), 포트피로마이신 (potfiromycin), 퓨로마이신 (puromycin), 케라마이신 (quelamycin), 로도루비신 (rodorubicin), 스트렙토니그린 (streptonigrin), 스트렙토조신 (streptozocin), 투베르시딘 (tubercidin), 우베니멕스 (ubenimex), 지노스타틴 (zinostatin), 조루비신 (zorubicin); 항대사물질 (anti-metabolites), 에를로티닙 (erlotinib), 베무라페닙 (vemurafenib), 크리조티닙 (crizotinib), 소라페닙 (sorafenib), 이브루티닙 (ibrutinib), 엔잘루타미드 (enzalutamide), 엽산 유사체, 퓨린 유사체, 안드로젠, 안티아드레날 (anti-adrenals), 프롤린산 같은 엽산 보충제, 아세글라톤 (aceglatone), 알도포스포미드 글리코사이드 (aldophosphamide glycoside), 아미노레볼린산 (aminolevulinic acid), 에닐루라실 (eniluracil), 암사크린 (amsacrine), 베스트라부실 (bestrabucil), 비산트렌 (bisantrene), 에다트랙세이트 (edatrexate), 데포파민 (defofamine), 데메콜신 (demecolcine), 디아지쿠온 (diaziquone), 엘포르니틴 (elfornithine), 엘립티늄 아세테이트 (elliptinium acetate), 에포틸론 (epothilone), 에토글루시드 (etoglucid), 질산갈륨 (gallium nitrate), 하이드록시우레아 (hydroxyurea), 렌티난 (lentinan), 로니다이닌 (lonidainine), 메이탄시노이드 (maytansinoids), 미토구아존 (mitoguazone), 미톡산트론 (mitoxantrone), 모피단몰 (mopidanmol), 니트라에린 (nitraerine), 펜토스타틴 (pentostatin), 페나메트 (phenamet), 피라루비신 (pirarubicin), 로소산트론 (losoxantrone), 포도필린산 (podophyllinic

acid), 2-에틸히드라지드 (2- ethylhydrazide), 프로카바진 (procarbazine), PSK<sup>®</sup> 다당류 복합체(JHS Natural Products, Eugene, OR), 라족산 (razoxane); 리족신 (rhizoxin); 시조피란 (sizofiran); 스피로게르마늄 (spirogermanium); 테누아존산 (tenuazonic acid); 트리아지쿠온 (triaziquone); 2,2',2''-트리클로로트리에틸아민 (2,2',2''-trichlorotriethylamine); 트리코테센 (trichothecenes) (특히 T-2 독신, 베라쿠린 A (verracurin A), 로리딘 A (roridin A) and 안귀딘 (anguidine)); 우레탄 (urethan); 빈데신 (vindesine); 다카르바진 (dacarbazine); 만노무스틴 (mannomustine); 미토브로니톨 (mitobronitol); 미토락톨 (mitolactol); 피포브로만 (pipobroman); 가시토신 (gacytosine); 아라비노사이드 (arabinoside)("Ara-C"); 시클로포스파미드 (cyclophosphamide); 티오테파 (thiotepa); 탁소이드 (toxoids), 클로란부실 (chlorambucil); GEMZAR<sup>®</sup> 젬시타빈(GEMZAR<sup>®</sup> gemcitabine); 6-티오구아닌 (6-thioguanine); 메르캅토피린 (mercaptapurine); 메토티렉세이트 (methotrexate); 백금 유사체 (platinum analogs), 빈블라스틴 (vinblastine); 백금; 에토포사이드 (etoposide (VP-16)); 이포스파미드 (ifosfamide); 미톡산트론 (mitoxantrone); 빈크리스틴 (vincristine); NAVELBINE<sup>®</sup> 비노렐빈 (NAVELBINE<sup>®</sup> vinorelbine); 노반트론 (novantrone); 테니포사이드 (teniposide); 데아트렉세이트 (edatrexate); 다우노마이신 (daunomycin); 아미노프테린 (aminopterin); 젤로다 (xeloda); 이반드로네이트 (ibandronate); 이리노테칸 (irinotecan)(Camptosar, CPT-11), 토포이소머라제 억제제 RFS 2000 (topoisomerase inhibitor RFS 2000); 디플루오르메틸로니틴 (difluoromethylornithine); 레티노이드 (retinoids); 카페시타빈 (capecitabine); 콤브레타스타틴 (combretastatin); 류코보린 (leucovorin); 옥살리플라틴 (oxaliplatin); 세포증식을 감소시키는 PKC-alpha, Raf, H-Ras, EGFR 및 VEGF-A의 억제제 및 상기 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산, 또는 유도체를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 또한 이 정의에는 항에스트로젠 및 선택적 에스트로젠 수용체 조절제, 부신에서 에스트로젠 생산을 조절하는 효소 아로마타제 (aromatase)를 억제하는 아로마타제 억제제, 항안드로젠과 같은 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항호르몬제; 뿐만 아니라 트록사시타빈 (1,3- dioxolane nucleoside cytosine 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오타이드, VEGF 발현 억제제 및 HER2 발현 억제제와 같은 리보자임; 백신, PROLEUKIN<sup>®</sup> rIL-2; LURTOTECAN<sup>®</sup> 토포이소머라제 1 억제제; ABARELIX<sup>®</sup> rmRH; 비노렐빈 (vinorelbine) 및 에스페라미신 (esperamicin) 및 상기 임의의 것의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0243] **방사선 요법과 병용**

[0244] 본 발명은 또한 항체 또는 그의 항원 결합 부위와 방사선 요법 (즉, 감마선 조사, X선, UV 조사, 마이크로파, 전자적 방출 등과 같은 암세포 내 DNA 손상을 유도할 수 있는 임의의 메커니즘)을 제공한다. 종양 세포로의 방사성 동위원소의 직접적인 전달을 사용하는 병용 요법이 또한 고려되고, 개시된 접합체는 표적화된 항암제 또는 다른 표적화 수단과 관련하여 사용될 수 있다. 전형적으로, 방사선 요법은 약 1 내지 약 2주의 기간에 걸친 펄스로 적용된다. 방사선 요법은 약 6 내지 7주 동안 두경부암이 있는 대상체에게 적용될 수 있다. 선택적으로, 방사선 요법은 단일 용량 또는 다중 연속 용량으로 적용될 수 있다.

[0245] **VI. 약제학적 팩 및 키트**

[0246] 1 이상의 용량의 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 포함하는 1 이상의 컨테이너를 포함하는 약제학적 팩 및 키트가 또한 제공된다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 단위 투여량이 제공되며, 상기 단위 투여량은 1 이상의 추가 제제의 존재 또는 부재하에, 예를 들어 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 포함하는, 미리 결정된 양의 조성물을 함유한다. 본 발명은 다른 일 구현예에 있어서, 이러한 단위 투여량은 주사용 1회용 사전충전형 주사기로 공급된다. 본 발명의 또 다른 일 구현예에 있어서, 단위 투여량에 함유된 조성물은 염수, 수크로스 등을 포함할 수 있고; 인산염 등과 같은 완충액; 및/또는 안정적인 pH 범위 내에서 체형화될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 일 구현예에 있어서, 조성물은 적절한 액체, 예를 들어 멸균수 또는 식염수, 첨가시 재구성될 수 있는 동결건조된 분말로서 제공될 수 있다. 본 발명의 바람직한 일 구현예에 있어서, 조성물은 수크로스 및 아르기닌을 포함하지만 이에 한정되지 않는 단백질 응집을 억제하는 1 이상의 물질을 포함한다. 컨테이너 위 또는 이와 관련된 라벨은 동봉된 접합체 조성물이 선택한 종양 질환 상태를 치료하는 데 사용됨을 나타낸다.

[0247] 본 발명은 또한 항체의 단일-용량 또는 다중-용량 투여 단위 및 선택적으로 1 이상의 항암제를 생산하기 위한 키트를 제공한다. 키트는 컨테이너와 컨테이너 위 또는 컨테이너와 관련된 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 적합한 컨테이너는 예를 들어 병, 바이알, 주사기 등을 포함한다. 컨테이너는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로 형성될 수 있고 약제학적 유효량의 개시된 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 함유할 수 있다. 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 컨테이너는 멸균 접근 포트 (sterile access port)를 포함한다 (예를

들어, 컨테이너는 정맥내 용액 백 또는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 바이알일 수 있다). 이러한 키트는 일반적으로 적절한 용기에 항체의 약제학적으로 허용되는 제형 및 선택적으로 동일하거나 상이한 컨테이너에 1 이상의 항암제를 포함할 수 있다. 키트는 또한 진단 또는 병용 요법을 위해 다른 약제학적으로 허용되는 제형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 항체 또는 그의 항원-결합 부위 이외에, 이러한 키트는 화학요법 또는 방사선요법 약물과 같은 다양한 항암제; 항혈관신생제; 항전이제; 표적항암제; 세포독성제; 및/또는 기타 항암제를 포함할 수 있다.

[0248] 보다 구체적으로 키트는 추가 성분이 있거나 없는, 개시된 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 포함하는 단일 컨테이너를 가지거나, 각각의 원하는 제제에 대해 별개의 컨테이너를 가질 수 있다. 대안적으로, 키트의 항체 및 임의의 선택적 항암제는 환자에게 투여하기 전에 별개의 컨테이너 내에서 별도로 유지될 수 있다. 키트는 주사용 정균수 (bacteriostatic water for injection, BWFI), 인산완충식염수 (phosphate-buffered saline, PBS), 링거액 (Ringer's solution) 및 텍스트로스 용액과 같은 살균된 약제학적으로 허용되는 완충제 또는 기타 희석제를 함유하기 위한 제2/제3 컨테이너 수단을 또한 포함할 수 있다.

[0249] 키트의 성분이 1 이상의 액체 용액으로 제공되는 경우, 액체 용액은 바람직하게는 수용액이고, 멸균 수용액 또는 식염수 용액이 특히 바람직하다. 그러나 키트의 구성 요소는 건조 분말로 제공될 수 있다. 시약 또는 구성 요소가 건조 분말로 제공되는 경우 적절한 용매를 추가하여 분말을 재구성할 수 있다. 용매는 또한 다른 컨테이너에 제공될 수 있다.

[0250] 위에 간략히 표시된 바와 같이 키트는 또한 항체 또는 그의 항원 결합 부위 및 임의의 선택적 성분을 환자에게 투여하기 위한 수단, 예를 들면 1 이상의 바늘, I.V. 백 또는 주사기, 또는 점안기 (eye dropper), 피펫 또는 기타 유사한 장치를 포함할 수 있으며, 이로부터 제형을 동물에 주사 또는 도입하거나 신체의 병든 부위에 도포할 수 있다. 본 명세서에 개시된 키트는 또한 전형적으로 바이알 등 및 상업적 판매를 위해 밀폐된 다른 구성요소, 예를 들어 원하는 바이알 및 기타 부품이 그 안에 배치된 주사 또는 취입 성형된 플라스틱 용기를 포함하기 위한 수단을 포함할 것이다.

[0251] 다음 약어는 본 명세서 전체에 걸쳐 사용된다.

약어	전체 명칭
CD47	분화 클러스터 47 (Cluster of differentiation 47)
SIRP $\alpha$	신호조절 단백질 $\alpha$ (Signal regulatory protein alpha)
ECD	세포 외 도메인 (Extra-cellular domains)
BMK	벤치마크 (Benchmark)
BMK1	W345-BMK1.uIgG4PE.K 또는 CC-90002
BMK2	W345-BMK2 또는 W345-BMK2.uIgG4.SP 또는 Hu5F9-G4
BMK4	W345-BMK4.uIgG4.SP 또는 2.3D11-IgG4
BMK8	W345-BMK8, 13H3 또는 TJ-C4
PBMC	말초 혈액 단핵구 세포 (Peripheral Blood Mononuclear Cell)
HA	혈구 응집 활성도 (Hemagglutination Activity)
ADCC	항체-의존 세포-매개 세포독성 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)
CDC	보체 의존 세포독성 (Complement dependent cytotoxicity)
DSF	차동 스캔 형광 측정 (Differential scanning fluorimetry)
M-CSF	대식세포 증식 자극인자 (Macrophage Colony-Stimulating Factor)
LDH	락테이트 탈수소효소 (Lactate dehydrogenase)
PBST	0.05% (v/v) Tween 20 과 식염수로 완충된 인산염 (Phosphate buffered saline with 0.05% (v/v) Tween 20)
TMB	테트라메틸벤지딘 (Tetramethylbenzidine)
ELISA	효소-결합면역흡착측정 (Enzyme-linked immuno sorbent assay)
FACS	형광-활성 세포 분류 (Fluorescence-activated cell sorting)

[0252]

[0253] 서열 목록 요약

[0254] 본 명세서에는 주요 항체 W3455-4.9.9-uIgG4.SPL (또한 "W3455 항체"로 약칭됨)의 핵산 및 아미노산 서열을 포함하는 서열 목록이 첨부되어 있다. 다음 표 A, B 및 C는 포함된 서열의 요약을 제공한다.

[0255] 표 A. CDR 아미노산 서열

	CDR1	CDR2	CDR3
VH	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3
	GFTFSNFAMS	TISASGGRTFYADSVKG	EGSFGEGVDP
VL	서열번호 4	서열번호 5	서열번호 6
	SGDALPKKYAY	EDNKRPS	YSTDISGNHWW

[0256]

[0257] 표 B. 가변영역 서열

VH	VL
서열번호 7	서열번호 8
EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSNFAMSVVRQ APGKGLEWVSTISASGGRTF YADSVKGRITISRDNKNTL FLQMNGLRAEDTAVYYCAK EGSFGEGVDPWGQGLVTV SS	SYEMTQPPSVSVSPGQTARITCS GDALPKKYAYWYQQKSGQAPV LVIYEDNKRPSGIPERFSGSSSGT MATLTISGAQVEDEADYYCYST DISGNHWWVFGGGTELTVL
<b>VH<sub>im</sub></b> (중쇄 가변영역 뉴클레오타이드 서열)	<b>VL<sub>im</sub></b> (경쇄 가변영역 뉴클레오타이드 서열)
서열번호 9	서열번호 10
GAAGTGCAGTTGTTGGAGT CTGGGGGAGGCTTGGTACA GCCTGGGGGGTCCCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTG GATTCACCTTTAGCAACTT TGCCATGAGCTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGG CTGGAGTGGGTCTCAACTA TTAGTGCTAGTGGTGGTCG GACATTCTACGCAGACTCC GTGAAGGGCCGATCACCA TCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTTTCTGCAA ATGAATGGCCTGAGAGCCG AGGACACGGCCGTCTATTA CTGTGCGAAGGAGGGGTCG TTCGGGGAGGGAGTCGACC CCTGGGGCCAGGGAACCTT GGTCACCGTGTCTCA	TCCTATGAGATGACACAGCCA CCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAG GACAAACGGCCAGGATCACCT GCTCTGGAGATGCATTGCCAA AAAAATATGCTTATTGGTACCA GCAGAAGTCAGGCCAGGCCCC TGTGCTGGTCATCTATGAGGAC AACAAACGACCCTCAGGGATC CCTGAGAGATTCTCTGGCTCCA GCTCAGGGACAATGGCCACCT TACTATCAGTGGGGCCAGG TGGAGGATGAAGCTGACTACT ACTGTTACTCAACAGACATCAG TGGAATCATTGGGTGTTCCGGC GGAGGGACCGAGCTGACCGTC CTA

[0258]

[0259] 표 C. 중쇄 및 경쇄의 전장 서열

중쇄	경쇄
서열번호 11	서열번호 12
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFAMSWVRQAPGKGLEWVSTISASGGRTFYADSVKGRITISRDNSKNTLFLQMNGLRAEDTAVYYCAKEGSFGEGVDPWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTICNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	SYEMTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSGQAPVLVIYEDNKRPSGIPERFSGSSSGTMAITLISGAQVEDEADYYCYSTDISGNHWVFGGGTELTVLGQPKAAPSVTLPFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSTLPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0260]

[0261] 실시예

[0262] 일반적으로 기재된 본 명세서의 개시내용은 다음 실시예를 참조함으로써 보다 용이하게 이해될 것이며, 실시예는 예시로서 제공되고 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 실시예는 아래의 실험이 수행된 모든 또는 유일한 실험임을 나타내기 위한 것이 아니다.

[0263] 실시예1. 재료 및 벤치마크 항체 및 세포주의 준비

[0264] 1.1 재료 준비

[0265] 실시예에 사용된 상용 재료 및 재료 코드에 대한 정보는 각각 표 1 및 표 2에 기재되어 있다.

표 1

[0266]

재료	제공처	카탈로그번호
제조합 인간 CD47 단백질	Sino Biological	12283-HCCH
인간 SIRP alpha / CD172a 단백질, 마우스 IgG1 Fc Tag (HPLC-verified)	Acribiosystem	SIA-H52A8
제조합 마우스 SIRP alpha 단백질 (His Tag)	Sino Biological	50956- M08H
정제된 항-마우스 CD47 항체	Biologend	127501
제조합 마우스 IAP/OA3/CD47 (C-Fc)	Novoprotein	CM62
제조합 인간 Thrombospondin-1 단백질, CF	R&D	3074-TH
제조합 인간 SIRP alpha 단백질 (His Tag)	Sino Biological	11612-H08H
테트라메틸벤지딘 (Tetramethylbenzidine, TMB)	Sigma	860336-5G
R-PE 고트 항-인간 IgG Fc	Jackson Immuno Research	109-115-098
고트 항-랫 IgG-Fc-HRP	Bethly	A110-236P
고트 항-랫 IgG Fc Alexa647	Jackson Immuno Research	112-606-071
Anti-His Tag 항체 [Biotin]	GenScript	A00613
스트렙타아비딘 (Streptavidin) PE	eBioscience	12-4317
고트 항-인간-IgG-Fc-HRP	Bethyl	A80-304P
마우스 anti-His Tag 항체-HRP	GenScript	A00612
CD14 마이크로비즈, 인간	Miltenyi Biotec	130-050-201
제조합 인간 M-CSF 단백질	R&D Systems	216-MC/CF
CellTrace™ CFSE dye	Life Technologies	C34570
APC 마우스 항-인간 CD14	BD Pharmingen	561708
세포독성 검출 키트 (LDH)	Roche	04744
프로피디움 요오드화물 (Propidium Iodide, PI) 용액	Invitrogen	P3566
라지 (Raji)	ATCC	CCL-86™
Jurkat .2B8	ATCC (Subcloning in TAD)	TIB-152™
CCRF-CEM	ATCC	CCL-119™
A20	ATCC	TIB-208™

표 2

재료 코드	재료명/정보
W345-hPro1.ECD (sino)	항-인간 CD47 단백질
WBP345-hPro1L1.ECD.mFc (Acrobio)	인간 SIRP alpha / CD172a 단백질, 마우스 IgG1 Fc Tag (HPLC-verified)
WBP345-mPro1L1.ECD.His (sino)	재조합 마우스 SIRP alpha 단백질, (His Tag)
WBP345-cAb2 (Biolegend)	정제된 항-마우스 CD47 항체
W345-mPro1.ECD.hFc (novoprotein)	재조합 마우스 IAP/OA3/CD47 (C-Fc)
W345-hPro1L2.His (R&D)	재조합 인간 Thrombospondin-1 단백질, CF
W345-hPro1L1.His (sino)	재조합 인간 SIRP alpha 단백질 (His Tag)
BMK1	CC-90002 from Celgene [6]
BMK2	Hu5F9-G4 from Forty Seven Inc. [5], [7]
BMK4	2.3D11-IgG4 from Surface Oncology [8]
BMK8	13H3 or TJ-C4 from I-MAB [9]

[0267] 1.2 항원의 생산 Fc 태그가 있는 인간 CD47 (NP\_001768.1, NCBI) 및 사이노몰구스 원숭이 CD47(XP\_005548289.1, NCBI) 세포의 도메인 (ECD) 유전자를 발현 벡터에 클로닝하였다. 그 다음, 제조사의 지침 (Expi293F Transfection Kit, Invitrogen)에 따라 플라스미드를 EXpi293 세포에 형질감염시켰다. 세포를 37°C, 8% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하고, 배양 5일 후에 상층액을 수집하였다. 단백질 A 컬럼 및 SEC 컬럼을 사용하여 항원 단백질을 정제하였다.

[0269] 1.3 벤치마크 항체의 생산

[0270] 항-CD47 항체 BMK1, BMK2, BMK4 및 BMK8의 가변 영역을 인코딩하는 DNA 서열 (참고문헌 [5]-[9]에 개시되어 있는 표 2 참조, 전체 내용이 본 명세서에 참조로 인용됨)을 인간 IgG4의 불변 영역과 발현 벡터에 별도로 클로닝하였다. 그 다음, 제조사의 지침 (Expi293F Transfection Kit, Invitrogen)에 따라 플라스미드를 EXpi293 세포에 형질감염시켰다. 세포를 37°C, 8% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하고, 배양 5일 후에 상층액을 수집하였다. 단백질 A 컬럼 및 SEC 컬럼을 사용하여 단백질을 정제하였다.

[0271] 벤치마크 항체 "W345-BMK1.uIgG4PE.K", "W345-BMK2.uIgG4.SP", "W345-BMK4.uIgG4.SPK" 및 W345-BMK8을 생성하고 다음 실시예에서 대조군으로 적용하였다. 본 명세서에서는 이들을 각각 W345-BMK1, W345-BMK2, W345-BMK4 및 BMK8로 지칭하였다.

[0272] 1.4 세포풀/ 세포주의 생성

[0273] 인간 CD47의 전장 유전자 (NP\_001768.1, NCBI) 또는 사이노몰구스 원숭이 CD47의 전장 유전자 (XP\_005548289.1, NCBI)를 세포주 개발을 위해 발현 벡터에 클로닝하였다. 간략하게, 리포펙타민 2000 시약을 사용하여 70-90% 융합률 (confluent)로 CHO-K1 세포를 인간 또는 원숭이 CD47 전장 플라스미드로 형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 인큐베이터에서 배양하였다. 형질감염 24시간 후, 최종 농도 2-10µg/mL의 블라스티시딘 (blasticidin)을 사용하여 안정적인 풀을 선택하였다. 그런 다음, 양성 풀 세포를 제한된 희석 (limited dilution)으로 서브클로닝했다. 단일 클론을 선택하고 항-CD47 항체를 사용하여 FACS로 테스트했다.

[0274] 실시예 2 항체 하이브리도마 생성

[0275] 2.1 동물 면역화 및 혈청 역가 검출 (serum titer detection)

[0276] 4마리의 형질전환 래트를 Ligand에서 구입해 IACUC 승인 동물 시설에 수용했다. 매번 래트당 30-100µg의 인간 CD47 (NP\_942088) 또는 마우스 CD47 (Q61735) 세포의 도메인 (ECD) 단백질 및 CD47 전장 발현 플라스미드를 동물 면역화를 위한 면역원으로 사용하였다. 면역화 전후에 동물로부터 혈청 샘플을 수집하고 표적 단백질에 대한 혈청 역가를 일반적인 ELISA 절차에 따라 ELISA로 테스트하였다.

[0277] 혈청 역가 결과를 표 3에 나타내었다. 훨씬 더 높은 혈청 역가를 갖는 1# 및 2# 래트를 전기-세포 융합을 위해 선택하였다.

**표 3**

혈청 역가 요약

[0278]

	인간 CD47-ECD에 대한 동물 혈청 역가 (ELISA)			
	#1	#2	#3	#4
전-역가(pre-titer)	<100	<100	<100	<100
1 <sup>st</sup> 역가	72900	218700	24300	24300
2 <sup>nd</sup> 역가	656100	1968300	72900	656100

[0279]

**2.2 하이브리도마 생성** 동물을 희생시키고 일반 전기 융합 절차에 따라 전기 융합에 의해 비장 및 림프절의 B 세포를 SP2/0 골수종 세포와 융합시켰다. 세포 융합 후, 세포를 20% FBS 및 1% HAT 선택 시약 (selective reagent)이 보충된 DMEM 배지로 96웰 플레이트에 플레이팅하였다. 플레이트를 37° C, 5% CO<sub>2</sub>의 인큐베이터에서 14일 동안 배양하고 7일과 10일에 2개의 배지를 교체한 다음 다양한 스크리닝을 수행했다.

[0280]

**2.3 하이브리도마 스크리닝 및 서브클로닝**

[0281]

ELISA 및 FACS를 통해 하이브리도마 세포를 인간 CD47 또는 사이노몰구스 원숭이 CD47 단백질에 대해 스크리닝 하였다. CD47 단백질에 결합하는 SIRP α 리간드에 대해 경쟁하는 CD47 항체의 능력을 FACS에 의해 평가하였다. 항체-생산 하이브리도마 세포는 반고체 배지 접근법을 사용하여 서브클로닝되었고, 서브클로닝된 하이브리도마 세포는 전술한 방법을 사용하여 재스크리닝되었다. 일련의 스크리닝 후, 양성 클론 WBP3455-4.9.9가 주요 하이브리도마 클론으로 확인되었고 추가로 완전히 특성화되었다.

[0282]

**2.4 하이브리도마 시퀀싱**

[0283]

리드 클론 WBP3455-4.9.9가 확인되고 시퀀싱되었다. 하이브리도마 세포에서 RNA를 추출하고 5'-RACE 키트를 사용하여 cDNA를 증폭한 후, 3'-변성 프라이머와 3'-어댑터 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후, PCR 단편을 pMD18-T 벡터에 클로닝하여 시퀀싱을 수행했다.

[0284]

WBP3455-4.9.9의 상세한 가변 도메인 아미노산 서열을 표 4에 나타내었다.

**표 4**

가변 도메인 아미노산 서열

[0285]

클론 ID	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3	FW4
WBP3455-4.9.9	VH EVQLLESGGGLV QPGGSLRLS CAAS	GFTFSNFAMS	WVRQAPGKGL EWVS	TISASGGRTFYAD SVKG	RITISKD NSKNTLFLQMN GLRAEDTAVYYCAK	EGSFGEGVDP	WGQG TLVT VSS
	VL SYEMTQPPSVSV SPGQTARITC	SGDALPKKYAY	WYQQKSGQAP VLVIY	EDNKRPS	GIPERFSGSSSGT MATLTISGAQVEDEADYYC	YSTDISGNHWV	FGGG TELT VL

[0286]

**실시예 3 리드 항체 W3455-4.9.9-uIgG4.SPL의 생성** 최종 리드 항체는 오리지널 클론 WBP3455-4.9.9의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 S228P 돌연변이가 있는 인간 IgG4 백본 형식으로 전환하여 구축하고 제조업체의 지침 (Expi293F Transfection Kit, Invitrogen)에 따라 EXpi293 세포에 형질감염되었다. 일시적인 세포의 상층액을 모아 여과한 후, Protein A 컬럼 (GE Healthcare, 175438) 또는 Protein G 컬럼 (GE Healthcare, 170618)을 사용하여 정제 과정을 거쳤다.

[0287]

얻어진 항체를 "W3455-4.9.9-uIgG4.SPL" ("WBP3455-4.9.9-uIgG4.SPL" 또는 "W3455-4.9.9-uIgG4L.SP"와 동일)로 명명하였다. 정제된 항체의 농도는 280 nm에서 흡광도로 측정하였다. 항체 분자량 및 순도는 각각 SDS-PAGE 및 SEC-HPLC에 의해 테스트되었다. 그 다음 사용할 때까지 -80 °C에서 보관하였다.

[0288]

리드 항체의 분자량 및 정제 정보를 표 5에 요약하였다. 리드 항체의 순도는 95% 이상임을 알 수 있다.

**표 5**

mAb	PI	분자량	순도 (%SEC-HPLC)	산출량 (mg/L)	엔도톡신
W3455-4.9.9-uIgG4.SPL	6.3	144	99.62	293	<5 EU/mg

[0289]

[0290]

[0291]

[0292]

[0293]

[0294]

[0295]

[0296]

[0297]

[0298]

[0299]

[0300]

**실시에 4 리드 항체 W3455-4.9.9-uIgG4.SPL의 시험관내 특성화4.1 인간 CD47 단백질에 대한 항체 결합(ELISA)**

CD47 단백질에 대한 리드 항체의 결합은 ELISA에 의해 결정되었다. 96-웰 플레이트를 4° C에서 밤새 1µg/mL의 인간 CD47 ECD 단백질로 코팅하고 1시간 동안 2% BSA-PBS로 차단하였다. 그런 다음 다양한 농도의 리드 항체를 첨가하고 2시간 동안 배양했다. 그 다음 고트 항-인간 IgG-Fc-HRP 2차 항체를 첨가하고 1시간 동안 배양했다. TMB 퍼옥시다제 (TMB peroxidase) 기질 용액을 첨가한 다음, 2M HCl을 사용하여 12분 후에 반응을 중단시켰다. 모든 배양 단계는 실온에서 수행되었고, 플레이트는 단계 사이에 pH 7.4에서 PBST로 5회 세척되었다. 테스트 샘플의 흡광도는 다중벽 플레이트 판독기 (multiwall plate reader) (SpectraMax® M5e)로 450nm에서 측정되었다. 결합 EC<sub>50</sub>은 GraphPad Prism software equation: Nonlinear regression (curve fit) - log (agonist) vs. response -- Variable slope를 사용하여 분석했다.

도 1에 나타난 바와 같이, 결과는 리드 mAb가 높은 친화도로 인간 CD47 ECD 단백질에 결합할 수 있음을 나타내었다. 결합 EC<sub>50</sub> 및 Max OD는 리드 mAb 및 3개의 벤치마크 대조군 간에 유사했다.

**4.2 인간 또는 시노물구스 원숭이 CD47 발현 세포에 대한 항체 결합(FACS)**

인간 CD47 또는 시노물구스 CD47 발현 세포에 대한 리드 항체의 결합을 FACS로 측정하였다. 간단히 말해서, 조작된 CD47-발현 세포를 1x10<sup>5</sup> 세포/웰의 밀도로 96-웰 U-바닥 플레이트에 코팅하고 상층액을 제거하기 전에 4분 동안 4° C에서 1500rpm으로 원심분리했다. 그런 다음 다양한 농도의 리드 항체를 첨가하고 세포를 재현탁하고 4° C에서 1시간 동안 배양했다. 세포를 180 µL 1% BSA-PBS로 두 번 세척했다. 2차 항체인 고트 항-인간 IgG-Fc PE를 첨가하여 세포를 재현탁하고 4° C에서 암실에서 30분 동안 배양한 후 180 µL 1% BSA-PBS로 세척했다. 마지막으로, 세포를 100 µL 1% BSA-PBS로 재현탁하고, 형광 강도를 FACS(BD Canto II)로 측정하고 FlowJo Version 소프트웨어로 분석했다. 결합 EC<sub>50</sub>은 GraphPad Prism software equation: Nonlinear regression (curve fit)-log (agonist) vs. response-Variable slope를 사용하여 계산되었다.

도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, 결과는 리드 mAb가 인간 CD47-발현 세포 및 시노물구스 CD47 발현 세포에 높고 유사한 친화도로 결합할 수 있음을 나타내었다.

**4.3 인간 적혈구에 대한 항체 결합 (FACS)**

CD47이 인간 적혈구(RBC) 상에서 발현되었기 때문에, 인간 RBC에 대한 W3455-4.9.9-uIgG4.SPL의 결합 활성을 FACS로 평가하였다. 시트르산삼나트륨 (trisodium citrate) 처리된 신선한 인간 혈액을 10분 동안 2000rpm에서 원심분리하고 상층 혈청을 버려 인간 적혈구를 분리하였다. 인간 RBC 세포를 1x10<sup>5</sup> 세포/웰의 밀도로 96-웰 U-바닥 플레이트에 코팅하고 상층액을 제거하기 전에 4분 동안 4° C에서 1500rpm으로 원심분리하였다. 그런 다음 다양한 농도의 리드 항체를 첨가하여 세포를 재현탁하고 4° C에서 1시간 동안 배양했다. 세포를 180 µL 1% BSA-PBS로 두 번 세척했다. 2차 항체인 고트 항-인간 IgG-Fc PE를 첨가해 세포를 재현탁하고 4° C 암실에서 30분 동안 배양한 후 180 µL 1% BSA-PBS로 세척했다. 마지막으로, 세포를 100 µL 1% BSA-PBS에 재현탁하고 형광 강도를 FACS (BD Canto II)로 측정하고 FlowJo Version 소프트웨어로 분석했다. 결합 EC<sub>50</sub>은 GraphPad Prism software equation: Nonlinear regression (curve fit)-log (agonist) vs. response-Variable slope를 사용하여 계산되었다.

도 4에서 볼 수 있듯이, 결과는 리드 mAb가 벤치마크 항체에 비해 훨씬 낮은 친화도로 인간 RBC에 결합할 수 있음을 나타냈으며, 이는 임상 시험에서 빈혈 개선에 상당한 이점이 있을 수 있다.

**4.4 인간 RBC 혈구응집 분석 (hemagglutination assay, HA)**

RBC에 대한 W3455-4.9.9-uIgG4.SPL의 혈구응집 활성을 평가하기 위해 인간 적혈구 (hRBC)를 사용하여 HA를 수행했다. 시트르산삼나트륨 처리된 신선한 인간 혈액을 10분 동안 2000rpm에서 원심분리하고 상층 혈청을 버려 에서 인간 적혈구를 분리하였다. DPBS로 희석된 hRBC 현탁액 25uL를 U-바닥 96웰 플레이트에 첨가한 다음(약

$\sim 4 \times 10^6$  RBC/웰), 리드 항체 25 $\mu$ L를 첨가하고 (회색 범위는 667 nM 내지 0.667 nM, 100  $\mu$ g/ml 내지 0.10.1 $\mu$ g/ml 와 동일), 그 다음 부드럽게 잘 혼합하고 37° C에서 1시간 동안 배양했다. RBC를 DPBS에 재현탁하고 현미경으로 검사했다.

[0301] RBC 클러스터의 형성은 도 5 (W345-BMK2)에 표시된 대로 HA 양성으로 정의된 반면, 손상되지 않고 해리 상태로 남아 있는 RBC는 HA 음성 (이소타입 대조군)으로 정의되었다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 결과는 리드 mAb가 첨가된 RBC가 어떠한 RBC 클러스터 형성 없이 온전한 상태 및 해리 상태로 남아 있어서 HA 음성으로 정의된 반면, W345-BMK2.uIgG4.SP는 상당한 RBC 클러스터를 유도하여 혈구응집 양성을 나타냈다.

[0302] **4.5 인간 리간드 경쟁 분석 (ELISA)**

[0303] W3455-4.9.9-uIgG4.SPL의 리간드 (SIRP  $\alpha$ ) 차단 활성을 평가하기 위해 단백질 기반 경쟁 분석을 ELISA로 수행했다. 96-웰 플레이트를 4° C에서 1 $\mu$ g/mL의 인간 CD47 ECD로 오버나잇 코팅하고 1시간 동안 2% BSA-PBS로 차단했다. 다양한 농도의 리드 항체 및 인간 SIRP  $\alpha$  (1  $\mu$ g/ml)의 혼합물을 첨가하고 2시간 동안 배양하였다. 2차 항체 마우스 항-His tag-HRP를 첨가하고 1시간 동안 배양하였다. TMB 퍼옥시다제 (TMB peroxidase) 기질 용액을 첨가하고 2M HCl을 사용하여 12분 후에 반응을 정지시켰다. 모든 배양 단계는 실온에서 수행되었고 플레이트는 단계 사이에 PBST로 세척되었다. 테스트 샘플의 흡광도는 다중벽 플레이트 판독기로 450 nm에서 측정되었다. 경쟁적 결합 IC50은 GraphPad Prism software equation: Nonlinear regression (curve fit)-log (antagonist) vs. response-Variable slope를 사용하여 계산되었다.

[0304] 도 6에 나타낸 바와 같이, 데이터는 리드 mAb가 85% 이상의 억제율로 CD47과 SIRP  $\alpha$  (리간드) 간의 결합 상호작용을 경쟁적으로 차단할 수 있음을 나타냈다. 억제율은 [(OD450<sub>리간드 단독</sub> - OD450<sub>차단 샘플</sub>) / OD450<sub>리간드 단독</sub> x 100%] 방정식을 사용하여 계산되었다.

[0305] **4.6 인간 리간드 경쟁 분석 (FACS)**

[0306] W3455-4.9.9-uIgG4.SPL의 리간드 (SIRP  $\alpha$ ) 차단 활성을 평가하기 위해 인간 CD47-발현 안정 세포 (stable cell)를 사용하여 세포 기반 경쟁 분석을 수행했다. 간단히 말해서, 인간 CD47을 발현하는 조작된 세포를  $1 \times 10^5$  개 세포/웰로 96-웰 U-바닥 플레이트에 코팅하고 상층액을 제거하기 전에 4분 동안 4° C에서 1500rpm으로 원심 분리하였다. 다양한 농도의 리드 mAb와 인간 SIRP  $\alpha$  단백질(1 $\mu$ g/ml)의 혼합물을 첨가하고 2시간 동안 배양했다. 세포를 200  $\mu$ L 1% BSA-PBS로 두 번 세척했다. 2차 항체인 마우스 항-His tag-Biotin을 첨가해 세포를 재현탁하고 4° C 암실에서 1시간 동안 배양한 후 200  $\mu$ L 1% BSA-PBS로 세척했다. 3차 항체인 항-스트렙타비딘-PE를 첨가해 세포를 재현탁하고 4° C에서 암실에서 30분 동안 인큐베이션한 다음 200  $\mu$ L 1% BSA-PBS로 세척했다. 마지막으로, 세포를 100  $\mu$ L 1% BSA-PBS에 재현탁하고 형광 강도를 FACS (BD Canto II)로 측정하고 FlowJo Version 소프트웨어로 분석했다. 경쟁적 결합 IC50은 GraphPad Prism software equation: Nonlinear regression (curve fit)-log (antagonist) vs. response-Variable slope를 사용하여 계산되었다.

[0307] 도 7에 나타낸 바와 같이, 결과는 리드 mAb가 인간 CD47의 그의 리간드 SIRP  $\alpha$ 에 대한 결합을 경쟁적으로 차단할 수 있음을 나타내었다.

[0308] **4.7 인간 CD47 친화도 (SPR)**

[0309] W3455-4.9.9-uIgG4.SPL의 인간 CD47 결합 친화도는 Biacore T200을 사용하는 SPR 분석에 의해 수행되었다. 각각의 항체는 항-인간 IgG Fc 항체 고정된 CM5 센서 칩 (GE)에 포획되었다. 다양한 농도의 인간 CD47 단백질을 30  $\mu$ L/min의 유속으로 센서 칩 위에 주입하는 180초의 결합 단계 후, 3600초의 해리를 수행했다. 칩은 각 결합 주기 후에 10mM 클리신 (pH 1.5)에 의해 재생되었다. 블랭크 표면 및 버퍼 채널의 센서그램은 테스트 센서그램에서 뺐다. 실험 데이터는 Langmuir 분석을 사용하여 1:1 모델로 피팅되었다. 55 kDa의 분자량을 사용하여 분석 항원의 몰 농도를 계산했다.

[0310] 친화도 KD 값은 표 6에 나타내었고 결합 동역학 곡선은 도 8에 나타내었다. 둘 다 리드 mAb가 벤치마크 항체 W345-BMK2.uIgG4.SP보다 약간 더 나은, 높은 친화도로 인간 CD47에 결합할 수 있음을 나타냈다.

**표 6**

[0311] SPR에 의한 리드 mAb 인간 CD47 결합 친화성 데이터

항원	항체	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
인간 CD47 ECD	W3455-4.9.9-uIgG4.SPL	1.05E+06	2.34E-05	2.23E-11
	W345-BMK2.uIgG4.SP	9.69E+05	4.02E-05	4.14E-11

[0312] 4.8 열 안정성 차동 스캔 형광 측정법 (differential scanning fluorometry, DSF)을 사용하여 리드 mAb 열 안정성을 평가했다. 간단히 말해서, QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR 시스템 (Applied Biosystems)을 이용하여 항체의 T<sub>m</sub>을 조사했다. 19 μL의 항체 용액을 1 μL의 62.5 X SYPRO Orange 용액 (Invitrogen)과 혼합하고 96 웰 플레이트 (Biosystems)로 옮겼다. 플레이트를 0.9° C/min의 속도로 26° C에서 95° C로 가열하고 생성된 형광 데이터를 수집했다. 다른 온도에 대한 형광 변화의 음의 도함수를 계산하고 최대값을 용융 온도 T<sub>m</sub>으로 정의했다. 단백질에 다중 언폴딩 전이 (unfolding transition)가 있는 경우 처음 두 개의 T<sub>m</sub>이 보고되었으며 T<sub>m1</sub> 및 T<sub>m2</sub>로 명명되었다. 데이터 수집 및 T<sub>m</sub> 계산은 오퍼레이션 소프트웨어에 의해 자동으로 수행되었다.

[0313] 아래의 도 9 및 표 7에서 볼 수 있듯이 결과는 리드 mAb가 두 가지 다른 버퍼에서 우수한 열 안정성을 나타냄을 나타냈다.

**표 7**

[0314] DSF의 리드 mAb 열 안정성 테스트

mAb	PI	버퍼	T <sub>m1</sub> (°C)	T <sub>m2</sub> (°C)	T <sub>m</sub> 트래픽라이트 (traffic light)
W3455-4.9.9-uIgG4.SPL	6.3	20mM 히스티딘 + 7% 수크로오즈 pH 6.5	64.4	-	Pass
	6.3	50mM NaAC + 7% 수크로오즈 pH 5.6	64.9	-	

[0315] 4.9 혈청 안정성 리드 mAb의 혈청 안정성 분석은 인간 혈청에서 수행되었다. 갓 채취한 인간 혈액을 항응고제가 없는 폴리스티렌 튜브에서 실온에서 30분 동안 고정된 상태로 배양했다. 혈액을 4000rpm에서 10분 동안 원심분리 후 혈청을 수집했다. 항체를 혈청과 부드럽게 혼합하고 혈청-항체 혼합물을 37° C에서 배양하였다. 샘플은 각각 0일, 1일, 4일, 7일 및 14일에 채취하여 지정된 시간에 사용시까지 -80° C에서 급냉하였다. 샘플은 인간 CD47-발현 세포에 대한 결합 능력을 평가하는 데 사용되었다. 요약하면, 항체의 연속 희석액을 CD47 발현 세포에 첨가하고 4° C에서 1시간 동안 배양하였다. 세포를 1% BSA가 포함된 200 μL PBS로 2회 세척하였다. FACS 완충액으로 1:150으로 희석된 PE 접합된 고트 항-인간 IgG Fc를 세포에 첨가하고 4° C에서 30분 동안 배양하였다. 추가 세척 단계를 200 μL FACS 완충액으로 2회 수행한 후 4° C에서 1500rpm에서 4분 동안 원심분리했다. 마지막으로, 세포를 100 μL FACS 완충액에 재현탁하고 형광 값을 FACS로 측정하고 FlowJo로 분석했다.

[0316] 도 10에 나타난 바와 같이, 그 결과는 혈청 배양이 인간 CD47에 대한 리드 mAb의 결합 능력에 영향을 미치지 않음을 나타내었다. 리드 mAb의 결합은 시간이 지남에 따라 변하지 않았다. 리드 mAb는 37° C 인간 혈청에서 최소 14일 동안 안정적이었다

[0317] 4.10 비특이적 단백질 결합 (ELISA)

[0318] 14개의 상이한 단백질에 대한 리드 mAb의 비특이적 결합을 ELISA로 테스트하였다. 96-웰 고결합 플레이트를 4° C에서 1 μg/mL의 14가지 다른 단백질로 오버나이트 코팅하고 1시간 동안 2% BSA-PBS로 차단했다. 10 ug/ml의 리드 항체를 첨가하고 2시간 동안 배양하였다. 그 다음 고트 항-인간 IgG-Fc-HRP 2차 항체를 첨가하고 1시간 동안 배양하였다. TMB 퍼옥시다제 기질 용액을 첨가하고 2M HCl을 사용하여 12분 후에 반응을 정지시켰다. 모든 배양 단계는 실온에서 수행되었고, 플레이트는 단계 사이에 pH 7.4에서 PBST로 5회 세척되었다. 테스트 샘플의 흡광도는 다중벽 플레이트 판독기 (SpectraMax® M5e)로 450nm에서 측정되었다.

[0319] OD450 값은 아래 표 8에 요약되어 있다. 데이터는 리드 항체가 14개의 테스트된 단백질에 비특이적 결합을 나타내지 않았음을 나타냈다.

표 8

ELISA를 통한 리드 mAb 비특이적 결합 분석.

mAbs	ELISA-OD450														
	Factor Eight	FGFR. his	CD14 7.his	PD-1. his	CTLA 4.his	VEGFR 2.his	CD22. his	VEGF. his	CD3.h is	HER3. his	OX40. his	4-1B B.his	CD40. his	HSA. his	Backg round
W3455-4.9.9-uIgG4L.SP	0.0498	0.1381	0.0463	0.2269	0.0573	0.0452	0.0478	0.0475	0.0527	0.0462	0.0487	0.0551	0.2091	0.3241	0.074
hIgG4K 이소타입 대조군	0.1813	0.1326	0.0424	3.707	0.0562	0.0432	0.0451	0.0452	0.0479	0.044	0.0508	0.0463	0.2129	0.3218	0.0697
hIgG4L 이소타입 대조군	0.0481	0.1373	0.0443	0.2273	0.0571	0.0441	0.0467	0.0463	0.0518	0.0445	0.051	0.0463	0.2048	0.3349	0.0702

[0321] **4.11 비특이적 세포 결합 (FACS)** 14개의 상이한 인간 기원 종양 세포 및 래트 유래 CHO-K1 세포에 대한 리드 mAb의 비특이적 결합을 FACS에 의해 수행하였다. 14개의 다른 세포를 1x10<sup>5</sup> 개 세포/웰로 96-웰 U-바닥 플레이트로 옮기고 상층액을 제거하기 전에 4° C에서 4분 동안 1500rpm으로 원심분리했다. 10 µg/ml의 리드 항체를 세포에 첨가하고 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 세포를 180 µL 1% BSA-PBS로 두 번 세척했다. 고트 항-인간 IgG Fc PE 2차 항체 (Jackson, 카탈로그 번호 109-115-098)를 첨가하여 세포를 재현탁하고 4° C 암실에서 30분 동안 배양했다. 추가 세척 단계를 180 µL 1% BSA/1XPBS로 두 번 수행한 다음 4° C에서 4분 동안 1500rpm으로 원심분리했다. 마지막으로, 세포를 100 µL 1% BSA-PBS에 재현탁한 다음 형광 강도를 유세포 분석기 (BD Canto II)로 측정하고 FlowJo로 분석했다.

[0322] MFI 값은 아래 표에 요약되어 있다. 데이터는 리드 mAb가 테스트된 14개의 인간 기원 종양 세포 모두에 결합할 수 있지만 햄스터 기원 CHO-K1 세포와 결합하지 않았음을 나타내었으며, 이는 CD47이 인간 종양 세포에서 널리 발현된다는 것을 나타낸다.

표 9

FACS에 의한 리드 mAb 비특이적 결합 분석

mAbs	FACS-MFI														
	Ramos	MDA-M B-453	BT474	Jurkat.2B8	Hut78	A431	A204	CaLu-6	A375	HepG2	BxPC-3	HT29	FaDu	293F	CHO-K1
W3455-4.9.9-uIgG4L.SP	2328	584	1317	12600	3064	4372	3115	1807	1356	222	2061	2390	5754	2617	31.5
hIgG4K 이소타입 대조군	74.4	32.2	20.8	36.9	49.7	39.5	34.7	23.3	22.8	32.2	42.9	44.3	36.2	56.4	30.7
hIgG4L 이소타입 대조군	68.4	28.3	19.1	64.3	50.2	251	42.4	88.4	49.5	27.3	110	45.7	429	28.7	29.9

[0324] **4.12 식세포작용 분석(FACS)** 리드 mAb의 식세포 활성은 인간 PBMC 유래 대식세포와 Jurkat 세포, Raji 세포 및 인간 RBC의 2가지 종양 세포주를 표적 세포로 사용하여 평가되었다.

[0325] 인간 PBMC는 신선한 인간 혈액에서 분리되었고 CD14 양성 단핵구는 hCD14 마이크로비즈에 의해 PBMC에서 분리되었다. CD14 양성 단핵구를 100ng/ml rhM-CSF가 포함된 10% FBS RPIM1640 배지에서 7일 동안 배양함으로써 대식세포로 분화시켰다. 이러한 단핵구 유래 대식세포 (monocyte derived macrophage, MDM)는 부착되어 다른 세포가

씻겨 나갈 수 있다. MDM을 긁어내고 96웰 플레이트에 접종했다. 여러 인간 종양 세포주 또는 인간 RBC가 높은 CD47 발현 때문에 표적 세포 유형으로 선택되었다. 표적 세포를 37° C에서 30분 동안 1uM CFSE로 표지한 다음, 세척하고 식세포당 1:1 비율의 종양 세포를 MDM에 첨가하고, CD47 항체를 다양한 농도로 첨가하였다. 표적 세포의 식세포 작용을 2시간 동안 허용한 후 APC에 접합된 대식세포 마커 CD14에 대한 항체로 염색하고 유세포 분석으로 분석하였다. 식세포 작용은 FL4 양성 (CD14+)인 살아있는 세포에 게이팅 (gating)한 다음 FL1 (CFSE+) 양성 세포의 백분율을 평가하여 측정되었다.

[0326] 종양 세포를 섭취한 대식세포를 계수하고 지수로 계산했다. 식세포작용 지수 % = 백분율<sub>CFSE+/CD14-APC+</sub> / (백분율<sub>CFSE+/CD14-APC+</sub> + 백분율<sub>CFSE-/CD14-APC+</sub>) x 100%.

[0327] 도 11에 나타낸 바와 같이, 리드 mAb는 종양 세포의 강력한 식세포 작용을 유도하였으며, 이는 벤치마크 항체와 유사하고 W345-BMK1.uIgG4PE.K 및 W345-BMK4.uIgG4.SPK보다 약간 우수하다 (도 11a, 도 11b). 놀랍게도, 리드 mAb에 대한 인간 적혈구에 대한 식세포작용은 W345-BMK2.uIgG4.SP보다 상대적으로 낮았다 (도 11c).

[0328] **4.13 ADCC 분석 및 CDC 분석**

[0329] 리드 mAb의 CCRF-CEM 및 Raji 세포에 대한 ADCC 및 CDC 활성을 평가하였다. PBMC를 이펙터 세포로 사용하고 CCRF-CEM 또는 Raji를 표적 세포로 사용했다.

[0330] **ADCC 분석:** 인간 PBMC를 신선한 인간 혈액에서 분리했다. 1% FBS를 함유하는 40 μL RPMI1640 (폐놀 없음) 배지의 2x10<sup>4</sup> 표적 세포를 96웰 U-바닥 플레이트 각 웰에 첨가했다. 그 다음, 1% FBS를 포함하는 20 μL RPMI1640 (폐놀 없음) 배지에 연속 희석된 항체를 각 웰에 첨가했다. 37° C에서 15분 배양한 후, 1% FBS를 함유하는 40 μL RPMI1640 (폐놀 없음) 배지의 4 x10<sup>5</sup> PBMC를 각 웰에 첨가하여 20:1 E/T 비율을 만들었다. 37° C에서 4시간 동안 배양한 후, 혼합물을 1500rpm에서 5분 동안 원심분리하고 70 μL의 상층액을 검출을 위해 옮겼다. 세포 사멸은 제조업체의 지침에 따라 LDH 세포독성 검출 키트 (Roche)를 사용하여 평가되었다.

[0331] **CDC 분석:** 1% FBS를 함유하는 40 μL RPMI1640 (폐놀 없음) 배지의 2x10<sup>4</sup> 표적 세포를 96웰 U-바닥 플레이트 각 웰에 첨가했다. 그 다음, 1% FBS를 포함하는 20 μL RPMI1640 (폐놀 없음) 배지의 연속 희석된 항체를 각 웰에 첨가했다. 37° C에서 15분 배양 후, 1% FBS를 함유하는 40 μL RPMI1640 (폐놀 없음) 배지의 정상 인간 보체를 각 웰에 첨가했다. 37° C에서 4시간 동안 배양한 후, 혼합물을 1500rpm에서 5분 동안 원심분리하고 70 μL의 상층액을 검출을 위해 옮겼다. 세포 사멸은 제조업체의 지침에 따라 LDH 세포독성 검출 키트 (Roche)를 사용하여 평가되었다.

[0332] 도 12에 나타낸 바와 같이, 결과는 리드 mAb 및 기타 벤치마크 항체가 CCRF-CEM 및 Raji 종양 세포 둘 모두에서 ADCC 및 CDC 활성을 약하게 유도하거나 전혀 유도하지 않음을 나타내었다.

[0333] **실시예5. 리드 항체 W3455-4.9.9-uIgG4.SPL의 생체내 특성화**

[0334] **5.1 B-NDG 마우스 모델 (Raji 세포)에서 항종양 효능**

[0335] 리드 mAb 효능 연구는 Biocytogen Co, Ltd.의 B-NDG 마우스에서 Raji-Luc 림프계 암 모델을 사용하여 수행되었다. 세포는 공기 중 5% CO<sub>2</sub> 환경의, 37°C에서 10% 열 비활성화 소 태아 혈청이 보충된 RPMI1640 배지에서 배양되었다. 종양 세포를 0.25% 트립신-EDTA 처리로 일주일에 두 번 정기적으로 계대배양했다. 지수 성장 단계에서 성장하는 세포를 회득하고 종양 접종을 위해 계수하였다.

[0336] 치료 모델의 경우, 각 마우스에 Raji-Luc 림프계 암 세포 5.0 X10<sup>5</sup>)를 정맥내로 접종하였다. 종양 성장은 동물 라이브 이미지에 의해 일주일에 두 번 라이브 이미징 값으로 모니터링되었다. 종양의 실시간 신호 값이 약 1.05 X10<sup>6</sup> p/sec/cm<sup>2</sup>/sr에 도달했을 때, 동물을 무작위로 5개 그룹으로 분류하고, 3 mg/kg 및 0.5 mg/kg의 두 가지 용량 수준으로 연구했다. 동물 연구 디자인은 표 10에 나타내었다. 그룹화한 날을 0일로 간주하고 마우스를 그룹화 후 0일, 4일, 7일, 11일, 14일 및 18일에 총 6회 복강 내 주사했다. 모든 종양 보유 마우스에 대해 종양의 실시간 이미징 값과 마우스의 체중을 주당 2회 측정했다. 연구에서 동물 취급, 관리 및 치료와 관련된 모든 절차는 실험실 동물 관리 평가 및 인증 협회 (AAALAC)의 지침에 따라 Shanghai Bio-model의 기관 동물 관리 및 사용 위원회 (IACUC)에서 승인한 지침에 따라 수행되었다.

표 10

항-종양 효능 연구 계획

[0337]

그룹번호	약물명	투여 수준 (mg/kg)	투여 전략	투여 경로
G1	IgG4 이소타입 대조군	3	1주에 2회	복강내 주사
G2	W3455-4.9.9-uIgG4L.SP	3		
G3	W3455-4.9.9-uIgG4L.SP	0.5		
G4	W345-BMK2.uIgG4.SP	3		
G5	W345-BMK2.uIgG4.SP	0.5		

[0338]

종양 성장은 동물 라이브 이미지에 의해 매주 2회 또는 3회 라이브 발광 신호 강도(p/sec/cm<sup>2</sup>/sr로 표현된 이미지 값)로 모니터링되었다. 결과는 평균과 표준오차 Mean ± SEM로 나타내었다. 데이터는 Prism을 사용한 Two way ANOVA Bonferroni 사후 테스트를 사용하여 분석되었으며 P<0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 도 13 및 표 11에 나타낸 바와 같이, 그룹화 후 18일째에, G1 IgG4 이소타입 대조군, 3 mg/kg) 비히클 그룹과 비교하여, G2 그룹 내지 G5 그룹 동물의 평균 체중은 유의한 감소를 나타내지 않았으며, 이는 W3455-4.9.9-uIgG4L.SP 및 W345-BMK2.uIgG4.SP는 독성이 없었음을 나타낸다. 도 13의 검은색 화살표는 투여 시간을 나타낸다. 데이터는 평균 ± SEM, n=7로 표현되었다.

표 11

그룹화 전 및 그룹화 후 18일째의 체중

[0339]

그룹	Test article	그룹화 전 체중 (g) <sup>a</sup>	그룹화 18일 후 체중 (g) <sup>a</sup>	P value <sup>b</sup>	체중 변화 (g)
G1	IgG4 이소타입 대조군 3mg/kg	20.1±0.7	15.7±1.0	-	-4.4
G2	WBP3455-4.9.9-uIgG4L.SP 3mg/kg	20.2±0.9	18.9±0.6	0.020	-2.3
G3	WBP3455-4.9.9-uIgG4L.SP 0.5mg/kg	20.2±0.5	19.0±0.7	0.020	-1.2
G4	W345-BMK2.uIgG4.SP 3mg/kg	20.1±0.9	18.7±1.8	0.271	-1.4
G5	W345-BMK2.uIgG4.SP 0.5mg/kg	20.3±1.2	20.0±1.5	0.081	-0.2

[0340]

참고: a. 평균 ± SEM. b. G1 그룹과 치료 그룹 간의 T-검정을 사용한 그룹화 후 18일째 평균 체중의 통계적 분석.

[0341]

도 14, 도 15 및 표 12에 나타낸 바와 같이, 그룹화 후 21일째에, G1 (IgG4 이소타입 대조군, 3 mg/kg) 비히클 그룹과 비교하여, G2 그룹 내지 G5 그룹의 종양 성장 억제 (TGI %)는 100.0 %, 93.2%, 100.0% 및 87.5% 였다. TGI (%) = [1-(Ti-T0)/(Vi-V0)] X 100%, 여기서 Ti 및 Vi는 각각 주어진 날의 처리군 및 비히클 군에서의 평균 이미지 신호 값 (즉, 발광 신호 강도)이다. T0와 V0는 각각 처리군과 비히클군에서 그룹화 날의 평균 이미지 신호값을 의미한다. 또한, 데이터는 W3455-4.9.9-uIgG4L.SP 및 W345-BMK2.uIgG4.SP의 명백한 항종양 효능을 나타내는 통계적으로 유의한 차이(P<0.05)를 나타내었다. 도 14의 검은색 화살표는 투여 시간을 나타낸다. 데이터는 평균 ± SEM, n=7로 표현되었다.

표 12

종양 성장 억제 분석

[0342]

그룹화 후 21일차 종양 성장 억제				
투여량 (mg/kg)	Test article	종양 (p/sec/cm <sup>2</sup> /sr) <sup>a</sup>		
		그룹화 전	그룹화 후 21일	TGI (%)

3	이소타입 IgG4 대조군	$(1.05 \pm 0.10) \times 10^6$	$2.39 \times 10^9$	-
3	WBP3455-4.9.9-uIgG4.SP	$(1.04 \pm 0.11) \times 10^6$	$(6.97 \pm 4.73) \times 10^5$	100.0
0.5	WBP3455-4.9.9-uIgG4.SP	$(1.05 \pm 0.10) \times 10^6$	$(1.64 \pm 1.60) \times 10^8$	93.2
3	W345-BMK2.uIG4.SP	$(1.05 \pm 0.07) \times 10^6$	$(7.45 \pm 0.77) \times 10^5$	100.0
0.5	W345-BMK2.uIG4.SP	$(1.07 \pm 0.09) \times 10^6$	$(3.01 \pm 2.72) \times 10^8$	87.5

[0343] 참고 : a. 평균 ± SEM 또한, 그룹화 후 0-25일 동안의 동물 생존율을 도 16에 나타내었다. 3 mg/kg 및 0.5mg/kg의 두 WBP3455 그룹 및 3mg/kg의 W345-BMK2 그룹의 경우 동물이 죽지 않았다. 결과는 W3455-4.9.9-uIgG4L.SP가 W345-BMK2.uIG4.SP보다 더 나은 효능을 보였고 종양 보유 마우스의 생존 시간을 상당히 연장시켰다. 결론적으로, 리드 항체 W3455-4.9.9-uIgG4L.SP의 처리는 유의한 항-종양 효능을 나타내었고, W345-BMK2.uIG4.SP와 같거나 약간 더 나은 결과를 보였다. 또한, WBP3455-4.9.9-uIgG4L.SP는 종양 보유 마우스의 생존 시간을 상당히 연장시켰다.

[0344] **5.2 NCG 마우스 모델 (HT-29 세포)에서 항-종양 효능**

[0345] 리드 mAb 효능 연구가 NCG 마우스의 HT-29 결장직장 선암종 (colorectal adenocarcinoma) 모델에서 테스트되었다. 7-8주령의 암컷 NCG 마우스 (Nanjing Galaxy Biopharmaceutical Co., LTD)를 연구에 사용했다. 모 HT-29 세포주는 ATCC에서 구입했다. 세포는 공기 중 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 환경에서 10% 열 비활성화 FBS 보충된 RPMI1640 배지에서 배양되었다. 종양 세포를 0.25% 트립신-EDTA 처리해 일주일에 2 - 3회 정기적으로 계대배양했다. 지수 성장 단계에서 성장하는 세포를 획득하고 종양 접종을 위해 계수하였다.

[0346] 치료 모델의 경우, HT-29 세포(PBS의 5.0 x 10<sup>6</sup>개 세포/100 μL)를 NCG 마우스에 피하 접종하였다. 모든 종양 연구에서 마우스의 체중을 측정하고 캘리퍼스를 사용하여 일주일에 두 번 종양 성장을 측정했다. 연구에서 동물 취급, 관리 및 치료와 관련된 모든 절차는 실험 동물 관리 (AAALAC)의 평가 및 인증 협회의 지침에 따라 Shanghai SIPPR-BK Laboratory Animal Co., Ltd의 기관 동물 관리 및 사용 위원회 (IACUC)에서 승인한 지침에 따라 수행되었다. 종양 부피는 공식 1/2 (길이 X 너비<sup>2</sup>)로 계산되었다. 결과는 평균과 표준오차 (평균 ± SEM)로 나타내었다. 데이터는 Graphpad Prism 6.0을 사용한 Two way RM ANOVA Tukey의 다중 비교 테스트를 사용하여 분석되었으며 p<0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0347] 도 17에 나타낸 바와 같이, 최종 리드 항체는 종양 세포가 파니투무맙에 내성이 있는 NCG 마우스에서 강력한 항 HT29 종양 세포 효능을 나타냈다. 또한, 15일, 17일 및 22일에 통계적으로 유의한 (TGI ~50%) 병용처리군 (WBP3455-4.9.9-uIgG4L.SP+panitumumab)에서 상승 항-종양 효과가 관찰되었다 (도 18).

[0348] **5.3 CB-17 SCID 마우스 모델 (Raji 세포)에서 항-종양 효능**

[0349] 리드 mAb 항-종양 효능 연구가 CB-17 SCID 마우스의 Raji B 림프계 암 모델에 대해 테스트되었다. 7 - 8주령의 암컷 CB-17 SCID 마우스 (Shanghai Lingchang Biotech Co., LTD)를 연구에 사용했다. 세포는 공기 중 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 환경에서 10% 열 비활성화 FBS 보충된 RPMI1640 배지에서 배양되었다. 종양 세포는 보통 일주일에 3번 계대 배양되었다. 지수 성장 단계에서 성장하는 세포를 획득하고 종양 접종을 위해 계수하였다.

[0350] 치료 모델의 경우, Raji 세포 (Matrigel/PBS 혼합물의 1.0 x 10<sup>6</sup>개 세포/200 μL)를 CB-17 SCID 마우스에 피하 접종하였다. 체중을 측정하고 캘리퍼스를 사용하여 종양 성장을 측정했다. 종양 부피가 약 110mm<sup>3</sup>에 도달했을 때 동물을 무작위로 5개 그룹, G1 그룹 (이소타입 대조군, 5mg/kg), G2 그룹 (W345-BMK2, 1mg/kg), G3 그룹 (W345-BMK8, 1mg/kg), G4 그룹 (W3455-4.9.9-uIgG4L.SP, 5mg/kg) 및 G5 그룹 (W3455-4.9.9-uIgG4L.SP, 1mg/kg)으로 분류하였으며, 그룹화한 날짜를 0일로 간주하였다. 그룹화 후 0일, 4일, 7일, 11일, 14일 및 18일에 각각 주당 2회 총 6회 복강내 주사하였다. 모든 종양 보유 마우스에 대해 체중을 측정하고 캘리퍼스를 사용하여 일주일에 두 번 종양 성장을 측정했다. 연구에서 동물 취급, 관리 및 치료와 관련된 모든 절차는 실험실 동물 관리 인증 및 평가 협회 (AAALAC)의 지침에 따라 Shanghai Model Organisms Animal Co., Ltd의 기관 동물 관리 및 사용 위원회 (IACUC)에서 승인한 지침에 따라 수행되었다.

[0351] 종양 부피는 공식 1/2 (길이 X 너비<sup>2</sup>)로 계산되었다. 결과는 평균과 표준오차 (Mean ± SEM)로 나타내었다. 데

이터는 Graphpad Prism을 사용한 Two way RM ANOVA Tukey의 다중 비교 테스트를 사용하여 분석되었으며 p<0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0352] 도 19a 및 표 13에 나타낸 바와 같이, 그룹화 후 21일째에, G1 그룹 내지 G5 그룹의 동물의 평균 체중은 유의한 감소를 나타내지 않았고, 이는 W3455-4.9.9-uIgG4L.SP, W345-BMK2 및 W345-BMK8은 독성이 없었음을 나타낸다.

[0353] 도 19b 및 표 14에 나타낸 바와 같이, 그룹화 후 21일째에, G1 (이소타입 대조군, 5 mg/kg) 비히클 그룹과 비교하여, G2 그룹 내지 G5 그룹의 종양 성장 억제 (TGI %)는 94.70%, 67.48%, 103.32% 및 94.70%였다. 또한, 데이터는 W3455-4.9.9-uIgG4L.SP, W345-BMK2 및 W345-BMK8의 명백한 항-종양 효능을 나타내는 통계적으로 유의한 차이(P<0.05)를 보여주었다. 또한, W3455-4.9.9-uIgG4L.SP는 1 mg/kg 투여량에서 W345-BMK2와 유사한 효능을 보였고 W345-BMK8보다 훨씬 더 나은 효능을 보였다.

**표 13**

그룹화 전 및 그룹화 후 21일차의 체중 측정

[0354]

그룹	Test articles	그룹화 전 체중 (g) <sup>a</sup>	그룹화 후 21일차 체중 (g) <sup>a</sup>	P value <sup>b</sup>	체중변화 (g)
G1	이소타입 대조군 5 mg/kg	17.89±0.22	18.19±0.61	-	0.30
G2	W345-BMK2 1 mg/kg	18.21±0.34	18.45±0.40	0.729	0.24
G3	W345-BMK8 1 mg/kg	17.98±0.24	18.45±0.41	0.725	0.47
G4	W3455-4.9.9-uIgG4L.SP 5 mg/kg	18.21±0.14	18.20±0.39	0.983	-0.01
G5	W3455-4.9.9-uIgG4L.SP 1 mg/kg	18.21±0.34	18.27±0.30	0.907	0.06

[0355] 참고: a. 평균 ± SEM. b. G1 그룹과 처리 그룹 간의 T-검정을 사용한 그룹화 후 21일차 평균 체중의 통계적 분석.

**표 14**

그룹화 후 21일차의 종양 성장 억제

[0356]

그룹	Test articles	그룹화 전 종양 부피(mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	그룹화 후 21일차 종양 부피 (mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	P value <sup>b</sup>	TGI (%)
G1	이소타입 대조군 5 mg/kg	110.15±3.40	1242.33±222.22	-	
G2	W345-BMK2 1 mg/kg	110.20±3.67	170.16±45.90	0.000	94.70
G3	W345-BMK8 1 mg/kg	110.29±3.59	478.47±84.49	0.007	67.48
G4	W3455-4.9.9-uIgG4L.SP 5 mg/kg	110.72±3.22	73.16±13.42	0.000	103.32
G5	W3455-4.9.9-uIgG4L.SP 1 mg/kg	110.04±2.90	170.02±61.56	0.001	94.70

[0357] 참고: a. 평균 ± SEM. b. G1 그룹과 처리 그룹 간의 T-검정을 사용한 그룹화 후 21일차 평균 체중의 통계적 분석.

[0358] **5.4 시노물구스 원숭이의 약동학 및 독성 연구**

[0359] **5.4.1 약동학 매개변수**

[0360] 리드 mAb가 논-나이프 (non-naive) 시노물구스 원숭이에서 약동학(PK)에 대해 평가되었다. 4마리의 수컷 원숭이 (2마리의 동물/그룹)를 2개의 그룹으로 나누었다: 저용량 및 고용량 그룹 (15mg/kg 및 50mg/kg). 동물에게 1회의 단일 용량을 정맥내 투여하였다 (표 15 참조). 항체는 pH 5.0의 20mM 히스티딘, 5% 수크로스 용액에서 제형화되었다. 투여 전 (1일), 0.25h, 0.5h, 1h, 4h, 8h, 24h, 3일, 7일, 14일, 21일 및 28일에 혈액 샘플을 수집하여 항체 농도를 측정했으며, ELISA 기법과 WinNonlin 소프트웨어로 분석했다. 혈액학 (CBC) 및 혈청 화학에 대한 전혈 샘플 분석은 각각 혈액학 분석기 (ADVIA2120) 및 화학 (HITACHI 7180)에 의해 결정되었다. 일반적인 건강, 외모, 특히 피부 자극에 대한 케이지 측면 (cage-side) 관찰을 정기적으로 수행했다.

표 15

그룹화 및 항체 투여 정보 테스트

Test article	동물 수	투여 수준	투여 농도	비히클 (vehicle)	투여루트
	수컷	(mg/kg)	(mg/mL)		
W3455-4.9.9-uIgG4.SPL	2	15	13.2	20 mM 히스티딘, 5% 수크로오즈, pH 5.0	IV bolus
W3455-4.9.9-uIgG4.SPL	2	50	13.2		

표 16

약동학 매개변수 분석

mAb	W3455-4.9.9-uIgG4.SPL	
투여량	15 mg/kg, IV, n=2	50 mg/kg, IV, n=2
t <sub>1/2</sub> (h)	48	86
C <sub>max</sub> (µg/mL)	366	852
AUC <sub>0-t</sub> (µg/ml*h)	10664	92672

[0363] W3455-4.9.9-uIgG4.SPL의 평균 반감기 (T<sub>1/2</sub>)는 도 20 및 표 16에 나타난 바와 같이 15mg/kg 및 50mg/kg에 대해 각각 48시간 및 86시간이다. 데이터 n=2인 평균값으로 표현하였다. C<sub>max</sub>의 전신성 노출 (systemic exposure)은 W3455-4.9.9-uIgG4.SPL의 경우 투여량이 15mg/kg에서 50mg/kg으로 증가함에 따라 2.3배 증가했으며, AUC<sub>0-t</sub>는 W3455-4.9.9-uIgG4.SPL의 경우 투여량이 15mg/kg에서 50mg/kg으로 증가함에 따라 8.7배 증가했다. 요약하면, 전신성 노출은 용량이 15mg/kg에서 50mg/kg으로 증가함에 따라 용량-비례적으로 증가했다.

[0364] 5.4.2 독성 연구

[0365] 리드 mAb의 혈액학적 효과가 PK 연구 동안 시노물구스 원숭이에서 평가되었다. 적혈구 (RBC) 및 망상적혈구 (reticulocyte, REC)의 수를 세고 헤모글로빈 수치를 정량화했다. 그 결과를 도 21에 나타내었고, 데이터는 n=2인 평균값으로 나타내었다.

[0366] W3455-4.9.9-uIgG4.SPL의 투여는 경미한 일시적 용량 의존성 빈혈을 유발했다. RBC 수 및 헤모글로빈 (HGB)의 최하점은 약 7일차에 발생했으며 도 21 a-c에 표시된 대로 1-2주 내에 자연스럽게 정상 범위로 돌아갔다. 일시적 빈혈은 젊은 RBC에 의한 교체로 해결되었는데, 망상적혈구 (RET) 수가 일찍 3일차에 유의하게 증가하고 혈액 내 오래된 노화 RBC 손실을 보충했기 때문이다 (도 21c).

[0367] 따라서 빈혈은 일시적이고 일반적으로 잘 견딜 수 있다고 결론내렸다. 일시적인 빈혈은 투여된 용량 요법에서 경증이었으며 약 2주 후에 기준선 수준으로 자발적으로 회복되었다. 4마리의 원숭이 모두 28일의 연구 기간 동안 정상적인 행동을 보였다.

[0368] 당업자는 본 명세서의 개시 내용이 그 정신 또는 중심 속성을 벗어나지 않고 다른 특정 형태로 구현될 수 있음을 추가로 이해할 것이다. 본 명세서 개시내용의 전술한 설명은 그 예시적인 실시형태만을 개시한다는 점에서, 다른 변형이 본 개시내용의 범위 내에 있는 것으로 고려되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 본 발명은 여기에서 상세히 설명된 특정 실시예에 한정되지 않는다. 오히려, 본 발명의 범위 및 내용을 나타내는 첨부된 청구 범위를 참조해야 한다.

[0369] 참조문헌

[0370] [1] Michael H. Kershaw and Mark J. Smyth. Making macrophages eat cancer. Science 5 Jul 2013 Vol 341.

[0371] [2] Chao MP, et al. Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. Cell 2010; 142: 699-713.

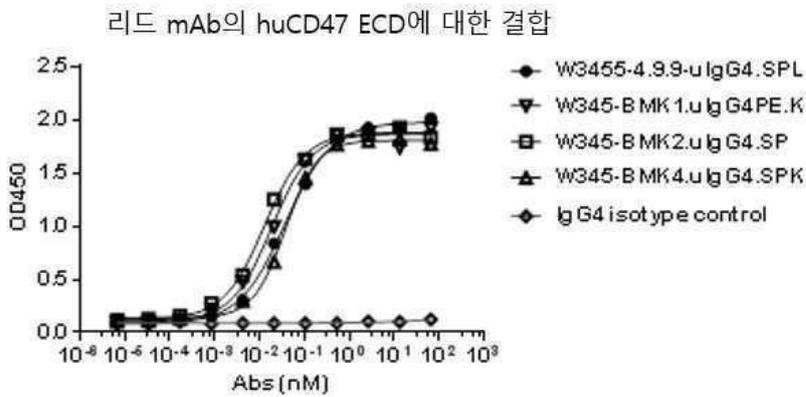
[0372] [3] Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. Trends Cell Biol 2001;

11: 130-135

- [0373] [4] Chao MP, et al. Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2011; 71: 1374-1384.
- [0374] [5] Liu J, et al. Pre-clinical development of a humanized anti-CD47 antibody with anti-cancer therapeutic potential. *PloS One* 2015; 10: e0137345. (BMK2)
- [0375] [6] Patent: WO 2016/109415 A1; Jun. 17, 2016. (BMK1). CD47 Antibodies and Methods of use thereof.
- [0376] [7] Patent: US\_9017675\_B2; Humanized and chimeric monoclonal antibodies to CD47. (BMK2)
- [0377] [8] Patent: US 2017/0081407 A1; Mar. 23, 2017. (BMK4). Anti-CD47 antibodies and methods of use.
- [0378] [9] Patent: WO 2018/075857 A1; April. 26, 2018. (BMK8). Novel CD47 monoclonal antibodies and uses thereof

도면

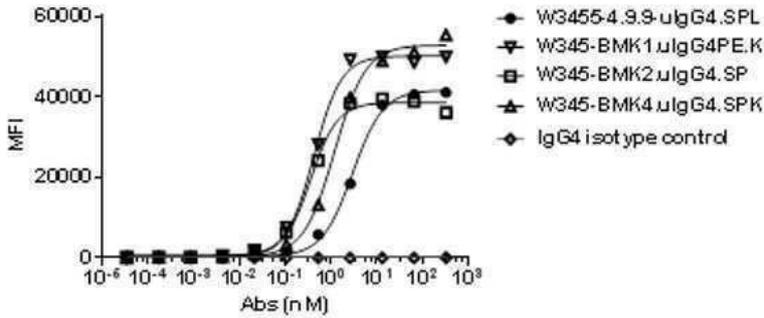
도면1



Abs	huCD47 ECD		
	EC50 (nM)	Max OD	Neg
W3455-4.9.9-ulgG4.SPL	0.038	2.015	0.102
W345-BMK1.ulgG4PE.K	0.019	1.924	
W345-BMK2.ulgG4.SP	0.013	1.931	
W345-BMK4.ulgG4.SP	0.038	1.817	
IgG4 isotype control	NA	0.123	

도면2

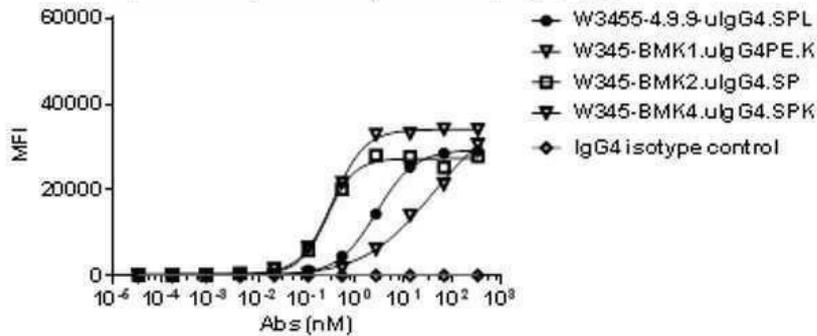
리드 mAb의 CHOK1-huCD47에 대한 결합



Abs	CHOK1-huCD47		
	EC50 (nM)	Max MFI	Neg
W3455-4.9.9-uIgG4.SPL	2.99	41100	34.8
W345-BMK1.uIgG4PE.K	0.43	50000	
W345-BMK2.uIgG4.SP	0.36	39600	
W345-BMK4.uIgG4.SPK	1.22	55400	
IgG4 isotype control	NA	66	

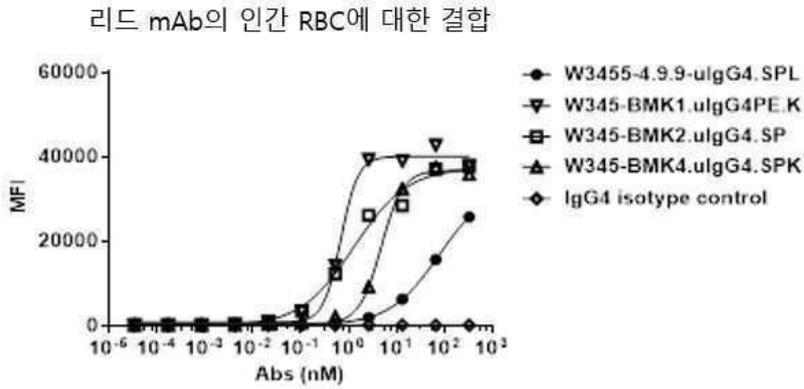
도면3

리드 mAb의 CHOK1-cynoCD47에 대한 결합



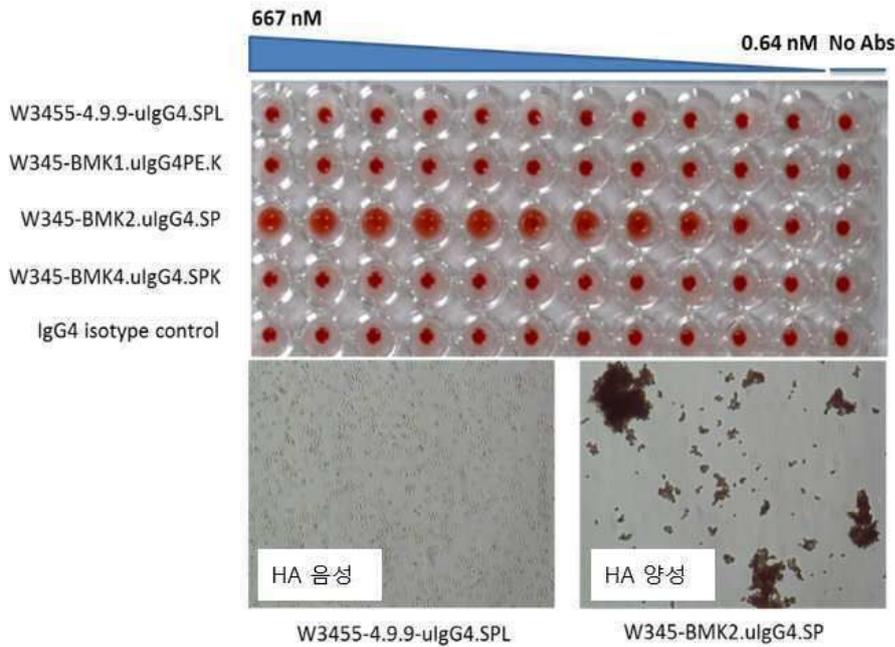
Abs	CHOK1-cynoCD47		
	EC50 (nM)	Max MFI	Neg
W3455-4.9.9-uIgG4.SPL	2.71	29100	47.6
W345-BMK1.uIgG4PE.K	0.34	34200	
W345-BMK2.uIgG4.SP	0.26	28100	
W345-BMK4.uIgG4.SPK	38.9	30600	
IgG4 isotype control	NA	97.9	

도면4



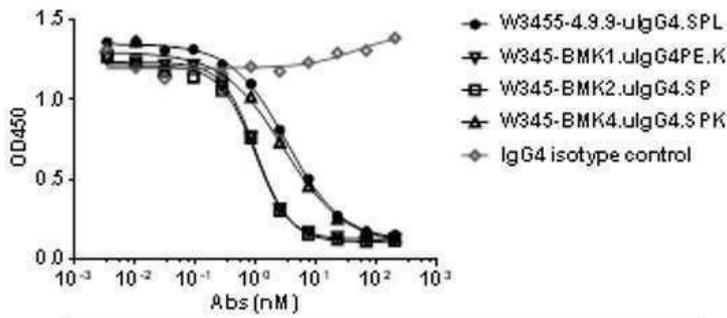
Abs	human RBCs		
	EC50 (nM)	Max MFI	Neg
W3455-4.9.9-ulgG4.SPL	76.7	25800	232
W345-BMK1.ulgG4PE.K	0.69	42800	
W345-BMK2.ulgG4.SP	1.31	37700	
W345-BMK4.ulgG4.SPK	4.82	37600	
IgG4 isotype control	NA	238	

도면5



도면6

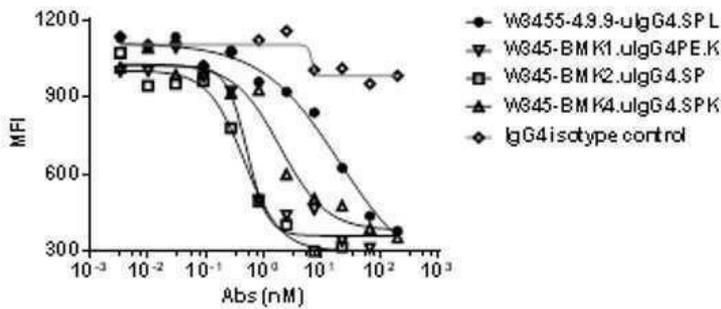
리드 mAb의 huCD47 ECD에서의 리간드 Blocking Assay



Abs	huCD47 ECD			리간드
	IC50 (nM)	Min OD	Max Inhibit%	
W3455-4.9.9-ulgG4.SPL	3.21	0.149	89.64%	1.438
W345-BMK1.ulgG4PE.K	0.97	0.12	91.66%	
W345-BMK2.ulgG4.SP	0.98	0.107	92.56%	
W345-BMK4.ulgG4.SP.K	2.84	0.137	90.47%	
IgG4 isotype control	NA	1.133	21.21%	

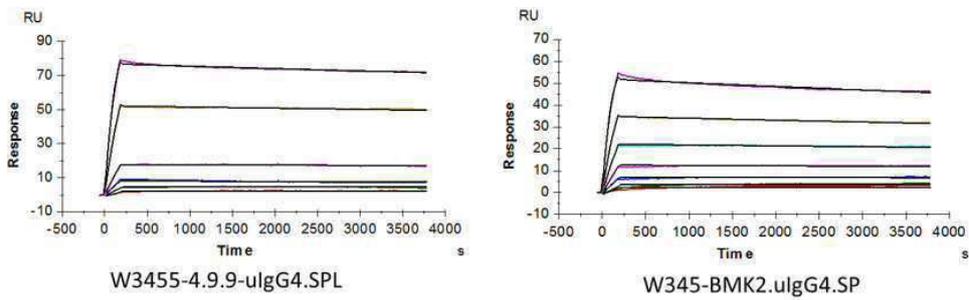
도면7

리드 mAb의 CHOK1-huCD47에서의 리간드 Blocking Assay

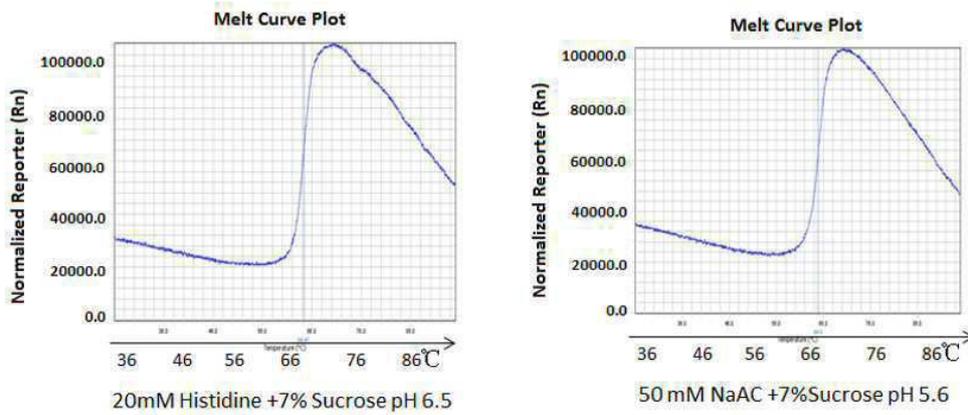


Abs	CHOK1-huCD47			리간드
	IC50 (nM)	Min MFI	Max Inhibit%	
W3455-4.9.9-ulgG4.SPL	20.1	380	65.01%	1086
W345-BMK1.ulgG4PE.K	0.51	312	71.27%	
W345-BMK2.ulgG4.SP	0.46	291	73.20%	
W345-BMK4.ulgG4.SP.K	1.92	354	67.40%	
IgG4 isotype control	NA	953	12.25%	

도면8

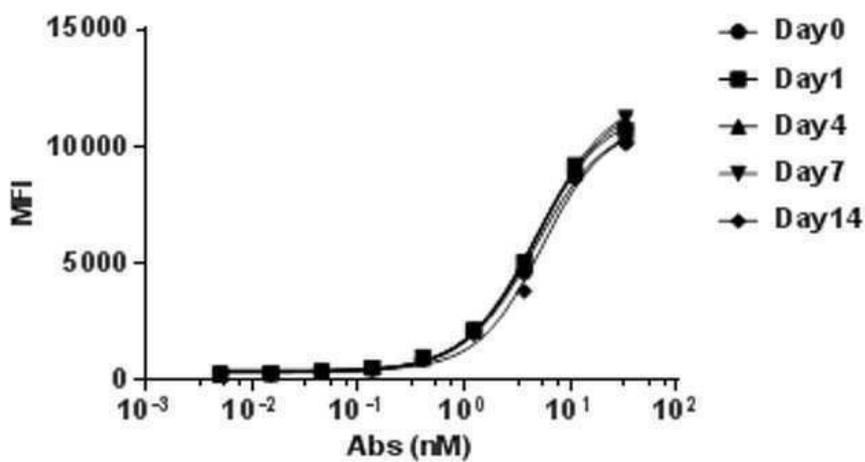


도면9

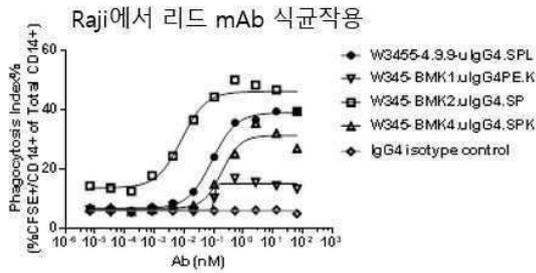


도면10

리드 mAb 혈청 안정성 연구

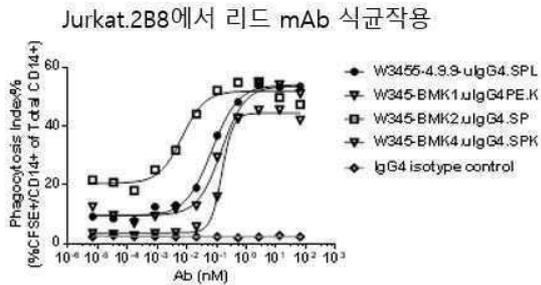


도면11a



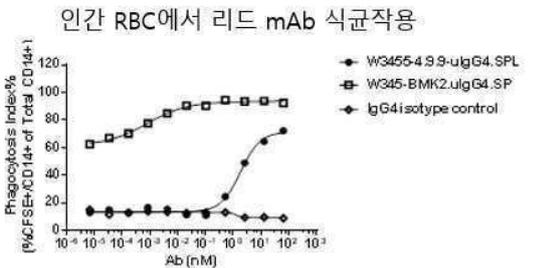
Abs	Phagocytosis index% on Raji	
	EC50 (nM)	Max Index%
W3455-4.9.9-ulgG4.SPL	0.089	39.6
W345-BMK1.ulgG4PE.K	0.108	15.6
W345-BMK2.ulgG4.SP	0.008	48.5
W345-BMK4.ulgG4.SP.K	0.191	35.6
IgG4 isotype control	NA	6.3

도면11b



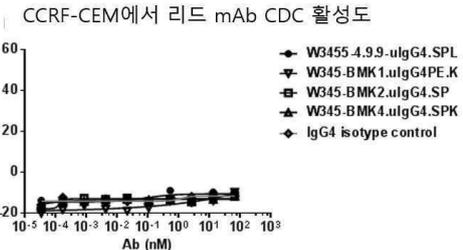
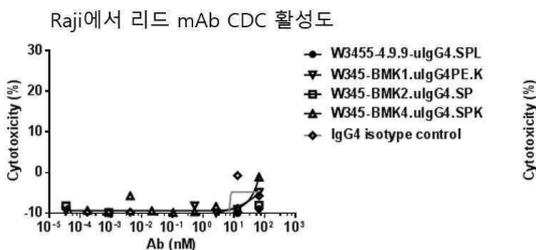
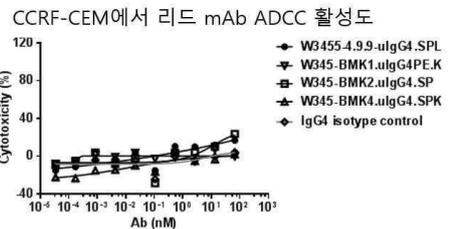
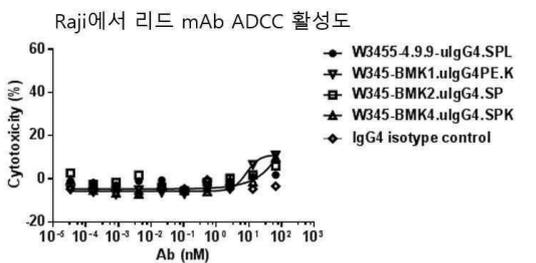
Abs	Phagocytosis index% on Jurkat.2B8	
	EC50 (nM)	Max Index%
W3455-4.9.9-ulgG4.SPL	0.07	53.9
W345-BMK1.ulgG4PE.K	0.152	45.4
W345-BMK2.ulgG4.SP	0.007	54.6
W345-BMK4.ulgG4.SP.K	0.146	55.1
IgG4 isotype control	NA	2.7

도면11c

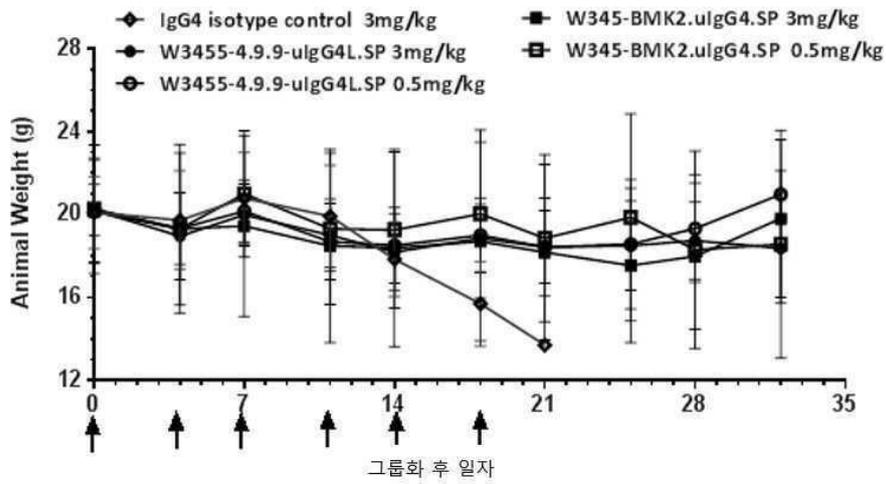


Abs	Phagocytosis index% on hRBCs	
	EC50 (nM)	Max Index%
W3455-4.9.9-ulgG4.SPL	1.894	72.4
W345-BMK2.ulgG4.SP	0.001	94.6
IgG4 isotype control	NA	13.1

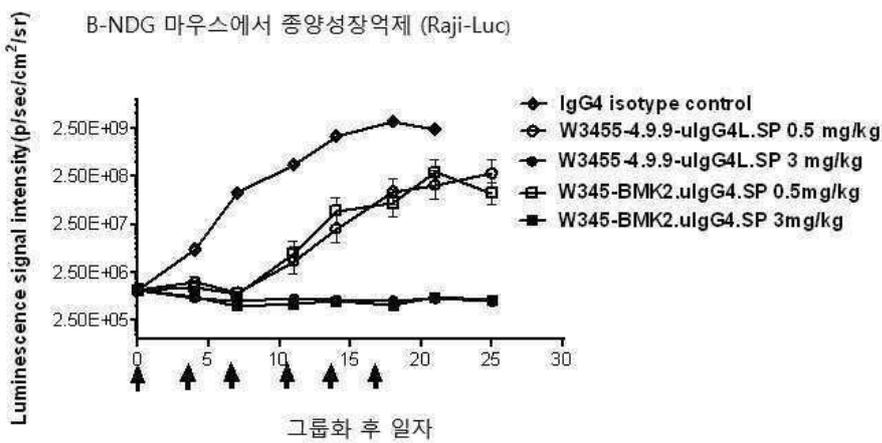
도면12



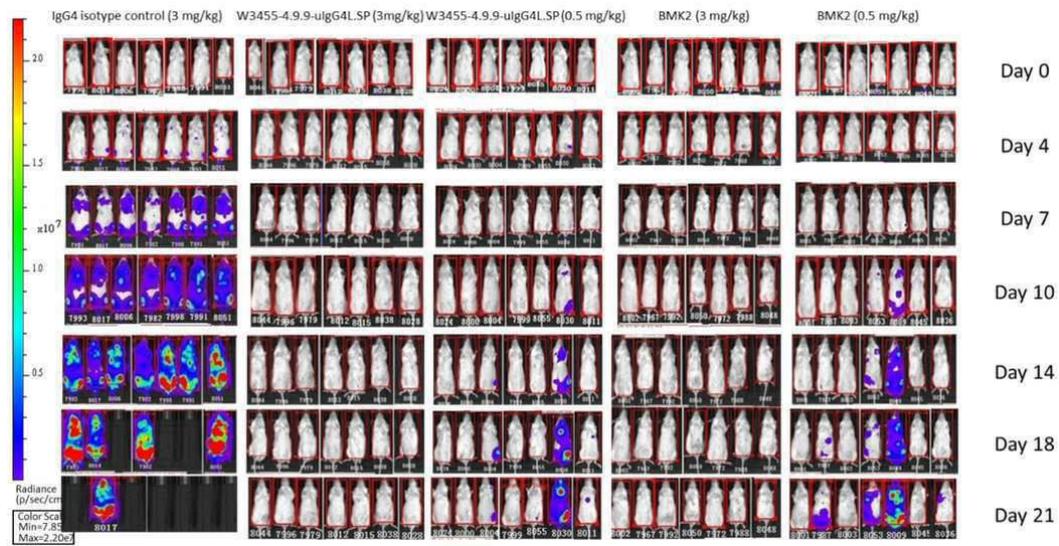
도면13



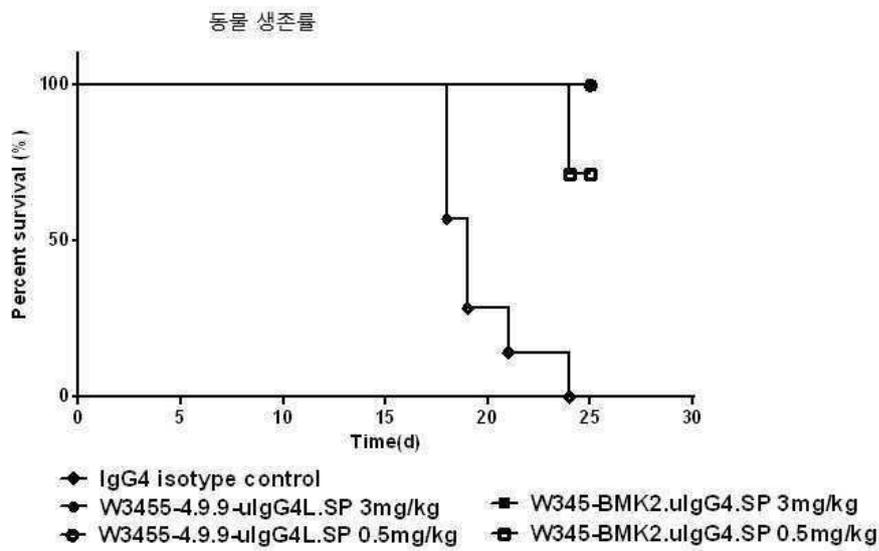
도면14



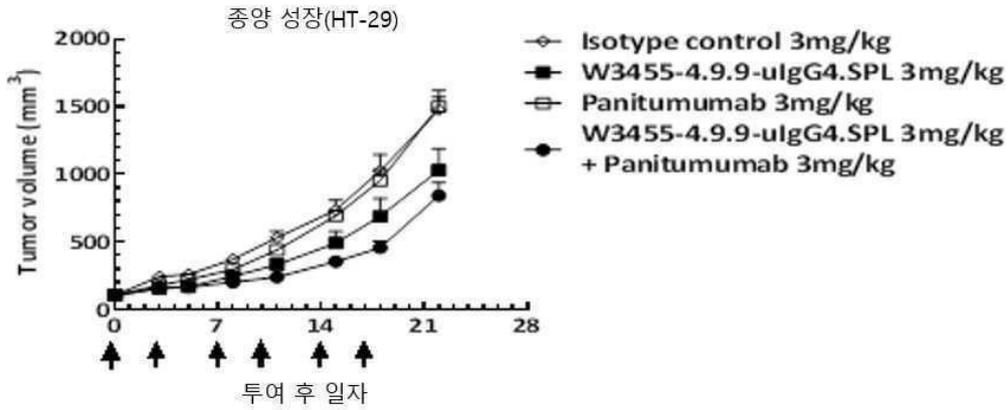
도면15



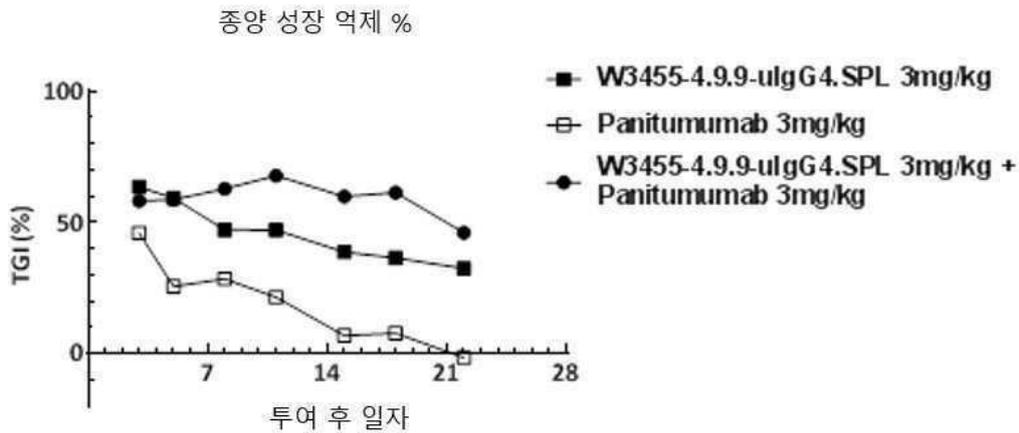
도면16



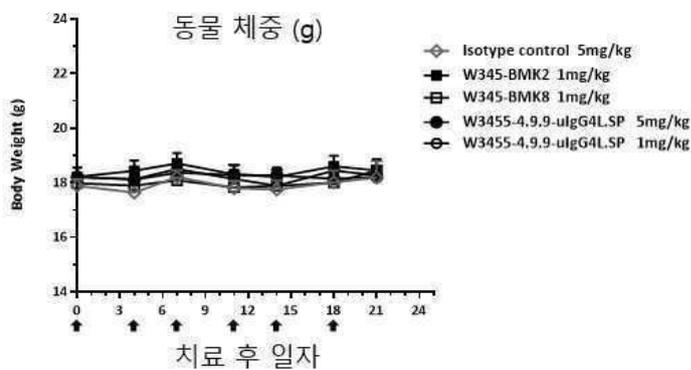
도면17



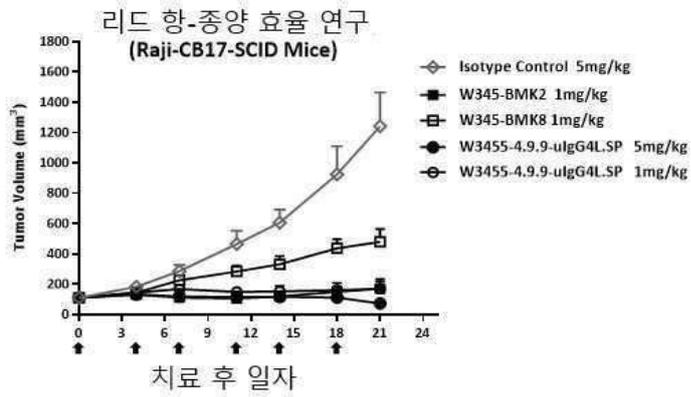
도면18



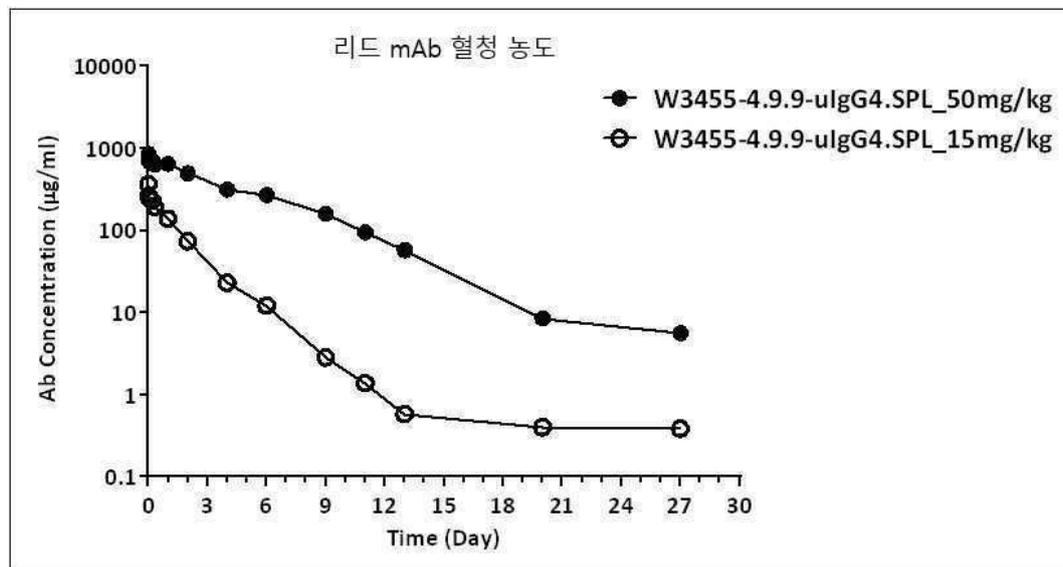
도면19a



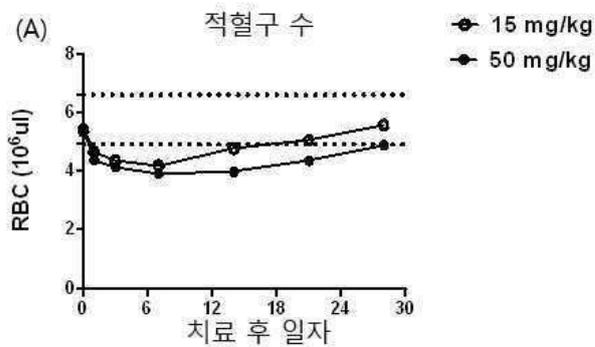
도면19b



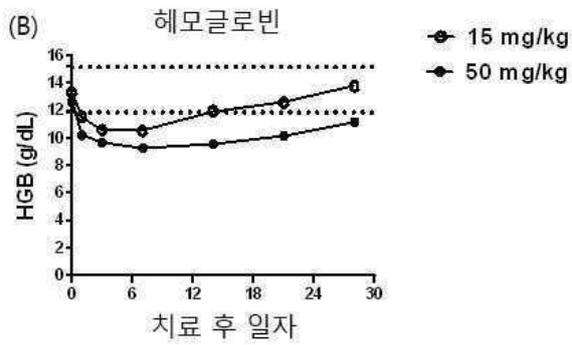
도면20



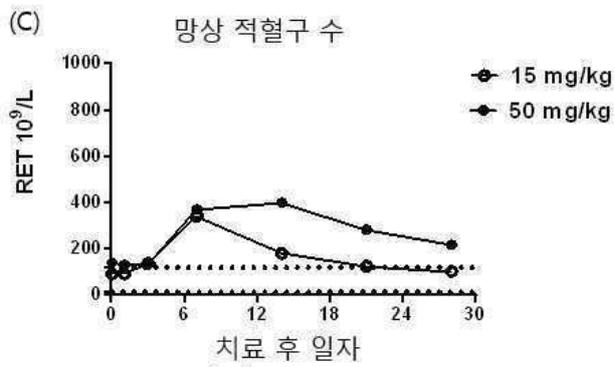
도면21a



도면21b



도면21c



서열 목록

- <110> WuXi Biologics Ireland Limited
- <120> NOVEL ANTI-CD47 ANTIBODIES AND USES THEREOF
- <130> PI220012CN
- <150> PCT/CN 2019113296
- <151> 2019-10-25
- <160> 12
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Synthesized sequence
- <400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Ala Met Ser

1 5 10

<210> 2  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthesized sequence

<400> 2  
 Thr Ile Ser Ala Ser Gly Gly Arg Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 3  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthesized sequence

<400> 3  
 Glu Gly Ser Phe Gly Glu Gly Val Asp Pro  
 1 5 10

<210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthesized sequence

<400> 4  
 Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala Tyr

1 5 10

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthesized sequence

<400> 5  
 Glu Asp Asn Lys Arg Pro Ser

1                    5  
 <210>    6  
 <211>    11  
 <212>    PRT  
 <213>    Artificial Sequence  
 <220><223>    Synthesized sequence  
 <400>    6  
 Tyr Ser Thr Asp Ile Ser Gly Asn His Trp Val  
 1                    5                    10  
 <210>    7  
 <211>    119  
 <212>    PRT  
 <213>    Artificial Sequence  
  
 <220><223>    Synthesized sequence  
 <400>    7  
 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 Asn Phe  
                   20                    25                    30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45  
 Ser Thr Ile Ser Ala Ser Gly Gly Arg Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                    55                    60  
  
 Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
 65                    70                    75                    80  
 Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95  
 Ala Lys Glu Gly Ser Phe Gly Glu Gly Val Asp Pro Trp Gly Gln Gly  
                   100                    105                    110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115  
 <210>    8  
 <211>    108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized sequence

<400> 8

Ser Tyr Glu Met Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Glu Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ile Ser Gly Asn His

85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 9

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized sequence

<400> 9

gaagtgcagt tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccittagc aactttgcca tgagctgggt cgccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctcaact attagtgcta gtggtggtcg gacattctac 180

gcagactccg tgaagggccg gatcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240

ctgcaaatga atggcctgag agccgaggac acggccgtct attactgtgc gaaggagggg 300

tcgttcgggg agggagtcca cccctggggc caggaaccc tggtcaccgt gtctca 357

<210> 10

<211> 324

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthesized sequence  
 <400> 10

tcctatgaga tgacacagcc accctcgggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc 60  
 acctgctctg gagatgcatt gccaaaaaaa tatgcttatt ggtaccagca gaagtcaggc 120  
 caggcccctg tgctgggtcat ctatgaggac aacaaacgac cctcagggat cctgagaga 180  
 ttctctggct ccagctcagg gacaatggcc accttgacta tcagtggggc ccaggtggag 240  
 gatgaagctg actactactg ttactcaaca gacatcagtg gtaatcattg ggtgttcggc 300  
 ggagggaccg agctgaccgt ccta 324

<210> 11  
 <211> 446  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthesized sequence  
 <400> 11

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 Asn Phe  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Thr Ile Ser Ala Ser Gly Gly Arg Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Glu Gly Ser Phe Gly Glu Gly Val Asp Pro Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe



Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 370 375 380  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 405 410 415  
  
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430  
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435 440 445  
 <210> 12  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthesized sequence  
 <400> 12  
 Ser Tyr Glu Met Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala  
 20 25 30  
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 Glu Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ile Ser Gly Asn His  
 85 90 95  
  
 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys  
 100 105 110  
 Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln  
 115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly  
 130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly  
 145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala  
 165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser  
 180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val  
 195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 210