

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038880**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.01

(21) Номер заявки
201891435

(22) Дата подачи заявки
2017.01.11

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА, МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА МЫШИ ИЛИ ХИМЕРНЫЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD47

(31) 16150808.0; 16172651.8

(32) 2016.01.11; 2016.06.02

(33) EP

(43) 2018.12.28

(86) PCT/EP2017/050508

(87) WO 2017/121771 2017.07.20

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФОРТИ СЕВЕН, ИНК. (US)

(56) WO-A1-2014123580
WO-A1-0148020

(72) Изобретатель:
**Шалон-Коттаво Мари, Ламар Мехди,
Швамборн Клаус, Белтраминелли
Никола, Фалло Стефани, Гаррон Пьер
(FR)**

(74) Представитель:
Угрюмов В.М. (RU)

(57) Предложены гуманизированные моноклональные антитела, моноклональные антитела мыши или химерные моноклональные антитела против CD47. Антитела связываются с гликозилированным и дегликозилированным CD47 человека с оптимизированным значением Koff, нарушают взаимодействие CD47 человека с SIRPα и находят применение в различных терапевтических, профилактических или диагностических способах. Настоящее изобретение включает выделенные антитела и их производные и фрагменты, фармацевтические составы, содержащие одно или несколько гуманизированных или химерных моноклональных антител против CD47, и линии клеток, которые продуцируют эти моноклональные антитела. Также предложены последовательности аминокислот и нуклеотидов указанных антител.

B1**038880****038880****B1**

Область техники

Предложены гуманизированные моноклональные антитела, моноклональные антитела мыши или химерные моноклональные антитела против CD47. Антитела связываются с гликозилированным и дегликозилированным CD47 человека с оптимизированным значением Koff, нарушают взаимодействие CD47 человека с SIRP α и находят применение в различных терапевтических, профилактических или диагностических способах. Настоящее изобретение включает выделенные антитела и их производные и фрагменты, фармацевтические составы, содержащие одно или несколько гуманизированных или химерных моноклональных антител против CD47, и линии клеток, которые продуцируют эти моноклональные антитела. Также предложены последовательности аминокислот и нуклеотидов антител.

Уровень техники

Макрофаги устраняют патогены и поврежденные или старые клетки из сосудистого русла по механизму фагоцитоза. CD47 клеточной поверхности взаимодействует со своим рецептором на макрофагах, SIRP α , что приводит к ингибированию фагоцитоза нормальных, здоровых клеток. CD47 представляет собой повсеместно экспрессируемый трансмембранный гликопротеин с одним Ig-подобным доменом и пятью трансмембранными областями, который функционирует как клеточный лиганд для SIRP α и связывание с которым опосредуется через NH2-концевой V-подобный домен SIRP α . SIRP α преимущественно экспрессируется на миелоидных клетках, включая макрофаги, гранулоциты, миелоидные дендритные клетки (ДК), тучные клетки и их предшественники, в том числе гемопоэтические стволовые клетки (ГСК).

SIRP α ингибирует фагоцитоз клеток хозяина макрофагами, поскольку связывание SIRP α на макрофагах с CD47, экспрессируемыми на клетке-мишени хозяина, вызывает образование ингибиторного сигнала, опосредованного SHP-1, который отрицательно регулирует фагоцитоз. SIRP α действует, детектируя сигналы "своих" и отрицательно регулируя врожденную иммунную эффекторную функцию против данных клеток.

Сверхэкспрессия CD47 на линии клеток рака, такого как, например, миелоидный лейкоз, увеличивает патогенность рака и позволяет ему уклоняться от фагоцитоза. Таким образом, повышающая регуляция CD47 представляет собой важный механизм, который обеспечивает защиту нормальных ГСК в течение опосредованной воспалением мобилизации и который использует раковые клетки с целью избежать уничтожения макрофагами.

В настоящем изобретении предложены антитела против CD47, демонстрирующие различные желательные характеристики для лечения заболевания, такого как рак, у субъекта, например человека.

Краткое описание изобретения

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с гликозилированным и негликозилированным CD47, причем связывание антитела с CD47 не зависит от гликозилирования CD47. Согласно одному варианту реализации антитело связывается с гликозилированной и дегликозилированной формами CD47 человека. Согласно другому варианту реализации гликозилированная форма CD47 человека содержит один или несколько N-гликозилированных остатков в положениях N23, N34, N50, N73, N111 и/или N206 в последовательности аминокислот CD47 человека. Дегликозилированная форма CD47 человека может содержать гликозилированный CD47 человека, который был обработан пептид-N-гликозидазой (ПНГазой) для удаления N-гликозилирования.

Согласно одному варианту реализации соотношение EC50 связывания антитела с негликозилированной по сравнению с гликозилированной формами CD47 меньше 4:1, 3:1 или 2:1, предпочтительно находится в диапазоне от 4:1 до 1:4, более предпочтительно от 3:1 до 1:3, наиболее предпочтительно от 2:1 до 1:2; или соотношение EC95 связывания антитела с негликозилированной по сравнению с гликозилированной формами CD47 меньше 25:1, 20:1 или 10:1, предпочтительно находится в диапазоне от 10:1 до 1:10, более предпочтительно от 9:1 до 1:9, наиболее предпочтительно от 10:1 до 1:10.

Согласно другому варианту реализации антитело связывается с каждым из гликозилированного и негликозилированного CD47 с равновесной константой связывания 80 пМ или менее, предпочтительно 70 пМ или менее, более предпочтительно 60 пМ или менее.

Согласно другому варианту реализации максимальная связывающая способность (B_{max2}) антитела с негликозилированным CD47 составляет по меньшей мере 60% от максимальной связывающей способности (B_{max1}) антитела с гликозилированным CD47.

В предпочтительном варианте антитело характеризуется значением Koff связывания с гликозилированным и/или негликозилированным CD47, составляющим приблизительно $1,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ (1/с) или более. Более предпочтительно антитело характеризуется значением Koff связывания с гликозилированным и/или негликозилированным CD47 от $1,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $1,0 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. Наиболее предпочтительно антитело характеризуется значением Koff связывания с гликозилированным и/или негликозилированным CD47 от $2,5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $5,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложено антитело, которое связывается с CD47, причем указанное антитело характеризуется значением Koff связывания с CD47 от $1,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $1,0 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$.

Предложены композиции и способы, связанные с гуманизированными или химерными моноклональными антителами против CD47. Антитела согласно настоящему изобретению связываются с CD47 и характеризуются уникальным функциональным профилем. В частности, указанные антитела обладают по меньшей мере одной из следующих характеристик: нарушают взаимодействие CD47 человека с SIRP α , ингибируют передачу сигнала CD47-SIRP α , усиливают фагоцитоз некоторых CD47-экспрессирующих клеток, не вызывают значительного уровня агглютинации клеток и находят применение в различных терапевтических способах. Предпочтительными являются антитела, которые связываются с CD47 человека и которые представлены в формате IgG4. Предпочтительными являются антитела в биспецифическом формате, которые связываются с CD47 человека и могут быть также представлены в формате IgG1. Предпочтительными являются неактивирующие антитела с высокими значениями Koff (которые свидетельствуют о быстрой кинетике диссоциации) и слабыми профилями апоптоза и активностью в отношении агглютинации красных клеток крови либо отсутствием апоптоза и такой активности (что свидетельствует о низкой токсичности). Кроме того, предпочтительными являются антитела, которые связываются с CD47 человека с различными паттернами гликозилирования и/или с дегликозилированными формами CD47 человека. Варианты реализации настоящего изобретения включают выделенные антитела и их производные и фрагменты, фармацевтические составы, содержащие одно или несколько гуманизированных или химерных моноклональных антител против CD47; и линии клеток, которые продуцируют эти моноклональные антитела. Также предложены последовательности аминокислот и нуклеотидов антител.

Антитела, представляющие интерес, включают предложенные гуманизированные, модифицированные или химерные антитела и их варианты. Моноклональные антитела согласно настоящему изобретению находят конкретное применение в качестве реактивов для диагностики и иммунотерапии заболевания, связанного с CD47, у людей, в особенности, в терапии рака, такого как гематологические и солидные опухоли. Преимущество моноклональных антител согласно настоящему изобретению обусловлено процессом гуманизации. Таким образом, применение моноклональных антител согласно настоящему изобретению для иммунотерапии *in vivo* существенно снижает проблему значительных иммунных ответов хозяина на антитела.

В настоящем документе предусмотрены различные формы антител. Например, антитело против CD47 может представлять собой полноразмерное химерное или гуманизированное антитело, например, содержащее константную область иммуноглобулина человека любого изотипа, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и т.д., или фрагмент антитела, например одноцепочечное антитело, F(ab')₂-фрагмент, F(ab)-фрагмент и т.д. Фрагменты, содержащие участки CDR, также представляют интерес, например, для целей визуализации, хотя формат IgG4, безусловно, является предпочтительной формой. Для биспецифического подхода также может быть подходящим формат IgG1. Кроме того, антитело может быть мечено детектируемой меткой, иммобилизовано на твердой фазе и/или конъюгировать с гетерологичным соединением. Антитело также может быть представлено в виде биспецифического или мультиспецифического антитела, вступающего в реакцию со вторым антигеном, включая, в частности, антигены рака. Предпочтительное биспецифическое антитело представляет собой антитело, которое способно функционально реагировать с антигеном Her2. Биспецифические антитела предпочтительного применения являются антителами со средним связыванием с CD47 человека, такие как, например, кандидаты 20 и 22 и их варианты (например, их гуманизированные версии).

Предусмотрены диагностические и терапевтические варианты применения антитела, в особенности, в отношении обнаружения и устранения нежелательных клеток, экспрессирующих CD47. В одном диагностическом применении в настоящем изобретении предложен способ определения присутствия CD47-экспрессирующих раковых клеток, причем указанный способ включает воздействие на образец от пациента с подозрением на содержание CD47-экспрессирующих раковых клеток антителом против CD47 и определение связывания антитела с образцом. Для данного применения в настоящем изобретении предложен набор, содержащий антитело и инструкции по применению антитела.

Антитела согласно настоящему изобретению являются особенно эффективными в лечении заболевания, например, для увеличения фагоцитоза CD47-экспрессирующих клеток. Лечение может быть системным или локализованным, например доставка посредством внутриопухолевой инъекции и т.д.

Варианты реализации настоящего изобретения включают выделенные антитела и их производные и фрагменты, которые содержат по меньшей мере 3 последовательности CDR, представленные в настоящем документе, обычно в комбинации с каркасными последовательностями из вариабельной области человека. Согласно некоторым вариантам реализации антитело содержит по меньшей мере одну легкую цепь, содержащую 3 последовательности CDR легкой цепи, предложенные в настоящем документе, расположенные в каркасном участке вариабельной области, который может представлять собой, без ограничения, каркасный участок вариабельной области человека или мыши, и по меньшей мере одну тяжелую цепь, содержащую 3 последовательности CDR тяжелой цепи, предложенные в настоящем документе, расположенные в каркасном участке вариабельной области, который может представлять собой, без ограничения, каркасный участок вариабельной области человека или мыши.

Согласно другим вариантам реализации антитело содержит вариант последовательности аминокис-

лот CDR предложенных антител, причем указанный вариант содержит одну или несколько вставок аминокислот в пределах или вблизи от остатка CDR и/или делеций в остатке CDR или вблизи остатка CDR, и/или замен остатка CDR (причем замены являются предпочтительным типом изменения аминокислоты для получения таких вариантов). Такие варианты будут обычно характеризоваться аффинностью связывания в отношении CD47 человека, составляющей по меньшей мере приблизительно 10^{-8} М, такой как, например, аффинность связывания с CD47 человека от 2 до 15 нМ, нарушающая взаимодействие CD47 человека с SIRP α , и будут связываться с тем же эпитопом, что и антитело, содержащее последовательность аминокислот из числа представленных в настоящем документе. В настоящем документе рассмотрены различные формы антител. Например, антитело может представлять собой полноразмерное антитело, например, содержащее константную область иммуноглобулина человека любого изотипа, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, более предпочтительно IgG4, необязательно с мутацией или мутациями, или фрагмент антитела, например F(ab')₂-фрагмент, F(ab)-фрагмент и т.д. Кроме того, антитело можно пометить обнаруживаемой меткой, иммобилизовать на твердой фазе и/или конъюгировать с гетерологичным соединением.

Варианты реализации настоящего изобретения включают антитела против CD47 (i) с существенным нарушением взаимодействия CD47 человека с SIRP α вне зависимости от изотипа антитела (и эффекторной функции), (ii) обеспечивающие эффективный фагоцитоз CD47-экспрессирующих опухолевых клеток макрофагами человека моноцитарного происхождения, (iii) с оптимизированным значением Koff, составляющим от $1,0 \times 10^{-4}$ с⁻¹ до $1,0 \times 10^{-3}$ с⁻¹ (что обеспечивает низкий эффект поглощения и большую доступность CD47-несущих раковых клеток более высокой плотности для антител), и/или (iv) демонстрирующие ингибирование роста опухоли на ксенотрансплантатных моделях на мышах, сверхэкспрессирующих мишень CD47. Предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения представляет собой группу антител против CD47, которые дополнительно демонстрируют слабую активность в отношении агглютинации красных клеток крови, что дополнительно свидетельствует о низкой токсичности (кандидаты №№ 19, 33, 20) и/или не вызывают (или лишь незначительно вызывают) апоптоз клеток Юркат (кандидаты №№ 7, 19, 20, 22, 33). Кроме того, более предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения представляет собой группу антител против CD47, которые дополнительно связываются с гликозилированным и негликозилированным CD47 вне клетки или связываются с его иммунологически активным и гликозилированным и негликозилированным фрагментом. Кроме того, более предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения представляет собой группу антител против CD47, которые связываются с мономером и димером CD47. Кроме того, более предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения представляет собой группу антител против CD47, которые связываются с конкретным эпитопом на CD47, т.е., в частности, с прерывистым эпитопом, который содержит K59, R63, Y66, T67, H108, T109, T117 и T120 CD47 человека, пронумерованные согласно SEQ ID NO: 151 (например, кандидат 20 и его гуманизированная и модифицированная версии). Другой пример варианта реализации настоящего изобретения представляет собой группу антител против CD47, которые связываются с конкретным эпитопом на CD47, т.е., в частности, с прерывистым эпитопом, который содержит K59, K61, S107, H108, T117, T120 и R121 CD47 человека, пронумерованные согласно SEQ ID NO: 151 (например, кандидат 22 и его гуманизированная и модифицированная версии).

Варианты реализации настоящего изобретения включают антитела против CD47 (i) с существенным нарушением взаимодействия CD47 человека с SIRP α вне зависимости от изотипа антитела (и эффекторной функции), (ii) обеспечивающие эффективный фагоцитоз CD47-экспрессирующих опухолевых клеток макрофагами человека моноцитарного происхождения, (iii) с оптимизированным значением Koff от $1,0 \times 10^{-4}$ с⁻¹ до $1,0 \times 10^{-3}$ с⁻¹ (что обеспечивает низкий эффект поглощения и большую доступность CD47-несущих раковых клеток более высокой плотности для антител), (iv) демонстрирующие ингибирование роста опухоли на ксенотрансплантатных моделях на мышах, сверхэкспрессирующих мишень CD47, и/или (v) и комбинации CDR, представленные в табл. 2 и 3 ниже, причем вплоть до 5, более предпочтительно, вплоть до 4, 3, 2 или 1 аминокислоты в одном или нескольких CDR заменены другими аминокислотами, такими как, например, консервативные замены, причем, однако, общий профиль антитела, например элементы с (i) по (iv) выше, является неизменным или аналогичным, т.е. находится в пределах диапазона стандартной биологической дисперсии 10%. В настоящем изобретении также предложены выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитела, и ее варианты, вектор, содержащий такую нуклеиновую кислоту, необязательно функционально связанную с контрольными последовательностями, которые распознаются клеткой-хозяином, трансформированной данным вектором, клетка-хозяин, содержащая данный вектор, способ получения антитела, включающий культивирование клетки-хозяина таким образом, чтобы экспрессировалась нуклеиновая кислота, и необязательно восстановление антитела из культуры клетки-хозяина (например, из культуральной среды клетки-хозяина). В настоящем изобретении также предложена композиция, содержащая одно или несколько антител против CD47 человека и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Данная композиция для терапевтического применения является стерильной и может являться лиофилизированной, например предложенной в виде флаконки состава на одну дозу с разбавителем, и устройством для доставки, например ингалятором, шпри-

цем и т.д.

Краткое описание чертежей

Прилагаемые чертежи не предполагалось делать в масштабе. Фигуры являются исключительно иллюстративными и не являются необходимыми для реализации настоящего раскрытия. Для ясности на чертеже могут быть отмечены не все элементы.

Фиг. 1 - ингибирование связывания hSIRPα с hCD47, экспрессируемым на клетках CHO, антителами против CD47;

фиг. 2 - профили связывания антител против CD47 с hCD47, экспрессируемым на клетках Раджи;

фиг. 3 - ингибирование связывания hSIRPα с hCD47, экспрессируемым на клетках Раджи, антителами против CD47;

фиг. 4 - усиление фагоцитоза клетки Раджи макрофагами человека с помощью антител против CD47;

фиг. 5 - агглютинация очищенных кКК (красных клеток крови) человека антителами против CD47;

фиг. 6 - профили ассоциации и диссоциации антител против CD47 с hCD47, измеренные методом ППР (поверхностного плазменного резонанса);

фиг. 7 - последовательности аминокислот 5 гуманизированных вариантов VH (VH1-VH5), выровненные с последовательностью VH мыши кандидата 20 (VHO). CDR подчеркнуты (с использованием объединенного определения согласно Кэботу и IMGT);

фиг. 8 - последовательности аминокислот 5 гуманизированных вариантов VL (VL1-VL5), выровненные с последовательностью VL мыши кандидата 20 (VLO). CDR подчеркнуты (с использованием объединенного определения согласно Кэботу и IMGT);

фиг. 9 - эффект антител против CD47 в отношении А) роста клеток лимфомы Раджи человека на мышцах NOG и В) выживаемости мышей NOG после трансплантации клеток опухоли Раджи (*p<0,05; **p<0,005; критерий Кокса-Мантеля);

фиг. 10 - эффект кандидата 20 против CD47 в монотерапии или в комбинации с Герцептином® или Эрбитуксом® в отношении роста опухолей яичников A2780/Luc человека на мышцах NOG. Клетки A2780/Luc трансплантировали интраперитонеально (и.п.) мышам NOG (n=4/группу) и лечение антителом начинали через 1 день после трансплантации и продолжали в течение вплоть до 5 недель (3 инъекции/неделю и.п.) в дозе 10 мг/кг. (А) Вентральная и дорзальная люминесценция, наблюдавшаяся у каждой мыши в день 28. (В) Количественное определение интенсивности биолюминесценции (дорзальной + вентральной), отложенное на графике в зависимости от времени после трансплантации опухоли. Группы лечения сравнивали с группой наполнителя в день 28 с применением неспаренного t-критерия программного обеспечения GraphPad Prism (**p<0,005; ***p<0,001);

фиг. 11 - эффект кандидата 20 против CD47 в монотерапии или в комбинации с Герцептином® или Эрбитуксом® в отношении роста опухолевых клеток легких A549 человека на мышцах NOG. Клетки A549 трансплантировали подкожно мышам NOG (n=4/группу), лечение антителом начинали, когда опухоль становилась пальпируемой (день 10), и продолжали в течение вплоть до 10 недель (3 инъекции/неделю, и.п.) в дозе 10 мг/кг. (А) Рост клеток опухоли, измеренный методом определения среднего объема опухоли ± СО (стандартное отклонение, см³) для каждой группы, отложенный на графике в зависимости от времени после трансплантации опухоли. Группы лечения сравнивали с группой наполнителя с применением способа Т/С на основе частоты (rate-based T/C method), описанного в публикации Hather et al. (Hather G., Liu R., Bandi S., Mettetal I, et al. "Growth Rate Analysis and Efficient Experimental Design for Tumor Xenograft Studies." Cancer Informatics 13(S4):65-72 (2014)), (*p<0,05; **p<0,005). (В) Кривые выживаемости мышей. Группы лечения сравнивали с группой наполнителя с применением логарифмического рангового критерия (Кокса-Мантеля) программного обеспечения GraphPad Prism (*p<0,05; **p<0,01);

фиг. 12 - связывание гуманизированных вариантов кандидата 20 против CD47 на клетках Раджи методом проточной цитометрии. Гуманизированные варианты с мутацией VL-CDR2-F56Y (CDR2 с SEQ ID NO: 152 (Кэбот) и 153 (IMGT), т.е. кандидатов 20.26 (h20-H2-L5Y), 20.27 (h20-H3-L2Y), 20.28 (h20-H3-L3Y), 20.29 (h20-H4-L4Y), 20.30 (h20-H4-L5Y)) сравнивали с соответствующими вариантами без мутации F56Y - кандидатами 20.10 (h20-H2-L5), 20.12 (h20-H3-L2), 20.13 (h20-H3-L3), 20.19 (h20-H4-L4), 20.20 (h20-H4-L5)) и с химерным кандидатом 20 (все антитела в формате IgG4 человека);

фиг. 13 - ингибирование связывания hSIRPα с hCD47 на клетках Раджи гуманизированными вариантами кандидата 20 против CD47. Гуманизированные варианты с мутацией VL-CDR2-F56Y (CDR2 с SEQ ID NO: 152 (Кэбот) и 153 (IMGT), т.е. кандидатов 20.26 (h20-H2-L5Y), 20.27 (h20-H3-L2Y), 20.28 (h20-H3-L3Y), 20.29 (h20-H4-L4Y), 20.30 (h20-H4-L5Y)) сравнивали с соответствующими вариантами без мутации F56Y - кандидатами 20.10 (h20-H2-L5), 20.12 (h20-H3-L2), 20.13 (h20-H3-L3), 20.19 (h20-H4-L4), 20.20 (h20-H4-L5));

фиг. 14 - сравнение гуманизированных вариантов VL-CDR2-F56Y кандидата 20 (т.е. кандидатов 20.26 (h20-H2-L5Y), 20.27 (h20-H3-L2Y), 20.28 (h20-H3-L3Y), 20.29 (h20-H4-L4Y), 20.30 (h20-H4-L5Y)) с антителами AB06.12 и Hu5F9 в анализе связывания CD47 и в анализе взаимодействия CD47/SIRPα на

клетках Раджи;

фиг. 15 - картирование эпитопа взаимодействия между кандидатом 20 и hCD47;

фиг. 16 - картирование эпитопа взаимодействия между кандидатом 22 и hCD47;

фиг. 17 - анализ растворимого hCD47 методом эксклюзионной ВЭЖХ продемонстрировал гетерогенность препарата белка с присутствием мономера и димера CD47;

фиг. 18 - анализ очищенных фракций мономера и димера hCD47 методом ДСН-ПААГ (электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) при ~30 кДа и >50 кДа соответственно;

фиг. 19 - распознавание мономера и димера hCD47 кандидатами 20 и 22 посредством связывания ELISA;

фиг. 20 - высвобождение антител против CD47 после связывания с кКК. Сначала кКК человека окрашивали 1 мкг/мл кандидатов 14, 19, 20, 22 мыши против CD47 или антителом мыши 2A1 или B6H12 при температуре +4°C. После промывки кКК инкубировали в течение 6 ч (T+6 ч) или в течение 24 ч (T+24 ч) при температуре +37°C в среде, не содержащей антитела, и остаточные уровни антител мыши против CD47, оставшихся на кКК, обнаруживали с применением конъюгированного с ФЭ (фикоэритрином) антитела против IgG мыши и проточной цитометрии. Результаты выражали в виде % снижения средней интенсивности флуоресценции (СИФ), измеренного в T+6 ч или T+24 ч на кКК, окрашенных антителом против CD47, по сравнению с СИФ, полученной в случае окрашивания кКК тем же антителом до 6 и 24 ч инкубации (T0);

фиг. 21 - высвобождение антител против CD47 после связывания с клетками Раджи и уменьшение фагоцитоза опухолевых клеток Раджи после их окрашивания антителами против CD47. (А) Сначала клетки лимфомы Раджи окрашивали 1 мкг/мл кандидатов 14, 19, 20, 22 мыши против CD47 или антителом мыши 2A1 или B6H12. После промывки клетки Раджи инкубировали в течение 24 ч (T+24 ч) при температуре +37°C в среде, не содержащей антитела, затем промывали и фиксировали 4% ПФА (параформальдегидом). После этого остаточные уровни антител мыши против CD47, оставшихся на клетках Раджи, обнаруживали с применением конъюгированного с ФЭ антитела против IgG мыши и проточной цитометрии. Результаты выражали в виде % снижения средней интенсивности флуоресценции (СИФ), измеренного в момент времени T+24 ч на клетках, окрашенных антителом против CD47, по сравнению с СИФ, полученной в случае окрашивания фиксированных в ПФА клеток Раджи тем же антителом до 24 ч инкубации (T0). (В) Сначала меченные CFSE (5(6)-карбоксифлуоресцеин N-гидроксисукцинимидил сложный эфир) клетки лимфомы Раджи окрашивали 0,1 или 1 мкг/мл кандидатов 14, 19, 20, 22 мыши против CD47 или антителом мыши 2A1 или B6H12. После промывки клетки Раджи инкубировали в течение 24 ч (T+24 ч) при температуре +37°C в среде, не содержащей антитела, затем промывали и исследовали в анализе фагоцитоза методом проточной цитометрии с помощью меченных Far-Red макрофагов человека (hMDM). Результаты выражали в виде % снижения фагоцитоза, измеренного в T+24 ч для клеток Раджи, окрашенных антителом против CD47, по сравнению с фагоцитозом клеток Раджи, окрашенных тем же антителом до периода инкубации 24 ч (T0);

фиг. 22 - распознавание гликозилированного (А) и N-дегликозилированного (В) CD47 человека химерными кандидатами 20 и 22, гуманизированным антителом h20-H2L5Y и гуманизированными антителами Hu5F9 и AB06.12, измеренное методом ELISA на планшетах, сенсibilизированных гликозилированным или N-дегликозилированным hCD47. Все антитела исследовали в формате hu-IgG4;

фиг. 23 - эффективность гуманизированного антитела h20-H2L5Y в монотерапии или в комбинации с Герцептином® на ксенотрансплантатной модели НМКРЛ (немелкоклеточного рака легких) A549 на мышцах NOG. Клетки A549 трансплантировали подкожно мышам NOG (n=8 на группу), лечение антителом начинали, когда размер опухоли составлял приблизительно 100 мм³ (день 14), и продолжали в течение вплоть до 10 недель. Антитела инъецировали и.п. (3 инъекции/неделю), причем h20-H2L5Y инъецировали в формате hu-IgG4 (h20-H2L5Y-G4) в дозе 10 мг/кг/дозу, а Герцептин® (hu-IgG1) инъецировали в дозе 2,5 мг/кг/дозу. Контролировали выживаемость мышей, представлены кривые выживаемости. Группы лечения сравнивали с группой наполнителя с применением логарифмического рангового критерия (Кокса-Мантеля) программного обеспечения GraphPad Prism (*p<0,05; ***p<0,005). Выживаемость мышей, получавших лечение комбинацией h20-H2L5Y-G4 и Герцептина®, была в значительной степени увеличена по сравнению с группой, получавшей лечение монотерапией Герцептином® (p<0,01);

фиг. 24 - эффективность гуманизированного антитела h20-H2L5Y в монотерапии или в комбинации с Герцептином® на желудочной ксенотрансплантатной модели NCI-N87 на мышцах NOG. Клетки NCI-N87 (10×10⁶) трансплантировали подкожно мышам NOG (n=8 на группу), лечение антителом начинали, когда размер опухоли составлял приблизительно 100 мм³ (день 7), и продолжали в течение вплоть до 5 недель. Антитела инъецировали и.п. (3 инъекции/неделю), причем h20-H2L5Y инъецировали в формате hu-IgG4-S228P-L235E (h20-H2L5Y-G4PE) в дозе 10 мг/кг/дозу, а Герцептин® (hu-IgG1) инъецировали в дозе 2,5 мг/кг/дозу. Рост клеток опухоли контролировали посредством измерения объема опухоли. Для каждой группы представляли средний объем опухоли (см³) ± СО для различных периодов времени до гибели или умерщвления первой мыши в соответствующих группах. Группы лечения сравнивали с группой наполнителя с применением способа Т/С на основе частоты, описанного в публикации Hather et

al. (Hather G., Liu R., Bandi S., Mettetal J., et al. "Growth Rate Analysis and Efficient Experimental Design for Tumor Xenograft Studies". *Cancer Informatics* 13(S4):65-72 (2014)), (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0005$). Рост опухолевых клеток NCI-N87 был также в значительной степени снижен в группе животных, получавших лечение комбинацией h20-H2L5Y-G4PE с Герцептином®, по сравнению с животными, получавшими лечение Герцептином® в монотерапии ($p < 0,05$).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, специфичным в отношении CD47. Также раскрыты нуклеотидные и аминокислотные последовательности таких антител. Антитела находят применение в терапевтических и диагностических способах, связанных с CD47.

"Лечение" означает как терапевтическое лечение, так и профилактические или превентивные меры. Лица, нуждающиеся в лечении, включают лиц, уже страдающих от расстройства, а также лиц, у которых расстройство необходимо предотвратить.

"Млекопитающее" в контексте лечения означает любое животное, которое классифицируют как млекопитающее, включая людей, одомашненных и сельскохозяйственных животных и животных, содержащихся в зоопарке, используемых в видах спорта или домашних животных, таких как собаки, лошади, кошки, коровы и т.д. В предпочтительном варианте млекопитающее представляет собой человека.

Термин "антитело" используется в наиболее широком смысле и конкретно включает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антитела при условии, что они демонстрируют желаемую биологическую активность. "Антитела" (АТ) и "иммуноглобулины" (Ig) представляют собой гликопротеины, которые обладают одинаковыми структурными характеристиками. Несмотря на то, что антитела демонстрируют специфичность связывания с конкретным антигеном, иммуноглобулины включают как антитела, так и другие антителоподобные молекулы, у которых отсутствует антигенная специфичность. Полипептиды последнего типа, например, продуцируются на низких уровнях лимфатической системой и на повышенных уровнях - миеломами.

В настоящем изобретении термин "эпитоп" означает любую антигенную детерминанту на антигене, с которой связывается паратоп антитела. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно обладают специфичными трехмерными структурными характеристиками, а также специфичными характеристиками заряда.

"Нативные антитела и иммуноглобулины" обычно представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины молекулярной массой приблизительно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь присоединена к тяжелой цепи одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как количество дисульфидных связей между тяжелыми цепями у различных изотипов иммуноглобулинов варьирует. Каждая из тяжелой и легкой цепей также содержит равномерно распределенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь содержит на одном конце переменный домен (VH), за которым расположено некоторое количество константных доменов. Каждая легкая цепь на одном конце содержит переменный домен (VL), а на другом конце - константный домен; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, и переменный домен легкой цепи выровнен с переменным доменом тяжелой цепи. Считают, что конкретные остатки аминокислот образуют поверхность контакта между переменными доменами легкой и тяжелой цепей (Clothia C., Novotny J., Bruccoleri R., Karplus M. "Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains". *J. Mol. Biol.* 186:651-63 (1985); Novotny J. and Haber E. "Structural invariants of antigen binding: comparison of immunoglobulin VL-VH and VL-VL domain dimers". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:4592-96 (1985)).

Термин "переменный" означает, что определенные части переменных доменов в значительной степени отличаются по последовательности у разных антител и вносят вклад в связывание и специфичность каждого конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Однако переменность не распределена равномерно на протяжении переменных доменов антитела. Она сконцентрирована в трех сегментах, называемых участками, определяющими комплементарность (complementarity-determining regions, CDR), или гиперпеременными участками, в переменных доменах легкой цепи и тяжелой цепи. Более высоко консервативные части переменных доменов называют каркасными участками (FR). Каждый переменный домен нативных тяжелой и легкой цепей содержит четыре участка FR, чаще всего принимающих конфигурацию β -слоя, соединенные тремя CDR, которые образуют соединяющие петли, а в некоторых случаях образуют часть структуры β -слоя. CDR в каждой цепи удерживаются вместе в тесной близости участками FR и вместе с CDR, образующими другую цепь, способствуют формированию антигенсвязывающего участка антитела (номенклатуру согласно Кэботу см. в публикации Kabat E.A. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) или номенклатуру IMGT см. по ссылке <http://www.imgt.org>). Константные домены непосредственно не участвуют в связывании антитела с антигеном, но демонстрируют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ).

Последовательности CDR иллюстративных комбинаций тяжелой и легкой цепей против CD47 представлены в перечне последовательностей, включая SEQ ID NO: 1-120, 152, 153 (см. табл. 2 и 3 выше).

Расщепление антител папаином позволяет получить два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемые "Fab"-фрагментами, каждый из которых содержит один антигенсвязывающий сайт, и остаточный "Fc"-фрагмент, название которого отражает его способность с легкостью кристаллизоваться. Обработка пепсином позволяет получить $F(ab')_2$ -фрагмент, который содержит два антигенсвязывающих сайта и является способным к перекрестному связыванию с антигеном.

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный участок распознавания и связывания антигена. В двухцепочечных молекулах Fv данная область состоит из димера переменных доменов одной тяжелой и одной легкой цепей в прочной нековалентной ассоциации. В одноцепочечных молекулах Fv (scFv) переменный домен одной тяжелой и одной легкой цепей может быть ковалентно связан гибким пептидным линкером, так что легкая и тяжелая цепи могут ассоциировать в "димерную" структуру, аналогичную таковой двухцепочечных молекул Fv. В данной конфигурации три CDR каждого переменного домена взаимодействуют для определения антигенсвязывающего сайта на поверхности димера VH-VL. В совокупности шесть CDR обеспечивают антигенсвязывающую специфичность антитела. Однако даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичных в отношении антигена) обладает способностью распознавать антиген и связываться с ним, хотя и с меньшей аффинностью, чем полный участок связывания. Обзор scFv см. в публикации Plückthun A. *Antibodies from Escherichia coli*, in "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", by Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, vol. 113, pp. 269-315 (1994).

Fab-фрагмент также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков на карбоксильном конце тяжелой цепи домена CH1, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH в настоящем документе представляет собой обозначение Fab', в котором остаток или остатки цистеина константных доменов несут свободную тиольную группу. $F(ab')_2$ -фрагменты антитела изначально получали в виде пар Fab'-фрагментов, которые содержали между собой шарнирные цистеины. Также известны другие химические присоединения фрагментов антитела.

Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из данных классов можно дополнительно разделить на подклассы (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называют α , δ , ϵ , γ и μ соответственно.

Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

"Фрагмент антитела" и все грамматические варианты этого термина в настоящем документе означают часть интактного антитела, содержащую антигенсвязывающий сайт или переменную область интактного антитела, причем указанная часть не содержит константных доменов тяжелой цепи (т.е. CH2, CH3 и CH4 в зависимости от изотипа антитела) Fc-области интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$ и Fv-фрагменты, диатела, любой фрагмент антитела, который представляет собой полипептид, который характеризуется первичной структурой, состоящей из одной непрерывной последовательности последовательных остатков аминокислот (обозначается в настоящем документе как "одноцепочечный фрагмент антитела" или "одноцепочечный полипептид"), включая, без ограничения (1) одноцепочечные молекулы Fv (scFv) (2) одноцепочечные полипептиды, содержащие только один переменный домен легкой цепи или его фрагмент, который содержит три CDR переменного домена легкой цепи, без присоединения фрагмента тяжелой цепи и (3) одноцепочечные полипептиды, содержащие только одну переменную область тяжелой цепи или ее фрагмент, который содержит три CDR переменной области тяжелой цепи, без присоединения фрагмента легкой цепи, и мультиспецифичные или мультивалентные структуры, образованные из фрагментов антитела. Во фрагменте антитела, содержащем одну или несколько тяжелых цепей, тяжелая цепь или цепи могут содержать любую последовательность константного домена (например, CH1 в изотипе IgG), обнаруженную в области интактного антитела, отличной от Fc, и/или могут содержать любую последовательность шарнирной области, обнаруженную в интактном антителе, и/или могут содержать последовательность лейциновой молнии, слитую с последовательностью шарнирной области или последовательностью константного домена тяжелой цепи или цепей либо расположенную в указанных последовательностях.

Если конкретно не указано обратное, термин "конъюгат", как описано и заявлено в настоящем документе, определен как гетерогенная молекула, образованная в результате ковалентного присоединения одного или нескольких фрагментов антитела к одной или нескольким молекулам полимера, причем гетерогенная молекула является водорастворимой, т.е. растворимой в физиологических жидкостях, таких как кровь, и причем гетерогенная молекула не содержит каких-либо структурированных агрегатов. Конъюгат, представляющий интерес, представляет собой ПЭГ (полиэтиленгликоль). В контексте приведенного выше определения термин "структурированный агрегат" означает (1) любой агрегат молекул в водном растворе, который характеризуется сферической или каркасной сферической структурой, в результате

которой гетерогенная молекула не находится в мицелле или другой эмульсионной структуре и не заякорена в липидный бислой, везикулу или липосому; и (2) любой агрегат молекул в твердой или нерастворимой форме, такой как матрикс хроматографических гранул, который не высвобождает гетерогенную молекулу в раствор после осуществления контакта с водной фазой. Соответственно, термин "конъюгат", определенный в настоящем документе, включает вышеупомянутые гетерогенные молекулы в преципитате, осадке, биоразлагаемой матрице или другом твердом веществе, способном высвобождать гетерогенную молекулу в водный раствор после гидратации твердого вещества.

Термин "моноклональное антитело" (МАТ) в настоящем документе означает антитело, полученное из популяции, по существу, гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в малых количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, будучи направленными против единственного антигенного сайта. Каждое МАТ направлено против одной детерминанты на антигене. В дополнение к специфичности преимущество моноклональных антител заключается в том, что они могут синтезироваться культурой гибридомы или линиями клеток млекопитающих, не загрязненными другими антителами. Модификатор "моноклональный" показывает характер антитела как полученного, по существу, из гомогенной популяции антител не должен рассматриваться как требующий получения антитела с помощью какого-либо конкретного способа. Например, моноклональные антитела, которые будут применять в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены в immortalized В-клетке или ее гибридоме либо могут быть получены с помощью способов с использованием рекомбинантной ДНК.

Моноклональные антитела в настоящем документе включают гибридные и рекомбинантные антитела, полученные в результате сплайсинга переменного (включая гиперпеременного) домена антитела против CD47 с константным доменом (например, "гуманизированные" антитела), или легкой цепи с тяжелой цепью, или цепи от одного вида с цепью от другого вида, или в результате слияний с гетерологичными белками вне зависимости от вида их происхождения или обозначения класса либо подкласса иммуноглобулина, а также фрагменты антитела (например, Fab, F(ab')₂ и Fv) при условии, что они демонстрируют желаемую биологическую активность.

Моноклональные антитела в настоящем документе включают, в частности, "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям антител, полученным из конкретных видов или принадлежащим конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи или цепей является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных от других видов или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител при условии, что они демонстрируют желаемую биологическую активность.

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или восстановлено из компонента его природного окружения. Загрязняющие компоненты из его естественного окружения являются материалами, которые будут препятствовать диагностическому или терапевтическому применению антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Согласно некоторым вариантам реализации антитело очищают (1) до более 75 мас.% антитела, что определяют методом Лоури, и наиболее предпочтительно до более 80, 90 или 99 мас.%; или (2) до гомогенности по результатам анализа методом ДСН-ПААГ в редуцирующих или нередуцирующих условиях с использованием кумасси голубого или предпочтительно окрашивания серебром. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент природного окружения антитела не будет присутствовать. Однако обычно выделенное антитело получают по меньшей мере за одну стадию очистки.

Термин "с эпитопной меткой" при использовании в настоящем документе означает антитело против CD47, слитое с "эпитопной меткой". Полипептид эпитопной метки содержит достаточное количество остатков для обеспечения эпитопа, против которого может быть получено антитело, и при этом является достаточно коротким, чтобы не препятствовать активности антитела против CD47. Эпитопная метка предпочтительно является в достаточной степени уникальной, чтобы антитело, специфичное в отношении эпитопа, по существу, перекрестно не реагировало с другими эпитопами. Подходящие полипептиды-метки, как правило, содержат по меньшей мере 6 остатков аминокислот и обычно приблизительно 8-50 остатков аминокислот (предпочтительно приблизительно 9-30 остатков). Примеры включают метку с-мус и антитела против данной метки 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 и 9E10 (Evan G.I., Lewis G.K., Ramsay G., et al. "Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product", *Mol. Cell. Biol.* 5(12):3610-3616 (1985)); и метку гликопротеина D (gD) вируса простого герпеса и антитело против данной метки (Paborsky L.R., Fendly B.M., Fisher K.L., et al. "Mammalian cell transient expression of tissue factor for the production of antigen", *Protein Engineering* 3(6):547-553 (1990)).

Термин "метка" в настоящем документе означает обнаруживаемое соединение или композицию, непосредственно или опосредованно конъюгированные с антителом. Метка может быть обнаруживаемой сама по себе (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или в случае ферментной метки может катализировать химическое изменение субстрата соединения или композиции, который

является детектируемым.

Под "твердой фазой" понимают неводную матрицу, к которой может присоединяться антитело согласно настоящему изобретению. Примеры твердых фаз, охватываемых настоящим документом, включают в себя твердые фазы, частично или полностью сформированные из стекла (например, стекло с контролируемым размером пор), полисахариды (например, агарозу), полиакриламиды, полистирол, поливиниловый спирт и силиконы. Согласно определенным вариантам реализации в зависимости от контекста твердая фаза может включать лунку планшета для анализа; согласно другим вариантам реализации твердая фаза представляет собой колонку для очистки (например, колонку для аффинной хроматографии). Данный термин также включает в себя прерывающуюся твердую фазу из дискретных частиц, таких как описанные в патенте США № 4275149.

Гликозилирование CD47.

CD47 подвергается посттрансляционным модификациям, главным образом, гликозилированию. CD47 содержит множество сайтов N-концевого гликозилирования, которые могут непосредственно влиять на экспонирование на поверхности клетки и регулировать взаимодействие с внеклеточными лигандами. Например, дегликозилированный CD47 характеризуется большей авидностью в отношении SIRP α , чем гликозилированный CD47, и наоборот, дегликозилированный SIRP α характеризуется большей авидностью в отношении CD47 (Subramanian S., Boder E.T., and Discher D.E. "Phylogenetic divergence of CD47 interactions with human signal regulatory protein α reveals locus of species specificity." *J. Biol. Chem.* 282(3): 1805-18 (2007); Subramanian S., Parthasarathy R., Sen S., Boder E.T., and Discher D.E. "Species and cell type-specific interactions between CD47 and human SIRP α ". *Blood* 107(6):2548-56 (2006)). Наоборот, гипергликозилированный SIRP α может нарушить взаимодействия CD47/SIRP α (Ogura T., Noguchi T., Murai-takebe R., Hosooka T., Honma N., and Kasuga M. "Resistance of B16 melanoma cells to CD47-induced negative regulation of motility as a result of aberrant N-glycosylation of SHPS-1". *J. Biol. Chem.* 279(14): 13711-20 (2004)). Следует отметить, что сайт-направленный мутагенез сайтов N-связанного гликозилирования на моделях на дрожжах ингибировал локализацию CD47 на поверхности клетки (Parthasarathy R., Subramanian S., Boder E.T., and Discher D.E. "Post-Translational Regulation of Expression and Conformation of an Immunoglobulin Domain in Yeast Surface Display". *BioTech Bioin* 93(1): 159-68 (2006)), хотя на клетках CHO аналогичный мутагенез не оказывает влияния на локализацию CD47 человека на мембране (Subramanian et al., 2006 выше). Неправильное гликозилирование CD47 или SIRP α может также изменить нижестоящие ответы, причем избирательно гликозилированный SIRP α делает клетки меланомы B16 устойчивыми к CD47-индуцированному ингибированию подвижности (Ogura et al., 2004, выше). Кроме того, обильно гликозилированная (>250 кДа) форма CD47 была обнаружена в первичных и трансформированных Т-клетках, эндотелиальных клетках и клетках гладкой мускулатуры сосудов (Kaur S., Kuznetsova S.A., Pendrak M.L., Romeo M.I., Li Z., Zhang L., and Roberts D.D. "Heparan Sulfate Modification of the Transmembrane Receptor CD47 Is Necessary for Inhibition of T Cell Receptor Signaling by Thrombospondin-1", *J. Biol. Chem.* 286(17):14991-15002 (2011)). Данная модификация располагалась дистально от сайта связывания SIRP α , но являлась необходимой для опосредованной TSP-1 ингибиторной передачи сигналов в Т-клетках.

Поскольку опухолевые клетки могут экспрессировать неправильные паттерны гликозилирования, будет желательно обеспечить антитела против CD47, которые связываются с CD47 независимо от гликозилирования. Однако хотя известные соответствующие с терапевтической точки зрения антитела против CD47, как правило, эффективно связываются с гликозилированным CD47, они обычно слабо связываются (например, с меньшей авидностью связывания/с более высокой равновесной константой связывания или со сниженной максимальной связывающей способностью (B_{max})) с негликозилированным или дегликозилированным CD47.

Согласно одному аспекту антитела согласно настоящему изобретению связываются с гликозилированным и негликозилированным CD47. Например, согласно одному варианту реализации связывание антитела с CD47 не зависит от гликозилирования CD47. Это означает, что для надлежащего связывания антитела с CD47 гликозилирование CD47 не требуется, например антитело демонстрирует значительное специфичное связывание с CD47 вне зависимости от уровня гликозилирования CD47. Другими словами, связывание антитела с CD47, по меньшей мере, отчасти, в значительной степени или, по существу, не зависит от гликозилирования.

В настоящем документе "гликозилированный" CD47, как правило, означает CD47 (например, человека), который был N-гликозилирован по одному или нескольким остаткам. CD47 человека может быть N-гликозилированным по одному или нескольким остаткам (например, аспарагина) в положениях N23, N34, N50, N73, N111 и N206 в последовательности аминокислот CD47 человека (SEQ ID NO: 151). В предпочтительном варианте гликозилированный CD47 гликозилирован по меньшей мере в двух, трех, четырех, пяти или шести вышеуказанных положениях.

"Дегликозилированный" CD47 означает форму CD47, в которой были удалены одна или несколько цепей гликана (например, N-гликанов). Дегликозилирование CD47 можно обеспечить посредством обработки ферментом, таким как пептид-N-гликозидаза (ПНГаза), например ПНГазой F, которая удаляет N-

гликаны. Термины "негликозилированный" и "дегликозилированный" используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Таким образом, в негликозилированной или дегликозилированной форме, как правило, отсутствуют остатки гликанов в положениях N23, N34, N50, N73, N111 и/или N206 в последовательности аминокислот CD47 человека (SEQ ID NO: 151).

Согласно одному варианту реализации дегликозилирование CD47 в значительной степени не влияет на avidность/аффинность и/или максимальную связывающую способность антитела в отношении CD47 (человека). Avidность/аффинность и максимальную связывающую способность (V_{max}) антитела в отношении гликозилированной и дегликозилированной форм CD47 можно определить с применением стандартных анализов, например, представленных в примерах ниже. Аффинность антитела в отношении его эпитопа-мишени находится в обратной зависимости от его константы диссоциации. Константа диссоциации также может быть прямо пропорциональной значению EC_{50} в отношении связывания антитела с CD47. EC_{50} представляет собой концентрацию антитела, которая обеспечивает половину максимального связывания, т.е. при которой заняты 50% сайтов связывания на CD47. Также значение EC_{95} , представляющее собой концентрацию антитела, которая обеспечивает 95% максимального связывания, является показателем концентрации антитела, при которой заняты 95% сайтов связывания на CD47. Вне зависимости от используемого измерения согласно вариантам реализации настоящего изобретения важными являются относительные значения, полученные для гликозилированной и негликозилированной форм, т.е. не нужно обязательно определять абсолютное значение при условии, что гликозилированная и негликозилированная формы демонстрируют в достаточной степени аналогичные результаты.

Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации аффинность антитела в отношении негликозилированной и гликозилированной форм CD47 можно сравнить посредством определения соотношения значений EC_{50} или значений EC_{95} связывания антитела с каждой формой. В предпочтительном варианте данное соотношение меньше 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1, но для EC_{95} может быть даже выше, т.е. может составлять 25:1, 20:1, 10:1, предпочтительно может находиться в диапазоне от 10:1 до 1:10, более предпочтительно от 9:1 до 1:9, наиболее предпочтительно от 10:1 до 1:10. Другими словами, EC_{50} связывания антитела с негликозилированным CD47 может быть не более чем в 3 или 2 раза выше, чем значение EC_{50} связывания антитела с гликозилированным CD47. EC_{95} связывания антитела с негликозилированным CD47 может быть не более чем в 9 или 10 раз выше, чем значение EC_{95} связывания антитела с гликозилированным CD47. Согласно следующим вариантам реализации соотношение EC_{50} предпочтительно находится в диапазоне от 3:1 до 1:3 или от 2:1 до 1:2, наиболее предпочтительно от 3:1 до 1:3; или соотношение EC_{95} предпочтительно находится в диапазоне от 10:1 до 1:10, более предпочтительно от 9:1 до 1:9, наиболее предпочтительно от 10:1 до 1:10. Согласно таким вариантам реализации считают, что дегликозилирование в значительной степени не влияет на аффинность связывания, т.е. связывание антитела с CD47 не зависит от гликозилирования. Согласно некоторым вариантам реализации антитело связывается с негликозилированной формой CD47 (и предпочтительно как с негликозилированной, так и с гликозилированной формами CD47) с равновесной константой связывания 80 пМ или менее, предпочтительно 70 пМ или менее, более предпочтительно 60 пМ или менее.

Согласно другим вариантам реализации дегликозилирование CD47 в значительной степени не снижает максимальную связывающую способность антитела с CD47. Например, максимальную связывающую способность (т.е. V_{max_1}) можно определить для связывания антитела с гликозилированным CD47. V_{max_1} относится к уровню связывания антитела с CD47 при избыточной концентрации антитела, т.е. к максимальному уровню специфического связывания между антителом и CD47. Таким образом, V_{max_1} является показателем концентрации доступных сайтов связывания для антитела на гликозилированном CD47. Затем CD47 можно дегликозилировать (например, с применением ПНГазы) и снова определить уровень связывания с CD47 при избыточной концентрации антитела (при той же концентрации CD47 в образце). Вследствие этого максимальная связывающая способность (т.е. V_{max_2}) антитела в отношении дегликозилированного CD47 является показателем концентрации доступных сайтов связывания для антитела на дегликозилированном CD47.

Согласно предпочтительным вариантам реализации максимальная связывающая способность (т.е. V_{max_2}) антитела в отношении негликозилированного CD47 составляет по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70% от максимальной связывающей способности (т.е. V_{max_1}) антитела с гликозилированным CD47. Согласно таким вариантам реализации считают, что дегликозилирование в значительной степени не влияет на максимальную связывающую способность, т.е. связывание антитела с CD47 не зависит от гликозилирования.

Согласно следующим вариантам реализации свойства связывания антитела с гликозилированной и дегликозилированной формами CD47 можно сравнивать на основании соотношения значений EC_{95} . EC_{95} представляет собой концентрацию антитела, при которой заняты 95% сайтов связывания на CD47. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации аффинность антитела в отношении негликозилированной и гликозилированной форм CD47 можно сравнить посредством определения соотношения значений EC_{95} связывания антитела с каждой формой. В предпочтительном варианте данное соотношение меньше 10:1 или 9:1. Другими словами, EC_{95} связывания антитела с негликозилированным CD47 может быть не более чем в 10 или 9 раз выше, чем EC_{95} связывания антитела с гликозилированным CD47.

Кинетика диссоциации антитела.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены антитела против CD47, которые характеризуются скоростью диссоциации (Koff) от CD47 в пределах определенного диапазона. В частности, было продемонстрировано, что антитела против CD47 с высокой скоростью диссоциации, которые характеризуются значением Koff, превосходящим $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, интенсивно и быстро отсоединяются от кКК, но также быстро утрачивают большую часть своей функциональной активности в отношении опухолевых клеток, например, усиление фагоцитоза опухолевых клеток. Напротив, антитела против CD47 с очень медленной скоростью диссоциации, которые характеризуются значением Koff менее $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, более медленно отсоединяются от опухолевых клеток, но остаются присоединенными к кКК и могут, таким образом, характеризоваться эффектом поглощения и, возможно, большим количеством побочных эффектов.

Вследствие этого антитела против CD47 с промежуточной кинетикой диссоциации, которые характеризуются значением Koff от 1×10^{-4} до $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, обеспечивают оптимальное равновесие связывания/высвобождения CD47, т.е. обеспечивают слабый эффект поглощения и побочные эффекты при сохранении противоопухолевой эффективности. Соответственно, согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложено антитело, которое связывается с CD47, и значение Koff связывания с CD47 которого составляет от $1,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $1,0 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. Согласно конкретным вариантам реализации антитело может связываться с гликозилированным и/или негликозилированным CD47 со значением Koff в данном диапазоне. В предпочтительном варианте антитело характеризуется значением Koff связывания с (например, гликозилированным и/или негликозилированным) CD47 от $1,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $1,0 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, от $2,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $1,0 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, от $2,5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $1,0 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, от $2,5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $8,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, от $2,5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $5,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или от $3,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $4,5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$.

Антитела.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение направлено на моноклональные антитела мыши, гуманизированные или химерные моноклональные антитела, которые специфично связываются с CD47 человека, и линии клеток, которые продуцируют такие антитела. Такие антитела против CD47 согласно настоящему изобретению демонстрируют различные желательные характеристики для противораковой терапии (но не ограничиваясь ею), такие как существенное нарушение взаимодействия CD47-SIRPα вне зависимости от изотипа антитела (и эффекторных функций), быструю кинетику диссоциации со значениями Koff в диапазоне от $1,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $1,0 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, от $2,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $1,0 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, от $2,5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $8,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, от $2,5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $5,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или от $3,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $4,5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ (тогда как эталонные антитела демонстрируют меньшее значение Koff от $5,0$ до $8,9 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$). Кроме того, антитела согласно настоящему изобретению быстро высвобождаются после связывания с CD47 на красных клетках крови (тогда как эталонные антитела с меньшим значением Koff высвобождаются более медленно). Дополнительно антитела против CD47 согласно настоящему изобретению делают возможным эффективный фагоцитоз CD47-экспрессирующих опухолевых клеток макрофагами человека моноцитарного происхождения. Кроме того, антитела против CD47 согласно настоящему изобретению демонстрируют ингибирование роста опухоли на ксенотрансплантатных моделях на мышах, сверхэкспрессирующих мишень CD47. Кроме того, указанные антитела обладают по меньшей мере одной из следующих характеристик: нарушают взаимодействие CD47 с SIRPα, связываются с гликозилированным и негликозилированным CD47 с соотношением EC₅₀ для дегликозилированного CD47 по сравнению с гликозилированным CD47, не превышающим 3,0, и с соотношением EC₉₅ для дегликозилированного CD47 по сравнению с гликозилированным CD47, не превышающим 10,0, ингибируют передачу сигнала CD47-SIRPα, усиливают фагоцитоз определенных CD47-экспрессирующих клеток, не вызывают значительного уровня агглютинации клеток и находят применение в различных терапевтических и диагностических способах. Предпочтительными являются антитела, которые связываются с CD47 человека и которые представлены в формате IgG4 с необязательной мутацией или мутациями (например, заменой аминокислот для удаления Т-клеточного эпитопа или эпитопов даже в участке CDR, таком как CDR2). Предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения представляет собой группу антител против CD47, которые дополнительно демонстрируют слабую активность в отношении агглютинации красных клеток крови, что дополнительно свидетельствует о низкой токсичности (кандидаты №№ 19, 33, 20 (включая гуманизированные и дополнительно модифицированные антитела кандидата 20)), и/или не вызывают (или лишь незначительно вызывают) апоптоз клеток Юркат (кандидаты №№ 7, 19, 20 (включая гуманизированные и дополнительно модифицированные антитела кандидата 20), 22 (включая гуманизированные и дополнительно модифицированные антитела кандидата 22), 33). Кроме того, более предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения представляет собой группу антител против CD47, которые дополнительно связываются с гликозилированным и негликозилированным CD47 вне клетки или связываются с его иммунологически активным и гликозилированным и негликозилированным фрагментом. Кроме того, более предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения представляет собой группу антител против CD47, которые связываются с мономером и димером CD47, такого как CD47 человека. Кроме того, более предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения представляет собой группу анти-

тел против CD47, которые связываются с конкретным эпитопом на CD47, т.е. в частности, с прерывистым эпитопом, который содержит K59, R63, Y66, T67, H108, T109, T117 и T120 CD47 человека, пронумерованные согласно SEQ ID NO: 151 (например, кандидат 20 и его гуманизированные и модифицированные версии). Другой пример варианта реализации настоящего изобретения представляет собой группу антител против CD47, которые связываются с конкретным эпитопом на CD47, т.е. в частности, с прерывистым эпитопом, который содержит K59, K61, S107, H108, T117, T120 и R121 CD47 человека, пронумерованные согласно SEQ ID NO: 151 (например, кандидат 22 и его гуманизированные и модифицированные версии).

Предпочтительными кандидатами являются кандидаты 7, 14, 15, 19, 20, 22, 26 и 33. Еще более предпочтительными кандидатами являются 7, 19, 20, 22 и 33. Гораздо более предпочтительными кандидатами являются 20 и 22. Наиболее предпочтительным кандидатом является кандидат 20 (включая гуманизированные и дополнительно модифицированные антитела кандидата 20, т.е. кандидаты 20.1-20.30). Предложены CDR (согласно нумерации Кэбота (табл. 2) и IMGT (табл. 3)) и переменные области (табл. 1) иллюстративных антител (обозначенных в настоящем документе обычно по номеру (№) кандидата или названию антитела) (нумерация согласно IMGT является предпочтительной). Антитела, представляющие интерес, включают эти предложенные комбинации, а также слияния переменных областей с соответствующими константными областями или фрагментами константных областей, например, для получения F(ab)'-антител. Переменные области, представляющие интерес, включают по меньшей мере одну последовательность CDR предложенных антител против CD47, где CDR может содержать 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более аминокислот. В качестве альтернативы антитела, представляющие интерес, содержат переменную область, представленную в предложенных антителах, или пары последовательностей переменных областей, представленных в настоящем документе. Эти антитела могут представлять собой полноразмерные антитела, например, содержащие константную область иммуноглобулина человека любого изотипа, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, более предпочтительно IgG4, необязательно с мутацией или мутациями, например, в которых некоторые или все Т-клеточные эпитопы даже в пределах участка CDR заменены, например, молчащей консервативной аминокислотой или аминокислотами (см. также, например, экспериментальную часть), примеры, такие как мутации S228P и L235E, т.е. в которых мутации S228P и L235E введены во избежание потенциального обмена цепями и для снижения аффинности hIgG4 в отношении Fc-γ рецепторов соответственно.

Таблица 1

Выбранные кандидаты с указанием номера кандидата, названия антитела, SEQ ID NO варибельной области тяжелой цепи (VH) и SEQ ID NO варибельной области легкой цепи (VL)

Номер кандидата	Название антитела	SEQ ID NO варибельной области тяжелой цепи (в настоящем документе также обозначена «VH»)	SEQ ID NO варибельной области легкой цепи (в настоящем документе также обозначена «VL»)
7	VT008-AL5-10G7-10K7	121	122
14	VT008-AL6-14G1-16K1	123	124
15	VT008-AL6-18G1-18K21	125	126
19	VL008-AL17-7G1-7K6	127	128
20	VL008-AL18-14G4-14K1	129	130
22	VL008-AL13-8G5-8K3	131	132
26	VT008-AL6-10G3-10K1	133	134
29	VT008-AL6-20G7-20K7	135	136
30	VT008-AL6-39G2-39K2	137	138
33	VL008-AL17-8G5-8K7	139	140
20 1	H20-VH1-VL1	141	146
20 2	H20-VH1-VL2	141	147
20 3	H20-VH1-VL3	141	148
20 4	H20-VH1-VL4	141	149
20 5	H20-VH1-VL5	141	150
20 6	H20-VH2-VL1	142	146
20 7	H20-VH2-VL2	142	147
20 8	H20-VH2-VL3	142	148
20 9	H20-VH2-VL4	142	149
20 10	H20-VH2-VL5	142	150
20 11	H20-VH3-VL1	143	146
20 12	H20-VH3-VL2	143	147
20 13	H20-VH3-VL3	143	148
20 14	H20-VH3-VL4	143	149
20 15	H20-VH3-VL5	143	150

20.16	H20-VH4-VL1	144	146
20.17	H20-VH4-VL2	144	147
20.18	H20-VH4-VL3	144	148
20.19	H20-VH4-VL4	144	149
20.20	H20-VH4-VL5	144	150
20.21	H20-VH5-VL1	145	146
20.22	H20-VH5-VL2	145	147
20.23	H20-VH5-VL3	145	148
20.24	H20-VH5-VL4	145	149
20.25	H20-VH5-VL5	145	150
20.26	H20-VH2-VL5,Y; h20-H2-L5Y	142	159
20.27	H20-VH3-VL2,Y; h20-H3-L2Y	143	156
20.28	H20-VH3-VL3,Y; h20-H3-L3Y	143	157
20.29	H20-VH4-VL4,Y; h20-H4-L4Y	144	158
20.30	H20-VH4-VL5,Y; h20-H4-L5Y	144	159
20,Y	VL008-AL18-14G4-14K1, Y	129	154
22.1	H22-VH1-VL1	168	172
22.2	H22-VH1-VL2	168	173
22.3	H22-VH1-VL3	168	174
22.4	H22-VH1-VL4	168	175
22,5	H22-VH2-VL1	169	172
22.6	H22-VH2-VL2	169	173
22.7	H22-VH2-VL3	169	174
22.8	H22-VH2-VL4	169	175
22.9	H22-VH3-VL1	170	172
22.10	H22-VH3-VL2	170	173
22.11	H22-VH3-VL3	170	174
22.12	H22-VH3-VL4	170	175
22.13	H22-VH4-VL1	171	172
22.14	H22-VH4-VL2	171	173
22.15	H22-VH4-VL3	171	174
22.16	H22-VH4-VL4	171	175

Таблица 2

Выбранные кандидаты с указанием номера кандидата, названия антитела, SEQ ID NO CDR тяжелой цепи (VH) и SEQ ID NO CDR легкой цепи (VL) (номенклатура согласно Кэботу)

Номер кандидата	Название антитела	SEQ ID NO CDR1 VH	SEQ ID NO CDR 2 VH	SEQ ID NO CDR 3 VH	SEQ ID NO CDR 1 VL	SEQ ID NO CDR 2 VL	SEQ ID NO CDR 3 VL
7	VT008-AL5-10G7-10K7	1	2	3	7	8	9
14	VT008-AL6-14G1-16K1	13	14	15	19	20	21
15	VT008-AL6-18G1-18K21	25	26	27	31	32	33
19	VL008-AL17-7G1-7K6	37	38	39	43	44	45
20	VL008-AL18-14G4-14K1	49	50	51	55	56	57
22	VL008-AL13-8G5-8K3	61	62	63	67	68	69
26	VT008-AL6-10G3-10K1	73	74	75	79	80	81
29	VT008-AL6-20G7-20K7	85	86	87	91	92	93
30	VT008-AL6-39G2-39K2	97	98	99	103	104	105
33	VL008-AL17-8G5-8K7	109	110	111	115	116	117
20, откорректированный Т-клеточный эпитоп	VL008-AL18-14G4-14K1, откорректированный Т-клеточный эпитоп	49	50	51	55	152	57

Таблица 3

Выбранные кандидаты с указанием номера кандидата, названия антитела, SEQ ID NO CDR тяжелой цепи (VH) и SEQ ID NO CDR легкой цепи (VL) (номенклатура IMGT)

Номер кандидата	Название антитела	SEQ ID NO CDR1 VH	SEQ ID NO CDR 2 VH	SEQ ID NO CDR 3 VH	SEQ ID NO CDR 1 VL	SEQ ID NO CDR 2 VL	SEQ ID NO CDR 3 VL
7	VT008-AL5-10G7-10K7	4	5	6	10	11	12
14	VT008-AL6-14G1-16K1	16	17	18	22	23	24
15	VT008-AL6-18G1-18K21	28	29	30	34	35	36
19	VL008-AL17-7G1-7K6	40	41	42	46	47	48
20	VL008-AL18-14G4-14K1	52	53	54	58	59	60
22	VL008-AL13-8G5-8K3	64	65	66	70	71	72
26	VT008-AL6-10G3-10K1	76	77	78	82	83	84
29	VT008-AL6-20G7-20K7	88	89	90	94	95	96
30	VT008-AL6-39G2-39K2	100	101	102	106	107	108
33	VL008-AL17-8G5-8K7	112	113	114	118	119	120
20, откорректированный Т-клеточный эпителий	VL008-AL18-14G4-14K1, откорректированный Т-клеточный эпителий	52	53	54	58	153	60

Помимо Fab, в настоящем изобретении также предусмотрены меньшие фрагменты антитела и связывающие эпителий пептиды, обладающие специфичностью связывания в отношении по меньшей мере одного эпителий CD47, которые также можно применять в способах согласно настоящему изобретению. Например, одноцепочечные антитела можно сконструировать согласно способу патента США № 4946778, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Одноцепочечные антитела содержат переменные области легкой и тяжелой цепей, соединенные гибким линкерным фрагментом. Еще меньшим является фрагмент антитела, известный как однодоменное антитело, который содержит один выделенный домен VH. Методики получения однодоменного антитела, по меньшей мере, с некоторой специфичностью связывания интактного антитела, из которого оно было получено, известны в данной области техники. Например, в публикации Ward et al. (Ward S., Güssow D., Griffiths A.D., Jones P.T., and Winter G. "Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from Escherichia coli," Nature 341:544-46 (1989)) раскрыт способ скрининга для получения переменной области тяжелой цепи антитела (однодоменное антитело H) с достаточной аффинностью в отношении его эпителий-мишени для его связывания в выделенной форме.

Настоящее изобретение также обеспечивает выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие гуманизированные или химерные антитела против CD47, векторы и клетки-хозяева, содержащие нуклеиновую кислоту, и рекомбинантные методики получения антител. Нуклеиновые кислоты, представляющие интерес, могут быть идентичными последовательностям предложенных нуклеиновых кислот по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 99% или полностью идентичными. Такие непрерывные последовательности могут кодировать последовательность

CDR или могут кодировать полную вариабельную область. Как известно в данной области техники, последовательность вариабельной области может быть слита с последовательностью соответствующей константной области.

Для получения антител рекомбинантным способом нуклеиновую кислоту, кодирующую антитела, встраивают в реплицируемый вектор для последующего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. ДНК, кодирующую моноклональное антитело, с легкостью выделяют и секвенируют с применением общепринятых процедур (например, с применением олигонуклеотидных зондов, способных к специфичному связыванию с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела). Доступно множество векторов. Компоненты вектора, как правило, включают, без ограничения, один или несколько из следующих: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

Антитело против CD47 согласно настоящему изобретению может быть получено рекомбинантным способом не только напрямую, но также в виде слитого полипептида с гетерологичным или гомологичным полипептидом, который содержит сигнальную последовательность или другой полипептид, содержащий специфичный сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида, последовательность константной области иммуноглобулина и т.п. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность предпочтительно может являться таковой, которая распознается и процессируется (т.е. отщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. В случае прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют нативную сигнальную последовательность антитела, сигнальную последовательность заменяют выбранной прокариотической сигнальной последовательностью.

"Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена по меньшей мере от одной загрязняющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в природном источнике нуклеиновой кислоты антитела. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты отлична по форме или окружению, в котором она находится в природе. Следовательно, выделенные молекулы нуклеиновой кислоты отличаются от молекулы нуклеиновой кислоты, существующей в клетках в природе. Однако выделенная молекула нуклеиновой кислоты включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержится в клетках, обычно экспрессирующих антитело, в которых, например, молекула нуклеиновой кислоты находится в хромосомальном расположении, отличном от расположения в клетках в природе.

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК представляют собой клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих представляют собой линию почек CV1 обезьяны, трансформированную SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); клетки эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham F.L. and Smiley J. "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5", J. Gen. Virol. 36:59-72 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичников китайского хомяка; клетки яичников китайского хомяка/dhFr- (CHO/dhFr-, Urlaub G. and Chasin L.A. "Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77(7):4216-20 (1980)); клетки Септоли мыши (Mather J.P. "Establishment and characterization of two distinct mouse testicular epithelial cell lines", Biol. Reprod. 23(1):243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1, ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартишки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крыс линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL 51); клетки TR1 (Mather J.P., Zhuang L.Z., Perez-Infante V., and Phillips D.M. "Culture of testicular cells in hormone-supplemented serum-free medium", Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки EB66 (см., например, EP 2150275 B1); клетки FS4; и линию гепатомы человека (Hep G2). Клеток-хозяев трансформируют вышеописанными векторами экспрессии или клонирующими векторами для получения антитела против CD47 и культивируют в общепринятой питательной среде, модифицированной соответствующим образом для индукции промоторами, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих целевые последовательности.

Композицию антител, полученную из клеток, можно очистить с применением, например, хроматографии с гидроксипатитом, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем аффинная хроматография является предпочтительной методикой очистки. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изоформа любого Fc-домена иммуноглобулина, присутствующего в антителе. Белок А можно применять для очистки антител на основе тяжелых цепей $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (Lindmark R., Thoren-Tolling K., Sjöquist J. "Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera", J. Immunol. Meth. 62(1): 1-13 (1983)). Белок G рекомендуют для $\gamma 3$ человека (Guss M., Eliasson M., Olsson A., Uhlén M., Frej A.K., Jönvall H., Flock J.I., and Lindberg M. "Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G", EMBO J. 5(1): 1567-1575 (1986)). Матрица, к которой присоединяют аффинный лиганд, чаще всего представляет собой агарозу, но также доступны и другие матрицы. Стабильные с механической точки зрения матрицы, такие как стекло с контролируемым размером

пор или поли(стирендивинил)бензен, обеспечивают большие скорости потока и более короткие времена обработки, чем те, которые можно достичь с агарозой. Если антитело содержит СНЗ-домен, для очистки применяют смолу Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Филлипсбург, Нью-Джерси). Также доступны другие методики очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, преципитация этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на силикагеле, хроматография на гепарине, хроматография SEPHAROSE™ на анион- или катионообменной смоле (такой как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, ДСН-ПААГ и преципитация сульфатом аммония, в зависимости от антитела, восстановление которого запланировано.

После любой стадии или стадий предварительной очистки смесь, содержащую антитело, представляющее интерес, и загрязняющие вещества, можно подвергнуть хроматографии гидрофобного взаимодействия с низким pH с применением буфера для элюирования при pH приблизительно 2,5-4,5, предпочтительно проводимой при низких концентрациях соли (например, приблизительно 0-0,25M соли).

Способы применения.

Гуманизированные или химерные моноклональные антитела согласно настоящему изобретению можно применять для модуляции фагоцитоза, включая способы, представленные в международной заявке US 2009/000319, которая конкретно полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Например, композиции антитела можно вводить для усиления фагоцитоза раковых клеток, экспрессирующих CD47, и, таким образом, эти композиции являются подходящими для лечения рака у субъекта посредством введения эффективного количества гуманизированных или химерных моноклональных антител согласно настоящему изобретению.

Также предложены фармацевтические композиции для применения в лечении рака, содержащие гуманизированные или химерные моноклональные антитела согласно настоящему изобретению и необязательно фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества или носитель.

Гуманизированные или химерные моноклональные антитела согласно настоящему изобретению можно применять *in vitro* и *in vivo* для контроля курса терапии заболевания CD47. Таким образом, например, посредством измерения увеличения или уменьшения количества клеток, экспрессирующих CD47, в особенности раковых клеток, экспрессирующих CD47, можно определить, является ли конкретный терапевтический режим, направленный на облегчение заболевания, эффективным.

Согласно предпочтительному варианту реализации гуманизированные или химерные моноклональные антитела согласно настоящему изобретению можно применять для лечения, отсрочивания прогрессирования, предотвращения рецидива или облегчения симптома рака или другого неопластического состояния в качестве монотерапии или в комбинации с другим противораковым средством или средствами (комбинированной терапии). В настоящем документе термины "рак" "неоплазия" и "опухоль" являются взаимозаменяемыми. Примеры рака включают, без ограничения, рак желудка, рак молочной железы, рак легких, рак яичников, рак шейки матки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак толстой и прямой кишки, рак поджелудочной железы, рак печени, рак почек, рак щитовидной железы, рак головного мозга, рак головы и шеи, гематологический рак, карциному, меланому, лейомиому, лейомиосаркому, глиому, глиобластому и т.д. "Гематологический рак" означает рак крови и включает, среди прочих, лейкоз, лимфому и миелому. Сплошные опухоли включают, например, опухоль желудка, опухоли молочной железы, опухоли легких, опухоли яичников, опухоли предстательной железы, опухоли мочевого пузыря, опухоли толстой и прямой кишки, опухоли поджелудочной железы, опухоли печени, опухоли почек, опухоль щитовидной железы, опухоль головного мозга, опухоли головы и шеи, опухоли пищевода и опухоли меланомы и т.д. Симптомы, связанные с типами рака и другими неопластическими нарушениями, включают, без ограничения, воспаление, лихорадку, общее недомогание, боль, потерю аппетита, потерю массы тела, отек, головную боль, утомляемость, сыпь, анемию, мышечную слабость и мышечное утомление.

Комбинированная терапия может включать одно или несколько антител согласно настоящему изобретению, совместно приготовленных в состав и/или совместно введенных с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, например, химиотерапевтическими или антинеопластическими средствами, такими как ингибиторы цитокина и фактора роста, иммуносупрессанты, противовоспалительные средства, метаболические ингибиторы, ингибиторы ферментов и/или цитотоксические или цитостатические средства. Термин "комбинация" в данном контексте означает, что средства вводят, по существу, одновременно, параллельно или последовательно. Иллюстративные химиотерапевтические средства включают, без ограничения, алдеслейкин, алтретамин, амифостин, аспарагиназу, блеомицин, капецитабин, карбоплатин, кармустин, кладрибин, цисаприд, цисплатин, циклофосфамид, цитарабин, дакарбазин (DTIC), дактиномицин, доцетаксел, доксорубицин, дронабинол, дуокармицин, этопозид, филгратим, флударабин, фторурацил, гемцитабин, гранисетрон, гидроксимочевину, идарубицин, ифосфамид, интерферон-α, иринотекан, лансопразол, левамизол, лейковорин, мегестрол, месну, метотрексат, метоклопрамид, митомицин, митотан, митоксантрон, омепразол, ондансетрон, паклитаксел (Таксол™), пилокарпин, прохлорперазин, сапроин, тамоксифен, таксол, топотекана гидрохлорид, винбластин, винкристин и винорелбина тартрат.

Антитела согласно настоящему изобретению можно объединять с эффективной дозой средства, повышающего гематокрит пациента, например эритропоэтин-стимулирующего средства (erythropoietin stimulating agent, ESA). Такие средства известны и применяются в данной области техники, включая, например, Аранесп®, Эпоген®NF/Прокрит®NF, Омонтис®, Прокрит® и т.д.

Согласно другим вариантам реализации антитела согласно настоящему изобретению можно объединять с эффективной дозой других антител, которые применяли в лечении рака, включая, без ограничения, следующие одобренные FDA моноклональные антитела: ритуксимаб (Ритуксан®, CD20: химерный IgG1), трастузумаб (Герцептин®, HER2: химерный IgG1), алемтузумаб (Кэмпас®, CD52: гуманизированный IgG1), ибритутомаб тиуксетан (Зевалин®, CD20: IgG1 мыши, меченный радиоактивным изотопом (иттрием-90), тозитумомаб-I-131 (Бексар®, CD20, IgG2a мыши, меченный радиоактивным изотопом (йодом-131)), цетуксимаб (Эрбитукс®, EGFR: химерный, IgG1), бевацизумаб (VEGF: гуманизированный, IgG4), панитумумаб (Вектибикс®, EGFR: IgG2 человека), офатумумаб (Арзерра®, CD20: IgG1 человека), ипилимумаб (Ервой®, CTLA-4: IgG1 человека), брентуксимаб ведотин (Адектрис®, CD30: химерный, IgG1, конъюгат с лекарственным средством), пертузумаб (Перджета®, HER2: гуманизированный IgG1, конъюгат с лекарственным средством), адотрастузумаб эматанзин (Кадцила®, HER2: гуманизированный, IgG1, конъюгат с лекарственным средством), обинутузумаб (Газива®, CD20: гуманизированный и гликоль-модифицированный), ниволумаб и пембролизумаб (против PD-1s) и т.д. Трастузумаб нацелен на антиген HER2. Данный антиген обнаружен на 25-35% типов рака молочной железы и на метастатических типах рака желудка. Трастузумаб одобрен для лечения HER2-сверхэкспрессирующих типов рака молочной железы и для HER2-сверхэкспрессирующей метастатической аденокарциномы желудочно-пищеводного соединения. Цетуксимаб применяют для лечения метастатического рака толстой и прямой кишок, метастатического немелкоклеточного рака легких и рака головы и шеи. Ниволумаб и пембролизумаб были недавно одобрены для лечения метастатической меланомы и немелкоклеточного рака легких. Эти антитела изучают в клинических исследованиях рака легких, почечно-клеточного рака, лимфомы и мезотелиомы. Можно также объединять другие противораковые лекарственные средства, которые на сегодняшний день изучают в клинических исследованиях или исследуют.

Предпочтительные комбинации представляют собой комбинации антитела против CD47 согласно настоящему изобретению и i) ингибитора иммунных контрольных точек или ii) иммуномодулятора, перепрограммирующего противоопухолевую активность макрофагов и дендритных клеток, или iii) антитела против опухоли-ассоциированного антигена. В настоящем документе описаны иллюстративные комбинации для Герцептина® и Эрбитукса®, при этом комбинация с Герцептином® является предпочтительной в связи с ее аддитивным, кооперативным или, возможно, синергическим эффектом. Другие средства могут также являться пригодными для объединения.

Моноклональные антитела согласно настоящему изобретению можно применять *in vitro* в иммуноанализах, в которых эти антитела можно применять в жидкой фазе или присоединенными к твердофазному носителю. Кроме того, моноклональные антитела в данных иммуноанализах можно пометить обнаруживаемой меткой множеством способов. Примеры типов иммуноанализов, в которых можно применять моноклональные антитела согласно настоящему изобретению, представляют собой проточную цитометрию, например, FACS (fluorescent-activated cell sorting, сортировка флуоресцентно-активированных клеток, MACS (magnetic-activated cell sorting, сортировка магнитно-активированных клеток), иммуногистохимию, конкурентные и неконкурентные иммуноанализы в прямом или непрямом форматах и т.п. Обнаружение антигенов с применением моноклональных антител согласно настоящему изобретению можно осуществить с помощью иммуноанализов, которые проводят в прямом, обратном или одновременном режимах, включая иммуногистохимические анализы физиологических образцов. Специалистам в данной области техники известны либо специалисты могут с легкостью найти другие форматы иммуноанализа без чрезмерного экспериментирования.

Моноклональные антитела согласно настоящему изобретению можно присоединить к множеству различных носителей и применять для обнаружения присутствия CD47-экспрессирующих клеток. Примеры хорошо известных носителей включают стекло, полистирол, полипропилен, полиэтилен, декстран, нейлон, амилазы, природные и модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, агарозы и магнетит. Природа носителя в контексте настоящего изобретения может быть растворимой или нерастворимой. Специалистам в данной области техники известны другие подходящие носители для связывания моноклональных антител либо специалисты способны определить таковые с применением общепринятых экспериментов.

Существует множество различных меток и способов мечения, известных средним специалистам в данной области техники, которые находят применение в качестве меток в терапевтических способах, для применения в диагностических способах и т.п. Для диагностических целей метку можно ковалентным или нековалентным способом присоединить к антителу согласно настоящему изобретению или его фрагменту, включая фрагменты, состоящие из последовательностей CDR или содержащие такие последовательности. Примеры типов меток, которые можно применять в настоящем изобретении, включают ферменты, радиоизотопы, флуоресцентные соединения, коллоидные металлы, хемилюминесцентные со-

единения и биолюминесцентные соединения. Средним специалистам в данной области техники известны другие подходящие метки для связывания с моноклональными антителами согласно настоящему изобретению, либо специалисты способны определить таковые с применением общепринятых экспериментов. Кроме того, связывание данных меток с моноклональными антителами согласно настоящему изобретению можно осуществить с применением стандартных методик, известных средним специалистам в данной области техники.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело или его фрагмент присоединены к наночастице, например, для применения при визуализации. Подходящие наночастицы представляют собой наночастицы, известные в данной области техники, например, включая, без ограничения, рамановские золото-кварцевые наночастицы (R-Si-Au-NP). R-Si-Au-NP состоят из рамановской органической молекулы с узкополосной сигнатурой спектра, адсорбированной на золотое ядро. Поскольку рамановскую органическую молекулу можно заменить, каждая наночастица может нести свою собственную сигнатуру, тем самым обеспечивая возможность независимого и одновременного обнаружения множества наночастиц посредством мультиплексирования. Целую наночастицу инкапсулируют в кремниевую оболочку для удержания рамановской органической молекулы на золотом наноядре. Необязательное полиэтиленгликоль (ПЭГ)-илирование R-Si-Au-NP повышает биодоступность частиц и обеспечивает функциональные "основы" для присоединения нацеливающих фрагментов (см. публикации Thakor A.S., Luong R., Paulmurugan R., et al. et al. "The fate and toxicity of raman-active silica-gold nanoparticles in mice", *Sci. Transl. Med.* 3(79):79ra33 (2011); Jokerst J.V., Miao Z., Zavaleta C, Cheng Z., and Gambhir S.S. "Affibody-functionalized gold-silica nanoparticles for Raman molecular imaging of the epidermal growth factor receptor", *Small.* 7(5):625-33 (2011); Gao J., Chen K., Miao Z., Ren G, Chen X., Gambhir S.S., Cheng Z. "Affibody-based nanoprobe for HER2-expressing cell and tumor imaging", *Biomaterials* 32(8):2141-8 (2011); все из которых конкретно включены в настоящий документ посредством ссылки).

В контексте настоящего изобретения CD47 может быть обнаружен моноклональными антителами согласно настоящему изобретению при присутствии в биологических жидкостях и на тканях *in vivo* или *in vitro*. Можно применять любой образец, содержащий обнаруживаемое количество CD47. Образец может представлять собой жидкость, такую как моча, слюна, спинно-мозговая жидкость, кровь, сыворотка и т.п., или твердое или полутвердое вещество, такое как ткани, фекалии и т.п., или в качестве альтернативы твердую ткань, такую как ткань, обычно применяемую в гистологической диагностике.

Другая методика мечения, которая может обеспечить более высокую чувствительность, заключается в комбинировании антитела с низкомолекулярными гаптенами. Затем эти гаптены можно специфично обнаружить посредством второй реакции. Например, часто применяют гаптены, такие как биотин, который вступает в реакцию с авидином, или динитрофенол, пиридоксаль или флуоресцеин, которые могут вступать в реакцию со специфичными антителами против гаптена.

Для удобства антитело согласно настоящему изобретению можно обеспечить в наборе, т.е. упакованной комбинации реактивов в заранее определенных количествах с инструкциями по осуществлению диагностического анализа. Когда антитело помечено ферментом, набор содержит субстраты и кофакторы, необходимые для фермента (например, предшественник субстрата, который обеспечивает обнаруживаемый хромофор или флуорофор). Кроме того, могут быть включены другие добавки, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или лизирующий буфер) и т.п. Относительные количества различных реактивов могут варьировать в широком диапазоне для обеспечения концентраций реактивов в растворе, которые, по существу, оптимизируют чувствительность анализа. В особенности, реактивы могут быть предложены в виде сухих порошков, обычно лиофилизированных, включая вспомогательные вещества, которые при растворении позволяют получить раствор реактивов с соответствующей концентрацией.

Терапевтические составы, содержащие одно или несколько антител согласно настоящему изобретению, готовят для хранения посредством смешивания антитела желаемой степени чистоты с необязательными физиологически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Композиция антитела будет приготовлена в состав, дозирована и введена способом, соответствующим надлежащей медицинской практике. Факторы, которые следует принимать во внимание в данном контексте, включают конкретное расстройство, лечение которого проводят, конкретное вскармливающее, лечение которого проводят, клиническое состояние индивидуального пациента, причину расстройства, участок доставки средства, способ введения, режим введения и другие факторы, известные практикующим врачам. "Терапевтически эффективное количество" антитела, которое будет введено, будет регулироваться такими соображениями и представляет собой минимальное количество, необходимое для предотвращения связанного с CD47 заболевания.

Терапевтическая доза может составлять по меньшей мере приблизительно 0,01 мг на 1 кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 0,05 мг на 1 кг массы тела; по меньшей мере приблизительно 0,1 мг на 1 кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 0,5 мг на 1 кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 1 мг на 1 кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 2,5 мг на 1 кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 5 мг на 1 кг массы тела, по меньшей мере приблизительно 10 мг на 1 кг

массы тела и не более чем приблизительно 100 мг на 1 кг массы тела, предпочтительно от 0,1 до 20 мг на 1 кг массы тела. Специалист в данной области техники понимает, что такие рекомендации будут откорректированы в зависимости от молекулярной массы активного средства, например, при применении фрагментов антитела или при применении конъюгатов антитела. Доза может также варьировать в случае локализованного введения, например назального, ингаляции и т.д., или в случае системного введения, например в.м. (внутримышечного), и.п., в.в. (внутривенного) и т.п.

Антитело не обязательно должно быть, но может быть включено в состав с одним или несколькими средствами, потенцирующими активность или иным образом повышающими терапевтический эффект. Эти средства, как правило, применяют в тех же дозах и с теми же путями введения, которые указаны в настоящем документе выше, или в количестве приблизительно от 1 до 99% от ранее применяемых доз.

Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными в отношении реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензил аммония хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид, бензетония хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил-или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннитол, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Составы, применяемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Стерилизацию можно с легкостью осуществить посредством фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

Активные компоненты также могут быть заключены в микрокапсулу, полученную, например, посредством методики коацервации или посредством полимеризации по границе раздела фаз, например, в микрокапсулу из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулу из поли-(метилметакрилата), соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомах, микро-сферах альбумина, микроэмульсиях, наночастицах и микрокапсулах) или в макроэмульсиях. Такие методики раскрыты в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Антитело против CD47 вводят любым подходящим способом, включая парентеральный, подкожный, интраперитонеальный, внутрилегочный и назальный. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, интраперитонеальное или подкожное введение. Кроме того, антитело против CD47 подходит для введения посредством импульсной инфузии, в особенности, с уменьшающимися дозами антитела.

Соответствующая доза антитела для предотвращения или лечения заболевания будет зависеть от типа заболевания, лечение которого проводят, как определено выше, тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли антитело с профилактической целью, от предшествующей терапии, клинического анамнеза пациента и ответа на антитело, а также от усмотрения лечащего врача. Антитело подходит для введения пациенту единожды или в ходе серии лечений.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено изделие, содержащее материалы, пригодные для лечения нарушений, описанных выше. Изделие содержит контейнер и этикетку. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и лабораторные пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из множества материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая является эффективной для лечения состояния, и может содержать стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или пробирку с пробкой, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций). Активное средство в композиции представляет собой антитело против CD47. Этикетка на контейнере или связанная с контейнером указывает, что композицию применяют для лечения состояния по выбору. Изделие также может содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как фосфатно-буферный солевой раствор, раствор Рингера и/или раствор декстрозы. Дополнительно изделие может содержать другие вещества, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и листки-вкладыши или инструкции по применению.

В свете приведенного полного описания изобретения для среднего специалиста в данной области будет очевидно, что можно осуществлять различные изменения и модификации, не выходя за пределы духа или объема настоящего изобретения.

Последовательности

SEQ ID NO: 1

VT008-AL5-10G7; тяжелая цепь, CDR1-Кэбот
KYWMH

SEQ ID NO: 2

VT008-AL5-10G7; тяжелая цепь, CDR2-Кэбот
EINPSDTYTNYNQKFKG

SEQ ID NO: 3

VT008-AL5-10G7; тяжелая цепь, CDR3-Кэбот
VATMVARGFAY

SEQ ID NO: 4

VT008-AL5-10G7; тяжелая цепь, CDR1-IMGT
GYTFTKYW

SEQ ID NO 5

VT008-AL5-10G7, тяжелая цепь, CDR2-IMGT
INPSDTYT

SEQ ID NO 6

VT008-AL5-10G7, тяжелая цепь, CDR3-IMGT
ARVATMVARGFAY

SEQ ID NO 7

VT008-AL5-10K7, легкая цепь, CDR1-Кэбот
KASQDVSGAVV

SEQ ID NO 8

VT008-AL5-10K7, легкая цепь, CDR2-Кэбот
LATYRYT

SEQ ID NO 9

VT008-AL5-10K7, легкая цепь, CDR3-Кэбот
QQYYSIPWT

SEQ ID NO 10

VT008-AL5-10K7, легкая цепь, CDR1-IMGT
QDVSGA

SEQ ID NO 11

VT008-AL5-10K7, легкая цепь, CDR2-IMGT
LATY

SEQ ID NO 12

VT008-AL5-10K7, легкая цепь, CDR3-IMGT
QQYYSIPWT

SEQ ID NO 13

VT008-AL6-14G1, тяжелая цепь, CDR1-Кэбот
NYWMY

SEQ ID NO 14

VT008-AL6-14G1, тяжелая цепь, CDR2-Кэбот
WIDPNSGGTKYNEKFKS

SEQ ID NO 15

VT008-AL6-14G1, тяжелая цепь, CDR3-Кэбот
GGYTMDY

SEQ ID NO 16

VT008-AL6-14G1, тяжелая цепь, CDR1-IMGT
GYTFTNYW

SEQ ID NO 17

VT008-AL6-14G1, тяжелая цепь, CDR2-IMGT
IDPNSGGT

SEQ ID NO 18

VT008-AL6-14G1, тяжелая цепь, CDR3-IMGT
ARGGYTMDY

SEQ ID NO 19

VT008-AL6-16K1, легкая цепь, CDR1-Кэбот
RASQSLVHSNGNTYLH

SEQ ID NO 20

VT008-AL6-16K1, легкая цепь, CDR2-Кэбот
KVSNRFS

SEQ ID NO 21

VT008-AL6-16K1, легкая цепь, CDR3-Кэбот
SQSTHVPLT

SEQ ID NO 22

VT008-AL6-16K1, легкая цепь, CDR1-IMGT
QSLVHSNGNTY

SEQ ID NO 23

VT008-AL6-16K1, легкая цепь, CDR2-IMGT
KVSN

SEQ ID NO 24

VT008-AL6-16K1, легкая цепь, CDR3-IMGT
SQSTHVPLT

SEQ ID NO 25

VT008-AL6-18G1, тяжелая цепь, CDR1-Кэбот
NYWIH

SEQ ID NO 26

VT008-AL6-18G1, тяжелая цепь, CDR2-Кэбот
RIDPNTVDAKYNEKFS

SEQ ID NO 27

VT008-AL6-18G1, тяжелая цепь, CDR3-Кэбот
GGYTMDY

SEQ ID NO 28

VT008-AL6-18G1, тяжелая цепь, CDR1-IMGT
GYTFINYW

SEQ ID NO 29

VT008-AL6-18G1; тяжелая цепь; CDR2-IMGT
IDPNTVDA

SEQ ID NO: 30

VT008-AL6-18G1; тяжелая цепь; CDR3-IMGT
SRGGYTMDY

SEQ ID NO: 31

VT008-AL6-18K21; легкая цепь; CDR1-Кэбот
RSSQSLVHSNGNTYLH

SEQ ID NO: 32

VT008-AL6-18K21; легкая цепь; CDR2-Кэбот
KVSNRFS

SEQ ID NO: 33

VT008-AL6-18K21; легкая цепь; CDR3-Кэбот
FQSTHVPWT

SEQ ID NO: 34

VT008-AL6-18K21; легкая цепь; CDR1-IMGT
QSLVHSNGNTY

SEQ ID NO: 35

VT008-AL6-18K21; легкая цепь; CDR2-IMGT
KVSN

SEQ ID NO: 36

VL008-AL6-18K21; легкая цепь; CDR3-IMGT
FQSTHVPWT

SEQ ID NO: 37

VL008-AL17-7G1; тяжелая цепь; CDR1-Кэбот

DYYIN

SEQ ID NO 38

VL008-AL17-7G1, тяжелая цепь, CDR2-Кэбот
WIFPGSGLTYYNKKFKG

SEQ ID NO 39

VL008-AL17-7G1, тяжелая цепь, CDR3-Кэбот
PYYGSRWDYAMDY

SEQ ID NO 40

VL008-AL17-7G1, тяжелая цепь, CDR1-IMGT
VYTFTDYY

SEQ ID NO 41

VL008-AL17-7G1, тяжелая цепь, CDR2-IMGT
IFPGSGLT

SEQ ID NO 42

VL008-AL17-7G1, тяжелая цепь, CDR3-IMGT
ARPYGSRWDYAMDY

SEQ ID NO 43

VL008-AL17-7K6, легкая цепь, CDR1-Кэбот
KSSQSLLNSNNQKNYLA

SEQ ID NO 44

VL008-AL17-7K6, легкая цепь, CDR2-Кэбот
FASTRES

SEQ ID NO 45

VL008-AL17-7K6, легкая цепь, CDR3-Кэбот
QQHYTTPYT

SEQ ID NO 46

VL008-AL17-7K6, легкая цепь, CDR1-IMGT
QSLNSNNQKNY

SEQ ID NO 47

VL008-AL17-7K6, легкая цепь, CDR2-IMGT
FAST

SEQ ID NO 48

VL008-AL17-7K6, легкая цепь, CDR3-IMGT
QQHYTTPYT

SEQ ID NO 49

VL008-AL18-14G4, тяжелая цепь, CDR1-Кэбот
DYYIN

SEQ ID NO 50

VL008-AL18-14G4, тяжелая цепь, CDR2-Кэбот
RIYPGIGNTYYNKKFKG

SEQ ID NO 51

VL008-AL18-14G4, тяжелая цепь, CDR3-Кэбот
GHYGRGMDY

SEQ ID NO 52

VL008-AL18-14G4, тяжелая цепь, CDR1-IMGT
GYSFTDYY

SEQ ID NO 53

VL008-AL18-14G4, тяжелая цепь, CDR2-IMGT
IYPGIGNT

SEQ ID NO: 54

VL008-AL18-14G4; тяжелая цепь; CDR3-IMGT
ARGHYGRGMDY

SEQ ID NO: 55

VL008-AL18-14K1; легкая цепь; CDR1-Кэбот
KSSQSLNSIDQKNYLA

SEQ ID NO: 56

VL008-AL18-14K1; легкая цепь; CDR2-Кэбот
FASTKES

SEQ ID NO: 57

VL008-AL18-14K1; легкая цепь; CDR3-Кэбот
QQHYSTPWT

SEQ ID NO: 58

VL008-AL18-14K1; легкая цепь; CDR1-IMGT
QSLNSIDQKNY

SEQ ID NO: 59

VL008-AL18-14K1; легкая цепь; CDR2-IMGT
FAST

VL008-AL13-8G5, тяжелая цепь, CDR2-Кэбот
MIHPNSGTTNYNEKFKS

SEQ ID NO 63

VL008-AL13-8G5, тяжелая цепь, CDR3-Кэбот
SHYYDGHFSY

SEQ ID NO 64

VL008-AL13-8G5, тяжелая цепь, CDR1-IMGT
GYTFTTYW

SEQ ID NO 65

VL008-AL13-8G5, тяжелая цепь, CDR2-IMGT
IHPNSGTT

SEQ ID NO 66

VL008-AL13-8G5, тяжелая цепь, CDR3-IMGT
TRSHYYDGHFSY

SEQ ID NO 67

VL008-AL13-8K3, легкая цепь, CDR1-Кэбот
KSSQSLLNSRTRKNYLA

SEQ ID NO 68

VL008-AL13-8K3, легкая цепь, CDR2-Кэбот
WASTRES

SEQ ID NO 69

VL008-AL13-8K3, легкая цепь, CDR3-Кэбот
KQSYNLWT

SEQ ID NO 70

VL008-AL13-8K3, легкая цепь, CDR1-IMGT

QSLNSRTRKNY

SEQ ID NO 71

VL008-AL13-8K3, легкая цепь, CDR2-IMGT
WAST

SEQ ID NO 72

VL008-AL13-8K3, легкая цепь, CDR3-IMGT
KQSYNLWT

SEQ ID NO 73

VT008-AL6-10G3, тяжелая цепь, CDR1-Кэбот
NYWIH

SEQ ID NO 74

VT008-AL6-10G3, тяжелая цепь, CDR2-Кэбот
RIDPNSGGTKYNEKFKS

SEQ ID NO 75

VT008-AL6-10G3, тяжелая цепь, CDR3-Кэбот
GGYTMDY

SEQ ID NO 76

VT008-AL6-10G3, тяжелая цепь, CDR1-IMGT
GYTFTNYW

SEQ ID NO 77

VT008-AL6-10G3, тяжелая цепь, CDR2-IMGT
IDPNSGGT

SEQ ID NO 78

VT008-AL6-10G3, тяжелая цепь, CDR3-IMGT
ARGGYTMDY

SEQ ID NO 79

VT008-AL6-10K1, легкая цепь, CDR1-Кэбот
RSSQSLHSHNGNTYLH

SEQ ID NO 80

VT008-AL6-10K1, легкая цепь, CDR2-Кэбот
KVSYRFS

SEQ ID NO 81

VT008-AL6-10K1, легкая цепь, CDR3-Кэбот
FQSTHVPWT

SEQ ID NO 82

VT008-AL6-10K1, легкая цепь, CDR1-IMGT
QSLHSHNGNTY

SEQ ID NO 83

VT008-AL6-10K1, легкая цепь, CDR2-IMGT
KVSY

SEQ ID NO 84

VT008-AL6-10K1, легкая цепь, CDR3-IMGT
FQSTHVPWT

SEQ ID NO 85

VT008-AL6-20G7, тяжелая цепь, CDR1-Кэбот
NYWIY

SEQ ID NO 86

VT008-AL6-20G7, тяжелая цепь, CDR2-Кэбот
YINPRSDDTKYNQKFRD

SEQ ID NO 87

VT008-AL6-20G7, тяжелая цепь, CDR3-Кэбот
GGFTMDF

SEQ ID NO 88

VT008-AL6-20G7, тяжелая цепь, CDR1-IMGT
GYTFINYW

SEQ ID NO 89

VT008-AL6-20G7, тяжелая цепь, CDR2-IMGT
INPRSDDT

SEQ ID NO 90

VT008-AL6-20G7, тяжелая цепь, CDR3-IMGT
ARGGFTMDF

SEQ ID NO 91

VT008-AL6-20K7, легкая цепь, CDR1-Кэбот
RSSQSLHSHNGNTYLH

SEQ ID NO 92

VT008-AL6-20K7, легкая цепь, CDR2-Кэбот
KVSYRFS

VT008-AL6-20K7, легкая цепь, CDR2-IMGT
KVSY

SEQ ID NO 96
VT008-AL6-20K7, легкая цепь, CDR3-IMGT
SQGTHVPYT

SEQ ID NO 97
VT008-AL6-39G2, тяжелая цепь, CDR1-Кэбот
GYNIY

SEQ ID NO 98
VT008-AL6-39G2, тяжелая цепь, CDR2-Кэбот
YIYPYNGISSYNQKFKD

SEQ ID NO 99
VT008-AL6-39G2, тяжелая цепь, CDR3-Кэбот
GGYTMDY

SEQ ID NO 100
VT008-AL6-39G2, тяжелая цепь, CDR1-IMGT
GYSFTGYN

SEQ ID NO 101
VT008-AL6-39G2, тяжелая цепь, CDR2-IMGT
IYPYNGIS

SEQ ID NO 102
VT008-AL6-39G2, тяжелая цепь, CDR3-IMGT
ARGGYTMDY

SEQ ID NO 103
VT008-AL6-39K2, легкая цепь, CDR1-Кэбот

RSSQSLVKSNGNTYLH

SEQ ID NO 104

VT008-AL6-39K2, легкая цепь, CDR2-Кэбот
KVSNRFS

SEQ ID NO 105

VT008-AL6-39K2, легкая цепь, CDR3-Кэбот
SQTTHVPYT

SEQ ID NO 106

VT008-AL6-39K2, легкая цепь, CDR1-IMGT
QSLVKSNGNTY

SEQ ID NO 107

VT008-AL6-39K2, легкая цепь, CDR2-IMGT
KVSN

SEQ ID NO 108

VT008-AL6-39K2, легкая цепь, CDR3-IMGT
SQTTHVPYT

SEQ ID NO 109

VL008-AL17-8G5, тяжелая цепь, CDR1-Кэбот
DYYIN

SEQ ID NO 110

VL008-AL17-8G5, тяжелая цепь, CDR2-Кэбот
WIFPGSGLTYYNKKFKG

SEQ ID NO 111

VL008-AL17-8G5, тяжелая цепь, CDR3-Кэбот
PYYGSRWDYTMDY

SEQ ID NO 112

VL008-AL17-8G5, тяжелая цепь, CDR1-IMGT
GYTFTDYY

SEQ ID NO 113

VL008-AL17-8G5, тяжелая цепь, CDR2-IMGT
IFPGSGLT

SEQ ID NO 114

VL008-AL17-8G5, тяжелая цепь, CDR3-IMGT
ARPYYGSRWDYTMDY

SEQ ID NO 115

VL008-AL17-8K7, легкая цепь, CDR1-Кэбот
KSSQNLLNSNNQKNHLA

SEQ ID NO 116

VL008-AL17-8K7, легкая цепь, CDR2-Кэбот
FASTRES

SEQ ID NO 117

VL008-AL17-8K7, легкая цепь, CDR3-Кэбот
QQHYTTPYT

SEQ ID NO 118

VL008-AL17-8K7, легкая цепь, CDR1-IMGT
QNLLNSNNQKNH

SEQ ID NO 119

VL008-AL17-8K7, легкая цепь, CDR2-IMGT
FAST

SEQ ID NO: 120

VL008-AL17-8K7; легкая цепь; CDR3-IMGT

QQHYTTPYT

SEQ ID NO: 121

VT008-AL5-10G7; переменная область тяжелой цепи

QVQLQQPGAELVMPGSSVKLSCKTSGYTFTKYWMHWVKRRPGQGLEWIGEINPSDTYTN
YNQKFKGKSTLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVATMVARGFAYWGQGLTVT
SA

SEQ ID NO: 122

VT008-AL5-10K7; переменная область легкой цепи

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSGAVVWYQEPGQSPNLLIYLATYRYTGVDP
RFTGSGSGTDFLTIRSVQAEDMAVYYCQYYISIPWTFGGGKLEIK

SEQ ID NO: 123

VT008-AL6-14G1; переменная область тяжелой цепи

QVQLQQPGAELVKPGASLRVSCASGYTFTNYWMYVVRQRPGRGLEWIGWIDPNSGGTK
YNEKFKSKATLTVDKPSSTAYMQLSSLTSEDSAVYNCARGGYTMDYWGQGTSTVSS

SEQ ID NO: 124

VT008-AL6-16K1; переменная область легкой цепи

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRASQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
GVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 125

VT008-AL6-18G1; переменная область тяжелой цепи

QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYTFINWIHWVKQRPGRGLEWIGRIDPNTVDAKY
NEKFKSKATLTVDKPSIAYMQLSSLTSEDSAVYYCSRGGYTMDYWGQGTSTVSS

SEQ ID NO: 126

VT008-AL6-18K21; переменная область легкой цепи

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
GVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIVFCFQSTHVPTWTFGGGKLEIK

SEQ ID NO: 127

VL008-AL17-7G1; переменная область тяжелой цепи

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASVYTFDYYINWVKQRPQGLEWVGFPGSGLTYY
NKKFKGKATLTVDKSSSTAYMLLSSLTSEDSAVYFCARPYYSRWYAMDYWGQGTSTV
VSS

SEQ ID NO: 128

VL008-AL17-7K6; переменная область легкой цепи

DIVMTQSPSSLTMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNNQKNYLAWYQKPGQSPKLLLYFASTR
ESGVPDRFIGSGSGTDFLTISVQAEDLADYFCQQHYTTPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO: 129

VL008-AL18-14G4; переменная область тяжелой цепи

QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYSFTDYYINWVKQRPQGLEWIARIYPGIGNTYN
KKFKGKATLTAEKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCARGHYGRGMDYWGQGTSTVSS

SEQ ID NO: 130

VL008-AL18-14K1; переменная область легкой цепи

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMNCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQKPGQSPKLLVYFASTK
ESGVPDRFIGSGSGTDFLTISVQAEDLADYFCQQHYSTPWTFGGGKLEIK

SEQ ID NO: 131

VL008-AL13-8G5; переменная область тяжелой цепи

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTTYWMHWVKQRPQGLEWIGMIHPNSGTTN
YNEKFKSKATLTVDKSSSTYMQSSLTSEDSAVYYCTRSHYYDGHFSYWGQGLTVTSA

SEQ ID NO: 132

VL008-AL13-8K3; переменная область легкой цепи

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQKPGQSPKLLIYWASTRE
SGVPDRFTGSGSGTDFLTISVQAEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGTRLEIK

SEQ ID NO: 133

VT008-AL6-10G3; переменная область тяжелой цепи

QVQLQQPGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWIHWLNQRPGRGLEWIGRIDPNSGGTKY
NEKFKSKAILTVDKSSSTTYMQLSSLTSEDSAVYYCARGGYTMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO: 134

VT008-AL6-10K1; переменная область легкой цепи

DVVMPQTPLSLPVS LGDHASISCRSSQSLHNSGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS YRFSG
VPDRISGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCFQSTHVPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 135

VT008-AL6-20G7; переменная область тяжелой цепи

QVQLQQSGTELAKPGASVKLSCKASGYTFINYWIYVWKERPGQVLEWIGYINPRSDDTKY
NQKFRDRATLTADKSSSTAYLQLNSLTNDDSAIYYCARGGFTMDFWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO: 136

VT008-AL6-20K7; переменная область легкой цепи

DVVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLHNSGNTYLHWYLQKPGQSPNLLIYKVS YRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQGTHTVPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 137

VT008-AL6-39G2; переменная область тяжелой цепи

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYNIYVWKQSHGNILDWIGYIYPYNGISSYNQ
KFKDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARGGYTMDYGGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO: 138

VT008-AL6-39K2; переменная область легкой цепи

DVVMTQTPLSLPVS LGEQASISCRSSQSLVKSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQTTHVPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 139

VL008-AL17-8G5; переменная область тяжелой цепи

LVQLQQSGPELVKPGTSVKISCRSSGYTFIDYYINWVQRPQGQGLEWVGWIFPGSGLTYYN
KKFKGKATLSVDKSSNTAYMMLSSLTSEDSAVYFCARPYYSRWDYTMDYWGQGTSTVTV
SS

SEQ ID NO: 140

VL008-AL17-8K7; переменная область легкой цепи

DIVMTQSPSSLTMSVGGKATMSCKSSQNLLSNQKNHLAWYQKPGQSPKLLLYFASTR
ESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISVSQAEDLADYFCQHYTTPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 141

VL008-AL18-14G4; гуманизованная переменная область тяжелой цепи; VH1

QVQLLESGAVLARPGTSVKISCKASGYSFTDYYINWVKQRPQGQGLEWIGRIYPGIGNTYYN
KKFKGRAKLTAATSASIAYLEFSSLTNEDSAVYYCARGHYGRGMDYWGQGTSLTVTVSS

SEQ ID NO: 142

VL008-AL18-14G4; гуманизованная переменная область тяжелой цепи; VH2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPQGQGLEWMGRIYPGIGNTY
YNKKFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGHYGRGMDYWGQGTSLTVTVSS

SEQ ID NO: 143

VL008-AL18-14G4; гуманизованная переменная область тяжелой цепи; VH3

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPQGQGLEWMGRIYPGIGNTY
YNKKFKGRVTITRDTSTAHMELSSLRSDDTAVYYCARGHYGRGMDYWGQGTAVTVSS

SEQ ID NO: 144

VL008-AL18-14G4; гуманизованная переменная область тяжелой цепи; VH4

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPQGQGLEWMGRIYPGIGNTY
NKKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGHYGRGMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 145

VL008-AL18-14G4; гуманизованная переменная область тяжелой цепи; VH5

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPQGQGLEWMGRIYPGIGNTY
YNKKFKGRVTMTRYTSISTAYMELSSLRSDDTAVYFCARGHYGRGMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 146

VL008-AL18-14K1; гуманизированная переменная область легкой цепи; VL1
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTKES
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 147

VL008-AL18-14K1; гуманизированная переменная область легкой цепи; VL2
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTKES
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 148

VL008-AL18-14K1; гуманизированная переменная область легкой цепи; VL3
 EIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKAGQSPKLLIYFASTKESG
 VPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 149

VL008-AL18-14K1; гуманизированная переменная область легкой цепи; VL4
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTKES
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQHYSTPWTFGGGAKEIK

SEQ ID NO: 150

VL008-AL18-14K1; гуманизированная переменная область легкой цепи; VL5
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTKES
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISGLQAEDVAVYFCQQHYSTPWTFGGGTKVEIR

SEQ ID NO: 151

Антиген CD47 (Rh-связанный антиген, интегрин-ассоциированный переносчик сигнала),
 изоформа CRA_b [Homo sapiens], учетный номер: EAW79734.1
 MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVWKWF
 KGRDIYTFDGNLSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTR
 EGETIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIAILLFWGQFGIKTLKYSRSGGMDKTIALLVAGLVI
 TVIVVIGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILLHHYVVFSTAGLTSFVAILVIQVIAYILA
 VVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVSNQKTIQPPRKAEEPLNAFKE
 SKGMMNDE

SEQ ID NO: 152

VT008-AL18-14K1; легкая цепь; CDR2-Кэбот; откорректированный CD4+ Т-клеточный эпитоп
 YASTKES

SEQ ID NO: 153

VT008-AL18-14K1; легкая цепь; CDR2-IMGT; откорректированный CD4+ Т-клеточный эпитоп
 YAST

SEQ ID NO: 154

VL008-AL18-14K1; переменная область легкой цепи; откорректированный CD4+ Т-
 клеточный эпитоп
 DIVMTQSPSLAMSVGQKVTMNCSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYASTK
 ESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISVQAEDLADYFCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 155

VL008-AL18-14K1; гуманизированная переменная область легкой цепи; VL1;
 откорректированный CD4+ Т-клеточный эпитоп
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYASTKES
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 156

VL008-AL18-14K1; гуманизированная переменная область легкой цепи; VL2;
 откорректированный CD4+ Т-клеточный эпитоп
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYASTKES
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 157

VL008-AL18-14K1; гуманизированная переменная область легкой цепи; VL3;
 откорректированный CD4+ Т-клеточный эпитоп

EIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKAGQSPKLLIYYASTKES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 158

VL008-AL18-14K1; гуманизированная вариабельная область легкой цепи; VL4;
откорректированный CD4+ Т-клеточный эпитоп
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYYASTKES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQHYSTPWTFGGGAKVEIK

SEQ ID NO: 159

VL008-AL18-14K1; гуманизированная вариабельная область легкой цепи; VL5;
откорректированный CD4+ Т-клеточный эпитоп
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYYASTKES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISGLQAEDVAVYFCQQHYSTPWTFGGGTKVEIR

SEQ ID NO: 160

hu-sCD47-6His; внеклеточный домен антигена CD47 человека с 6His-меткой
MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVPCFVTNMEAQNTTEVYVWKWKF
KGRDIYTFDGLNKS TVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTR
EGETIELKYRVVSWFSPASSSGSSHHHHHH

SEQ ID NO: 161

hu-IgG4 S228P; мутант S228P константной области тяжелой цепи IgG4 человека
GCTAGCACCAAGGGCCCCCTCTGTGTTTCCTCTGGCCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAA
TCTACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAAGACTACTTCCCGAGCCTGTGACAGTGTC
CTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCATACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCCT
CCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCAAG
ACCTATACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGG
AATCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGTCCTGCCCCCTGAATTTCTGGCGCGGACCCCT
CCGTGTTCTCTGTTCCCCCAAGCCTAAGGACACCCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAA
GTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTA
CGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAGCCTCGGGAAGAACAGTTCAAC
TCCACCTACCGGGTGGTGCTCGTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAA
AGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCTCCATCGAAAAGACCATC
TCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCAGG
AAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGATTCTACCCCTCC
GATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCC
CCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTGTACTCTCGCTGACCGTGGACAAGT
CCCGGTGGCAGGAAGGCACCGTGTCTCTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA
CCACTACCCAGAAAGTCCCTGTCTCTGTCCCTGGGCAAG

SEQ ID NO: 162

huIgG4_S228P; мутант S228P константной области тяжелой цепи IgG4 человека
ASTKGPSVFLPAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVEISKYPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO: 163

hu-IgG4 S228P-L235E; мутант S228P-L235E константной области тяжелой цепи IgG4 человека
GCTAGCACCAAGGGCCCCCTCTGTGTTTCCTCTGGCCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAA
TCTACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAAGACTACTTCCCGAGCCTGTGACAGTGTC
CTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCATACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCCT
CCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCAAG
ACCTATACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGG
AATCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGTCCTGCCCTGAATTTGAAGGCGGACCC
TCCGTGTTCTGTTCCCCCCAAGCCTAAGGACACCTGATGATCTCCCGGACCCCCGA
AGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAGCCTCGGGAAGAACAGTTCAA
CTCCACCTACCGGGTGGTGCTCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCA
AAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCTCCATCGAAAAGACCAT
CTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCAG
GAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGATTCTACCCCTC
CGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACC

CCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTGTACTCTCGCCTGACCGTGGACAAG
TCCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA
CCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCTGGGCAAG

SEQ ID NO: 164

hulG4_S228P-L235E; мутант S228P-L235E константной области тяжелой цепи IgG4 человека
ASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLGLG

SEQ ID NO: 165

h20-H2-L5Y; тяжелая цепь в формате hulG4_S228P
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGRIYPGIGNTY
YNKKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDAVYYCARGHYGRGMDYWGQGTLLTVVSS
ASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLGLG

SEQ ID NO: 166

h20-H2-L5Y; тяжелая цепь в формате hu-IgG4_S228P-L325E
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGRIYPGIGNTY
YNKKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDAVYYCARGHYGRGMDYWGQGTLLTVVSS
ASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLGLG

SEQ ID NO: 167

h20-H2-L5Y; легкая цепь
DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYYASTKES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISGLQAEDVAVYFCQQHYSTPWTGGGKVEIRRTVAAPSVEIF
PPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTL
TLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 168

VL008-AL13-8G5; гуманизированная переменная область тяжелой цепи; VH1m
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTYWMHWVHQAPGQRLEWMGMHPNSGTT
NYNQKFQGRVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDAVYYCTRSHYYDGHFSYWGQGTLLTVTS
S

SEQ ID NO: 169

VL008-AL13-8G5; гуманизированная переменная область тяжелой цепи; VH2m
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTYWMHWVRQAPGQGLEWMGMHPNSGTT
NYNQKFQGRVTMTVDKSASTAYMELSSLRSEDAVYYCTRSHYYDGHFSYWGQGTLLTVT
SS

SEQ ID NO: 170

VL008-AL13-8G5; гуманизированная переменная область тяжелой цепи; VH3
QVQLQESGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTYWMHWVRQAPGQGLEWMGMHPNSGTT
NYNEKFSRVMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCTRSHYYDGHFSYWGQGTLLTVTS
S

SEQ ID NO: 171

VL008-AL13-8G5; гуманизированная переменная область тяжелой цепи; VH4
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYFTFTYWMHWVRQAPGQGLEWMGMHPNSGTT
NYNEKFSRVTLTRDTSTSTAYMELSLRSDDAVYYCTRSHYYDGHFSYWGQGTMTVTS
S

SEQ ID NO: 172

VL008-AL13-8K3; гуманизированная переменная область легкой цепи; VL1
 DIVMTQSPGSLAVSLGERATFNCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRE
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGGGKVEVK

SEQ ID NO: 173

VL008-AL13-8K3; гуманизированная переменная область легкой цепи; VL2
 DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGGGKLEIK

SEQ ID NO: 174

VL008-AL13-8K3; гуманизированная переменная область легкой цепи; VL3
 EIVLTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKAGQSPKLLIYWASTRES
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGGGKVEIK

SEQ ID NO: 175

VL008-AL13-8K3; гуманизированная переменная область легкой цепи; VL4
 DIVMTQSPDLSVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES
 GVPDRFTGSGSGTDFTLTISALQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGGGTRLEIK

SEQ ID NO: 176

Константная область легкой цепи kappa человека
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Примеры

I. Получение антител мыши против CD47.

1. Иммунизация мышей.

Для получения антител мыши против CD47 человека (hCD47), потенциально перекрестно реактивных с CD47 мыши (mCD47), мышей NMRI дикого типа или CD47-KO (C57BL6) иммунизировали следующим образом согласно протоколу, включающему 4 инъекции ДНК с интервалами в 2 недели, после которых вводили две итоговые бустер-инъекции ДНК CD47 или клеток CHO, трансфицированных вектором экспрессии CD47, с интервалами в одну неделю:

(5) мыши ДТ (дикого типа): первичная инъекция ДНК CD47 человека + бустер-инъекция ДНК CD47 человека,

(3) мыши CD47 -/-: первичная инъекция ДНК CD47 человека + бустер-инъекция CHO CD47 мыши,

(3) мыши CD47 -/-: первичная инъекция CHO CD47 мыши + бустер-инъекция CHO CD47 мыши.

Умерщвление животных проводили в соответствии с результатами скрининга сыворотки. Присутствие и титр IgG, связывавшихся с CD47 человека или мыши, контролировали в сыворотке иммунизированных животных с применением ELISA (сенсibilизация слитым белком hCD47-IgG1 человека, hCD47-Fc или слитым белком mCD47-IgG1 человека, mCD47-Fc) и методом проточной цитометрии на стабильных клетках CHO, экспрессирующих hCD47 или mCD47 (полученных после трансфекции вектором, кодирующим hCD47 или mCD47, после чего проводили отбор стабильных CD47-экспрессирующих клонов; не показано). Животных, у которых наблюдались высокие титры IgG против CD47, умерщвляли. Отбирали селезенки и лимфатические узлы, мононуклеарные клетки (МНК) очищали и замораживали.

2. Скрининг отдельных В-клеток с применением технологии ISAAC и получение рекомбинантных антител против CD47.

Технология ISAAC, описанная в публикации WO 2009/017226, представляет собой уникальный способ обнаружения индивидуальных антитело-секретирующих клеток с применением микроматричных чипов, позволяет проводить анализ живых клеток в формате отдельной клетки и обеспечивает быструю, эффективную и высокопродуктивную (вплоть до 234000 индивидуальных клеток) систему для идентификации и выделения целевых клеток.

Матрицу отдельных живых клеток получали посредством нанесения МНК мыши, ранее очищенных из селезенки и лимфатических узлов иммунизированных мышей, на микроматричный чип. Поверхность чипа предварительно сенсibilизировали антигеном-мишенью (слитым белком hCD47-IgG1 человека, hCD47-Fc), и антитела мыши против CD47, секретируемые антитело-секретирующей клеткой, захватывались CD47, нанесенным на поверхность вокруг лунки. После промывок присутствие IgG мыши, связанного с иммобилизированным CD47, обнаруживали с помощью антитела против IgG мыши, присоединенного к Су3, и флуоресцентной микроскопии. Связывание антигена со специфичным антителом вызывало образование отдельных круглых точек, которые было легко отличить от неспецифичных сигналов. Затем отдельные CD47-специфичные антитело-секретирующие клетки отбирали посредством микроманипуляции, восстанавливали мРНК из отдельных клеток и последовательности кДНК, кодирующие переменные области тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей IgG, амплифицировали методом ОТ-ПЦР (полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией). Затем последовательности VH и VL клонировали

в векторы экспрессии, содержащие константную область γ -2а мыши (Fc γ 2а) и константную область кап-па или лямбда соответственно. После котрансфекции клеток CHO векторами экспрессии Н и L цепей рекомбинантное антитело очищали от супернатантов клеток на колонке с белком А и проводили анализ для подтверждения распознавания CD47 и специфичности методом ELISA на планшетах, сенсibilизированных hCD47-Fc или mCD47-Fc, и методом проточной цитометрии на клетках CHO, трансфицированных или не трансфицированных hCD47 или mCD47.

В сумме было идентифицировано 55 антител, 34 из которых (принадлежащие к 18 различным семействам зародышевой линии) получали и очищали. Из данных 34 антител 19 распознавали исключительно CD47 человека, 1 антитело распознавало исключительно CD47 мыши, и 14 антител распознавали CD47 человека и мыши.

II. Последовательности кандидатов против CD47.

В табл. 1-3 (выше) представлены последовательности аминокислот 10 выбранных кандидатов. В перечисленных последовательностях CDR идентифицированы согласно номенклатуре Кэбота и IMGT.

III. Исследование рекомбинантных антител мыши против CD47 in vitro.

1. Анализ связывания CD47 методом ELISA.

Изучали способность всех антител связываться с рекомбинантным hCD47-Fc и mCD47-Fc, нанесенными на планшеты для ELISA. Среди 34 исследованных очищенных антител 19 распознавали исключительно hCD47, 1 антитело распознавало исключительно mCD47, и 14 антител распознавали CD47 человека и мыши (данные не показаны).

2. Анализ связывания CD47 методом проточной цитометрии на трансфицированных CD47 клетках CHO и перекрестной реактивности с CD47 мыши и яванского макака.

Способность идентифицированных антител мыши против CD47 распознавать экспрессированный на мембране клетки CD47 человека, а также белок CD47 из других видов, дополнительно анализировали методом проточной цитометрии с применением клеток CHO, стабильно экспрессирующих антиген CD47, полученный от человека, мыши или нечеловекообразного примата (яванского макака). Экспрессию видоспецифичного CD47 на поверхности клетки CHO валидировали с применением окрашивания соответствующими антителами против CD47 и проточной цитометрии на нефиксированных клетках. Антитело B6H12 (IgG1 мыши, Abcam) применяли для подтверждения экспрессии CD47 человека и яванского макака, M1AP301 (IgG2a крысы, BD Biosciences) - для проверки экспрессии CD47 мыши, и MEM122 (IgM мыши, Abcam) - для экспрессии CD47 обезьяны.

Антитела против CD47 и антитела контроля изотипа инкубировали при различных концентрациях от 7,3 мкг/мл до 3,3 нг/мл с клетками CHO, экспрессирующими различные виды CD47, при температуре +4°C в течение 30 мин. После 2 промывок присутствие антитела, связанного с CD47 мембраны клетки, обнаруживали посредством инкубации с конъюгированным с ФЭ антителом IgG против иммуноглобулинов мыши или против иммуноглобулинов человека в зависимости от изотипа первичного антитела и анализа на проточном цитометре Accuri-C6 (BD Biosciences). Разницу между средней интенсивностью флуоресценции (СИФ), полученной для каждой концентрации антитела, и интенсивностью, полученной при отсутствии первичного антитела (разницу СИФ), рассчитывали и откладывали на графике в зависимости от концентраций антител. Для измерения фонового окрашивания антителом (неспецифичного окрашивания) в тех же условиях изучали антитела отрицательного контроля соответствующего изотипа (mIgG1, mIgG2a, hIgG1, hIgG4), которые не распознавали CD47.

Различные референсные антитела против hCD47 также исследовали параллельно с кандидатами согласно настоящему изобретению. Таковые включали B6H12 мыши, химерные 5F9 (c5F9) и гуманизированные антитела 5F9 (hu5F9; vh2-vl2) из Стэнфордского университета (WO 2011/143624); антитело 2A1 мыши и его гуманизированный вариант AB06.12 от Inhibrx (US 2013/0224188; WO 2014/123580); антитело 5A3M3 мыши от Novimmune (WO 2014/087248); и антитело VxP037-01LC1 мыши от Frazier et al. (WO 2014/093678).

Результаты, полученные для 10 антител мыши против CD47, обобщены в табл. 4 ниже; эти данные сравнивали с результатами, полученными с референсными антителами. Все 10 кандидатов-антител мыши против CD47 сильно связывались с клетками CHO, экспрессирующими CD47 человека и яванского макака, но не с нетрансфицированными клетками CHO. Кроме того, 5 кандидатов (кандидаты 14, 15, 26, 29 и 30) также сильно связывались с клетками CHO, экспрессирующими CD47 мыши, тогда как 5 других антител - нет. Эти результаты продемонстрировали, что 5 антител специфично распознавали CD47 человека и яванского макака (кандидаты 7, 19, 20, 22 и 33) и что 5 других антител также перекрестно реагировали с CD47, полученным от мыши (кандидаты 14, 15, 26, 29, 30), что свидетельствует о распознавании данными антителами отличного эпитопа или эпитопов.

Как было сообщено, референсные 2A1 и B6H12 распознавали hCD47 и перекрестно реагировали с супоCD47, но не с mCD47, тогда как антитело VxP037-01LC1 перекрестно реагировало с CD47 яванского макака и мыши, а также, возможно, с CD47 хомяка, экспрессированным на клетках CHO дикого типа.

Таблица 4

Краткая характеристика перекрестной реактивности антител против CD47

Антитело	CHO	CHO-hCD47	CHO-mCD47	CHO- cynoCD47
B6H12	-	++	-	+++
c5F9	-	+++	-	+++
hu5F9	-	+++	-	+++
5A3M3	-	++	-	++
2A1	-	+++	-	+++
AB06.12	-	+++	-	+++
VxP037-01LC1	++	+++	+++	+++
Кандидат 7	-	+++	-	+++
Кандидат 14	+	+++	+++	+++
Кандидат 15	+	+++	+++	+++
Кандидат 26	+/-	+++	+++	+++
Кандидат 19	-	+++	-	+++
Кандидат 33	-	+++	-	+++
Кандидат 20	+/-	+++	+/-	+++
Кандидат 22	+/-	+++	-	+++
Кандидат 29	-	+++	+++	+++
Кандидат 30	+/-	+++	+++	+++

-; +/-; +; ++; +++ в диапазоне от "отсутствия" обнаружения до "сильного" обнаружения.

3. Ингибирование взаимодействия CD47/SIRPα методом ELISA.

Изучали способность антител нарушать взаимодействие CD47 с SIRPα методом ELISA. За день до начала эксперимента дно 96-луночных планшетов сенсibilizировали слитым белком hCD47-hIgG1 и планшеты инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. Затем лунки промывали и насыщали в течение 2 ч при комнатной температуре. После стадий промывки в каждую лунку добавляли антиген (слитый белок hSIRPα-6HIS, Gentaur), а также антитела, исследование которых проводили, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывок присутствие или отсутствие взаимодействующего SIRPα обнаруживали с помощью конъюгированного с ПХ (пероксидазой хрена) вторичного антитела против 6His (Bethyl) и субстрата пероксидазы. Было установлено, что все 10 выбранных антител ингибировали связывание hSIRPα с hCD47 (данные не показаны).

4. Ингибирование взаимодействия CD47/SIRPα методом проточной цитометрии на клетках CHO.

Затем восемь наилучших кандидатов дополнительно выбирали в соответствии с их профилем связывания методом ELISA и на трансфицированных CD47 клетках CHO (кандидаты 7, 14, 15, 19, 20, 22, 26, 33) и изучали способность данных кандидатов ингибировать связывание SIRPα человека (hSIRPα) с hCD47, экспрессируемым на клетках CHO. Сначала клетки, трансфицированные CD47 человека (3×10^5 клеток/лунку 96-луночного планшета), инкубировали при температуре +4°C в течение 30 мин с серийными разведениями антител против CD47 или изотипическим контрольным антителом (в формате mIgG2a или mIgG1).

Затем клетки промывали и инкубировали с 10 мкг/мл метки His hSIRPα (His-hSIRPα, Gentaur) в течение 30 мин при температуре +4°C. После промывок связывание His-hSIRPα с клетками CHO обнаруживали посредством инкубации с антителом кролика против His (Bethyl), а затем - с антителом козы против IgG кролика, конъюгированным с ФИТЦ (флуоресцеинизотиоцианат, BD Biosciences), с применением анализа методом проточной цитометрии на проточном цитометре Accuri-C6 (BD Biosciences).

Процент ингибирования связывания hSIRPα с hCD47 рассчитывали следующим образом: % ингибирования = $(1 - (\text{СИФ_wAb} - \text{СИФ_wohSIRP}\alpha) / (\text{СИФ_whSIRP}\alpha - \text{СИФ_wohSIRP}\alpha)) \times 100$, где СИФ_wAb означает среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ), полученную с клетками hCD47-CHO, инкубированными с исследованным антителом и hSIRPα; СИФ_wohSIRPα означает СИФ, полученную при отсутствии hSIRPα (100% ингибирования связывания hSIRPα); и СИФ_whSIRPα означает флуоресценцию с hSIRPα, но без предварительной инкубации с антителом (0% ингибирования связывания SIRPα). Процент ингибирования откладывали на графике в зависимости от концентрации антитела, и значения IC₅₀ рассчитывали с применением модели анализа нелинейной регрессии программного обеспечения Graph-

Pad Prism.

Результаты, представленные на фиг. 1 и в табл. 5 ниже, демонстрируют, что 8 выбранных кандидатов (номера 7, 14, 15, 19, 20, 22, 26 и 33) существенно ингибировали связывание hSIRP α на hCD47, экспрессированном на клетках CHO, со значениями IC₅₀ в диапазоне от 0,36 до 1,10 мкг/мл (от 2,4 до 7,3 нМ). 8 кандидатов против CD47 превосходили антитела B6H12 и 5A3M3 и были аналогичны антителам 2A1 и VxP037-01LC1.

Таблица 5

Значения IC₅₀ антител против CD47 в анализе ингибирования CD47/SIRP α на трансфицированных CD47 клетках CHO и в анализе методом проточной цитометрии (средние значения n независимых экспериментов)

Антитело (формат mIgG)	Средняя IC ₅₀ (мкг/мл)	n
B6H12	4,920	7
2A1	0,739	7
VxP037-01LC1	0,759	6
5A3M3	4,798	4
Кандидат 7	0,657	6
Кандидат 14	0,737	5
Кандидат 15	0,605	5
Кандидат 19	0,858	5
Кандидат 20	0,440	2
Кандидат 22	0,482	2
Кандидат 26	0,359	4
Кандидат 33	1,108	4

5. Связывание антител против CD47 на hCD47, экспрессированном клетками Раджи.

Изучали способность восьми дополнительно выбранных кандидатов (номер 7, 14, 15, 19, 20, 22, 26, 33) к связыванию с hCD47, экспрессируемым на линии клеток Раджи В-лимфомы человека. Сначала клетки Раджи (ATCC-CLL-86; 2×10^5 клеток/лунку 96-луночного планшета) инкубировали при температуре +4°C в течение 30 мин с серийными разведениями антител против CD47 или антитела контрольного изотипа (в формате mIgG2a или mIgG1). Затем клетки промывали и инкубировали в течение 30 мин при температуре +4°C с конъюгированным с ФЭ F(ab)'₂-антителом козы против IgG мыши (разведение 1/100, Beckman Coulter). После промывок анализировали флуоресценцию клеток методом проточной цитометрии на проточном цитометре Accuri-C6 (BD Biosciences).

Для каждой концентрации антитела рассчитывали разницу СИФ, представляющую собой разницу между интенсивностью, измеренной с исследованным антителом, и интенсивностью при отсутствии антитела, и значения откладывали на графике в зависимости от концентраций антитела. Затем с применением модели анализа нелинейной регрессии программного обеспечения GraphPad Prism рассчитывали значения EC₅₀.

Результаты, представленные на фиг. 2 и в табл. 6 ниже, демонстрируют, что 8 кандидатов (номер 7, 14, 15, 19, 20, 22, 26 и 33) сильно связывались с hCD47, экспрессируемым на клетках Раджи, со значениями EC₅₀ в диапазоне от 0,03 до 0,17 мкг/мл (от 0,2 до 1,1 нМ). По результатам конкурентных анализов 8 кандидатов против CD47 превосходили антитела B6H12 и 5A3M3 и были аналогичными антителам 2A1 и VxP037-01LC1.

Таблица 6

Значения EC_{50} антител против CD47 в анализе связывания CD47 на клетках Раджи в анализе методом проточной цитометрии (средние значения n независимых экспериментов)

Антитело (формат mIgG)	Средняя EC_{50} (мкг/мл)	n
B6H12	2,930	2
2A1	0,058	3
VxP037-01LC1	0,074	2
5A3M3	0,301	1
Кандидат 7	0,058	2
Кандидат 14	0,055	2
Кандидат 15	0,031	2
Кандидат 19	0,165	2
Кандидат 20	0,096	3
Кандидат 22	0,136	2
Кандидат 26	0,070	2
Кандидат 33	0,112	2

6. Ингибирование взаимодействия CD47/SIRP α методом проточной цитометрии на клетках Раджи.

Изучали способность шести из 8 дополнительно выбранных кандидатов (номер 14, 15, 19, 20, 22, 33) ингибировать связывание hSIRP α с hCD47, экспрессируемым на клетках Раджи В-лимфомы человека. С данной целью сначала клетки Раджи (ATCC-CCL-86; 2×10^5 клеток/лунку 96-луночного планшета) инкубировали при температуре +4°C в течение 30 мин с серийными разведениями антител против CD47 или изотипическим контрольным антителом (химерные кандидаты против CD47, полученные в формате hIgG1 или hIgG4). Затем клетки промывали и инкубировали с 2,5 мкг/мл меченного His-hSIRP α (His-hSIRP α , Gentaur) в течение 30 мин при температуре +4°C. После промывок связывание His-hSIRP α на клетках Раджи обнаруживали посредством инкубации с антителом мыши против His (разведение 1/1000; Qiagen), а затем - с конъюгированным с ФЭ антителом козы против IgG мыши (разведение 1/100; Beckman Coulter) с применением анализа методом проточной цитометрии на проточном цитометре Accuri-C6 (BD Biosciences).

Процент ингибирования связывания hSIRP α с hCD47 рассчитывали следующим образом: % ингибирования = $(1 - (\text{СИФ_wAb} - \text{СИФ_wohSIRP}\alpha) / (\text{СИФ_whSIRP}\alpha - \text{СИФ_wohSIRP}\alpha)) \times 100$, где СИФ_wAb представляет собой среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ), полученную с клетками Раджи, которые инкубировали с исследуемым антителом и hSIRP α ; СИФ_wohSIRP α представляет собой СИФ, полученную при отсутствии hSIRP α (100% ингибирования связывания hSIRP α); и СИФ_whSIRP α представляет собой флуоресценцию с hSIRP α , но без предварительной инкубации с антителом (0% ингибирования связывания SIRP α). Процент ингибирования откладывали на графике в зависимости от концентрации антитела, и значения IC_{50} рассчитывали с применением модели анализа нелинейной регрессии программного обеспечения GraphPad Prism.

Результаты, представленные на фиг. 3 и в табл. 7 ниже, демонстрируют, что 6 выбранных кандидатов (номер 14, 15, 19, 20, 22 и 33) существенно ингибировали связывание hSIRP α с hCD47, экспрессируемым на клетках Раджи, со значениями IC_{50} в диапазоне от 0,021 до 0,369 мкг/мл (от 0,14 до 2,46 нМ). 6 кандидатов против CD47 являлись аналогичными химерному антителу B6H12 и химерному антителу 5F9, а также гуманизированным антителам 5F9 и AB06.12 или превосходили эти антитела.

Таблица 7

Значения IC₅₀ антител против CD47 в анализе ингибирования hCD47/hSIRP α на клетках Раджи и в анализе методом проточной цитометрии (средние значения n независимых экспериментов)

Антитело (формат hIgG)	Средняя IC ₅₀ (мкг/мл)	n
Химерное B6H12	0,400	1
Химерное c5F9	0,209	5
Гуманизированное Hu5F9	0,109	3
Гуманизированное AB06.12	0,082	4
Кандидат 14	0,021	2
Кандидат 15	0,021	2
Кандидат 19	0,369	3
Кандидат 20	0,110	6
Кандидат 22	0,233	4
Кандидат 33	0,110	3

7. Фагоцитоз клеток Раджи макрофагами человека.

CD47 считают сигналом "не ешь меня", предотвращающим фагоцитоз CD47-экспрессирующих клеток посредством взаимодействия с SIRP α , экспрессированным на клетках с фагоцитарной активностью, таких как макрофаги. Для оценки способности наилучших кандидатов усиливать фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами сначала на клетки Раджи В-лимфомы человека наносили 5(6)-карбоксифлуоресцеин N-гидроксисукцинимидил сложный эфир (CFSE, 2,5 мкМ, Abcam), а затем клетки инкубировали с различными разведениями антител против CD47 или контрольного антитела (формат mIgG1). Затем клетки промывали и помещали в окружение адгерентных макрофагов, ранее дифференцировавших из моноцитов периферической крови человека, в 24-луночных планшетах в присутствии 10 мкг/мл M-CSF (Pepro-tech) в течение 9 дней. После 4 ч инкубации при температуре +37°C смеси клеток интенсивно промывали холодным ФБР (фосфатным буферным раствором), и адгезивные макрофаги фиксировали ПФА. Фиксированные клетки изучали под флуоресцентным микроскопом Axiovert 40FL (Zeiss), оснащенным лампой HB050. Изображения зеленой флуоресценции (клетки Раджи) и светлого поля (макрофаги) наблюдали с помощью цифрового фотоаппарата AxioCam и подсчитывали количество клеток Раджи (зеленая флуоресценция) и макрофагов на поле с применением программного обеспечения ZEN lite Image Analysis. Затем рассчитывали индекс фагоцитоза как количество клеток Раджи, поглощенных на 100 макрофагов.

Результаты, представленные на фиг. 4 и в табл. 8 ниже, демонстрируют, что 8 выбранных кандидатов (номер 7, 14, 15, 19, 20, 22, 26 и 33) усиливали фагоцитоз клеток Раджи макрофагами человека. В субоптимальной концентрации (0,125 мкг/мл) кандидаты превосходили антитела B6H12 и 5A3M3 и являлись аналогичными антителам 2A1 и VxP037-01LC1.

Таблица 8

Индекс фагоцитоза антител против CD47 (в концентрации 0,125 мкг/мл) в фагоцитарном анализе Раджи с макрофагами человека

Антитело (формат mIgG1)	Среднее	CO	n
B6H12	33,1	31,3	7
2A1	112,8	39,9	5
VxP037-01LC1	88,4	28,9	4
5A3M3	29,9	4,4	2
Кандидат 7	123,6	14,9	3
Кандидат 14	78,9	39,3	5
Кандидат 15	74,4	35,6	4
Кандидат 19	73,9	16,8	3
Кандидат 20	118,6	36,6	4
Кандидат 22	105,8	55,5	4
Кандидат 26	85,3	15,1	2
Кандидат 33	71,4	27,7	3

8. Анализ агглютинации красных клеток крови.

Изучали способность 8 предварительно выбранных кандидатов вызывать агглютинацию красных

клеток крови (кКК) человека и сравнивали с референсными антителами.

В первой серии экспериментов кКК, очищенные из периферической крови человека, инкубировали с серийным разведением антител против CD47 или контрольными антителами в течение 1 ч при температуре 37°C в 96-луночных планшетах с U-образным дном. После инкубации доказательство агглютинации кКК демонстрировали на основании появления помутнения по сравнению с точечным красным конгломератом неагглютинированных кКК. Измеряли площадь конгломератов кКК, и индекс гемагглютинации рассчитывали на основании соотношения площади кКК при различных концентрациях антитела по сравнению с площадью кКК без антитела, по существу, как описано в публикации WO 2014/123580. Индексы гемагглютинации откладывали на графике в зависимости от концентраций антитела, как показано на фиг. 5. Было установлено, что кандидаты 14 и 15 и в меньшей степени кандидат 26 вызывают существенную агглютинацию очищенных кКК. Следует отметить, что эти 3 антитела принадлежат к одному семейству клона и перекрестно реагируют с mCD47. Напротив, кандидаты 19, 20 и 33 не вызывали агглютинацию очищенных кКК при исследовании в концентрациях в диапазоне от 0,01 до 240 нМ (от ~1,5 нг/мл до 36 мкг/мл), что также наблюдали в случае антитела 2A1. Было установлено, что кандидаты 7 и 22 вызывают слабую агглютинацию в узком диапазоне концентраций, что также наблюдали в случае антител VxP037-01LC1 и B6H12. Антитело 5A3M3 вызывало агглютинацию очищенных кКК исключительно в высоких концентрациях.

Во второй серии экспериментов изучали способность 8 выбранных кандидатов вызывать агглютинацию кКК человека с применением неочищенных кКК из цельной периферической крови, по существу, как описано в публикации WO 2014/087248. С данной целью периферическую кровь человека (конечное разведение 1/5) инкубировали с серийными разведениями антител против CD47 или контрольными антителами в течение ночи при температуре 37°C в 96-луночных планшетах с плоским дном. После инкубации планшеты аккуратно встряхивали, наклоняли приблизительно на 30° и оставляли на 10 мин. Свидетельство агглютинации кКК демонстрировали на основании наличия слипшегося отложения в форме полумесяца на дне вокруг нижней границы лунки. Изучали различные форматы кандидатов против CD47 и сравнивали с референсными антителами. Кандидат 20 в химерном формате mIgG1 или hIgG1 не вызывал агглютинацию кКК в диапазоне исследованных концентраций от 0,023 до 50 мкг/мл (от ~0,15 до 330 нМ), что также наблюдали в случае антител 2A1 и AB06.12 (гуманизированное 2A1). Слабую агглютинацию кКК наблюдали в случае концентраций выше 16 мкг/мл как для кандидата 20, так и для антитела AB06.12 в формате hIgG4. Напротив, химерное 5F9 (c5F9) и гуманизированное 5F9 (hu5F9, вариант vh2/vl2) вызывали более существенную агглютинацию при исследовании в форматах hIgG1 и hIgG4. Химерное B6H12 вызывало агглютинацию кКК в формате hIgG1, но более слабую в изотипе hIgG4.

В данном анализе с цельной кровью было установлено, что кандидаты 19, 22 и 33 вызывали агглютинацию кКК в концентрациях свыше 5 мкг/мл. Данное наблюдение не зависело от исследуемого формата (mIgG химерный hIgG). Наконец, кандидаты 14 и 15 и в меньшей степени кандидаты 7 и 26 вызывали существенную агглютинацию неочищенных кКК.

Данные анализа агглютинации кКК обобщены в табл. 9 ниже.

Таблица 9

Активность антител против CD47 в отношении агглютинации кКК

Активность антител против CD47 в отношении агглютинации кКК						
Антитело	Агглютинация кКК на					
	Очищенных кКК	Цельной крови				
		mIgG или hIgG	mIgG1	mIgG2a	hIgG1	hIgG4
B6H12	+ / - (m, h)	+++	+++	+++	+ / ++	
c5F9	НП	НП	НП	+++	+++	
hu5F9	НП	НП	НП	+++	+++	
5A3M3	+++ (m1)	+/-	НП	НП	НП	
2A1	- (m1)	-	НП	НП	НП	
AB06.12	НП	НП	НП	-	+/-	
VxP037-01LC1	+ (m1)	+	НП	НП	НП	
Кандидат 7	++ (m1, m2a)	++	++	НП	++	
Кандидат 14	++++ (m, h)	++++	++++	++++	++++	
Кандидат 15	+++ (m, h)	++++	++++	++++	+++	
Кандидат 26	++ (m2a)	НП	++	НП	++	
Кандидат 19	- (m1, m2a)	+++	++	+++	+ / +++	
Кандидат 33	-	+++	+++	+++	+++	
Кандидат 20	-	-	-	-	+/-	
Кандидат 22	+ / ++	+++	+++	+++	+++	

НП: не проводили; m: mIgG; m1: mIgG1; m2a: mIgG2a; h: hIgG;

+/-, слабая агглютинация, наблюдавшаяся исключительно при концентрации антитела 50 мкг/мл; +, агглютинация при концентрации антитела 50 мкг/мл; ++, агглютинация при концентрациях $\geq 16,7$ мкг/мл; +++, агглютинация при концентрациях $\geq 5,6$ мкг/мл.

9. Аффинность лучших кандидатов мыши против CD47.

Затем измеряли кинетические константы (K_{on} и K_{off}) и константу диссоциации (KD) кандидатов мыши против CD47 методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на приборе Biacore T200 (GE Healthcare) с применением растворимого препарата внеклеточного домена CD47 человека, меченного 6His-меткой (SEQ ID NO: 160) (белок hCD47-his), и сравнивали с эталонами. Вкратце, аффинность связывания между антителами и hCD47-his измеряли с применением кинетического протокола одного цикла прибора Biacore T200 при температуре +20°C. Сначала IgG (Fc) против иммуноглобулинов человека или против иммуноглобулинов мыши иммобилизовали на поверхности сенсорных чипов CM5 серии S с применением захватывающего антитела человека или мыши и наборов для сочетания с аминами согласно инструкциям производителя (GE Healthcare). В результате этого на поверхности было иммобилизовано приблизительно 10000 единиц ответа (ЕО). Затем антитела мыши, химерные или гуманизированные антитела, исследование которых проводили, захватывали на соответствующей поверхности IgG против иммуноглобулинов мыши или против иммуноглобулинов человека во всех проточных ячейках, за исключением проточной ячейки 1, использовавшейся в качестве контроля, в концентрации и при времени осуществления контакта, откорректированных таким образом, чтобы на поверхности были захвачены ~300 ЕО. Кинетику связывания исследовали посредством пропускания через все проточные ячейки увеличивающихся концентраций hCD47-his в сериях из пяти инъекций длительностью 10 мин при скорости 30 мкл/мин. Использовали трехкратные разведения вплоть до максимальной концентрации 270 нМ. После итоговой инъекции через каждую проточную ячейку пропускали буфер в течение 60 мин (в случае антител против иммуноглобулинов мыши) или 30 мин (в случае антител против иммуноглобулинов человека) для контроля диссоциации связавшегося антигена. Регенерацию поверхности связывания проводили по окончании цикла посредством пропускания 3М $MgCl_2$ в течение 60 с при скорости 20 мкл/мин, после чего пропускали 10 мМ глицин-HCl, pH 1,7 в течение 180 с при скорости 10 мкл/мин (в случае антител против иммуноглобулинов человека) или посредством пропускания 10 мМ глицин-HCl, pH 1,7 в течение 360 с при скорости 10 мкл/мин (в случае антител против иммуноглобулинов мыши). В качестве контроля запускали второй цикл с тем же антителом, но без антигена. Кинетические константы связывания оценивали посредством нелинейной аппроксимации данных сенсограмм к модели связывания 1:1, представленной в программном обеспечении Biacore T200 Evaluation. Результаты представлены в табл. 10 ниже. Все кандидаты демонстрировали аффинность в наномолярном диапазоне с KD от 0,9 до 4,2 нМ, за исключением кандидата 22, который продемонстрировал более слабую аффинность с KD 15,7 нМ. Как показано на фиг. 6, все предварительно выбранные кандидаты, за исключением кандидата 33, отличались от антител B6H12, 2A1 и VxP037-01LC1 тем, что демонстрировали более быструю кинетику диссоциации со значениями K_{off} в диапазоне от $3,4 \times 10^{-3}$ до $1,8 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ по сравнению с от 5,0 до $8,9 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ для B6H12, 2A1 и VxP037-01LC1.

Таблица 10

Кинетические константы и константы аффинности антител против CD47 на приборе Biacore (средние значения независимых экспериментов)

Антитело	KD (М)	K_{on} (1/Мс)	K_{off} (1/с)	n
B6H12	$5,14 \times 10^{-9}$	$1,29 \times 10^4$	$6,59 \times 10^{-5}$	7
VxP037-01LC1	$2,56 \times 10^{-10}$	$3,54 \times 10^5$	$8,87 \times 10^{-5}$	3
2A1	$1,27 \times 10^{-10}$	$4,01 \times 10^5$	$4,99 \times 10^{-5}$	4
Кандидат 7	$1,94 \times 10^{-9}$	$1,90 \times 10^5$	$3,70 \times 10^{-4}$	2
Кандидат 14	$3,85 \times 10^{-9}$	$8,74 \times 10^5$	$3,37 \times 10^{-3}$	2
Кандидат 15	$4,24 \times 10^{-9}$	$5,65 \times 10^5$	$2,39 \times 10^{-3}$	2
Кандидат 19	$2,25 \times 10^{-9}$	$7,90 \times 10^4$	$1,76 \times 10^{-4}$	4
Кандидат 20	$4,16 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^5$	$4,18 \times 10^{-4}$	4
Кандидат 22	$1,57 \times 10^8$	$2,07 \times 10^4$	$3,25 \times 10^{-4}$	2
Кандидат 26	$1,87 \times 10^{-9}$	$2,00 \times 10^5$	$3,72 \times 10^{-4}$	2
Кандидат 33	$8,98 \times 10^{-10}$	$7,46 \times 10^4$	$6,70 \times 10^{-5}$	2

10. Высвобождение антител против CD47 после связывания с кКК человека или с опухолевыми клетками и фагоцитоз опухолевых клеток антителами против CD47 в соответствии с их значением K_{off} .

CD47 экспрессируется на циркулирующих клетках крови, в частности на кКК, и представляет собой важный источник эффекта поглощения, который может в значительной степени повлиять на фармакокинетику и эффективность терапевтического антитела против CD47 посредством снижения количества свободного антитела, доступного для клеток-мишеней, таких как опухолевые клетки. Кроме того, значительное и длительное связывание антител против CD47 с кКК может также повысить риск токсичности, такой как анемия. Кинетика связывания по сравнению с высвобождением антитела от его антигена, главным образом, зависит от кинетики ассоциации и диссоциации антитела, которую можно количественно определить посредством измерения значения K_{on} и K_{off} , соответственно, например, методом ППР, как проводили для антител против CD47 согласно настоящему изобретению. Для оценки влияния кинетики

диссоциации антител против CD47 на их высвобождение после связывания с кКК *in vitro* очищенные кКК человека инкубировали с 1 мкг/мл кандидатов мыши против CD47 14, 19, 20 или 22, или с 1 мкг/мл антитела мыши против CD47 2A1 или B6H12. Эти кандидаты против CD47 были выбраны, поскольку они характеризовались значениями Koff, превосходящими $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или даже превосходящими $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ для кандидата 14 (см. табл. 10). И наоборот, значение Koff референсных антител против CD47 2A1 и B6H12 составляло менее $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ (табл. 10). После 30 мин инкубации с антителами при температуре +4°C кКК промывали, ресуспендировали в не содержащем антитела буфере ФБР/БСА (бычий сывороточный альбумин)/EDTA и инкубировали при температуре +37°C в течение 6 или 24 ч. По прошествии различных времен инкубации кКК промывали в буфере ФБР/БСА/EDTA и инкубировали с конъюгированным с ФЭ IgG козы против иммуноглобулинов мыши при температуре +4°C. Затем анализировали связывание антител мыши против CD47 на кКК методом проточной цитометрии. Для каждого антитела регистрировали среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ), полученную посредством гейтирования жизнеспособных кКК после 6 ч (T+6 ч) или 24 ч (T+24 ч), и сравнивали с СИФ, полученной на кКК, проанализированных непосредственно перед периодами инкубации при температуре +37°C (T0). Результаты выражали в виде процентного снижения СИФ, зарегистрированной после инкубации T+6 ч или T+24 ч при температуре +37°C, по сравнению с СИФ, зарегистрированной в момент времени T0 до стадий инкубации.

Как показано на фиг. 20, СИФ кКК, окрашенных кандидатами 14, 19, 20 и 22, уже была в значительной степени снижена после 6 ч и еще более существенно снижалась после 24 ч инкубации при температуре +37°C. Эти результаты свидетельствуют, что кандидаты 14, 19, 20 и 22 постепенно отсоединялись от кКК после связывания с экспрессированным на мембране антигеном CD47. Напротив, после 6 или 24 ч инкубации при температуре +37°C СИФ кКК, окрашенных антителом 2A1 или B6H12, не менялась или менялась исключительно слабо; это свидетельствует, что антитела 2A1 и B6H12 сильно прикрепились к кКК и не высвобождались или исключительно медленно высвобождались во внеклеточную среду.

Следует отметить, что несмотря на то, что с определенными антителами (кандидаты 14 и 22, антитело B6H12) наблюдалась агглютинация, данная агглютинация существенно не влияла на анализ единичных кКК методом проточной цитометрии.

Эти результаты позволяют предположить, что антитела против CD47, такие как кандидаты 14, 19, 20 и 22, которые характеризуются сходной кинетикой диссоциации с высоким значением Koff, превосходящим $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, будут более быстро высвобождаться от кКК для достижения клеток-мишеней. Таким образом, антитела против CD47, такие как кандидаты 14, 19, 20 и 22, будут в большей степени достигать CD47, экспрессированного на целевых опухолевых клетках, по сравнению с антителами с медленной кинетикой диссоциации, такими как 2A1 или B6H12, которые характеризуются значением Koff менее $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$.

И наоборот, антитело с высокой скоростью диссоциации от экспрессированного на клетке CD47 может являться менее эффективным для усиления фагоцитоза опухолевой клетки, чем антитело с более медленной скоростью диссоциации. Для решения данной проблемы проводили эксперимент, аналогичный эксперименту по связыванию/высвобождению, проведенному выше на кКК, для измерения высвобождения антител против CD47 опухолевыми клетками *in vitro* и его эффекта в отношении фагоцитоза опухолевых клеток. С данной целью клетки Раджи лимфомы человека инкубировали с кандидатами мыши против CD47 14, 19, 20 или 22 либо с антителами мыши против CD47 B6H12 или 2A1 в концентрации 1 мкг/мл в течение 30 мин при температуре +4°C, затем промывали и снова инкубировали в среде, не содержащей антитела, в течение 24 ч при температуре +37°C. Затем клетки собирали после периода инкубации 24 ч (T+24 ч), промывали в ФБР и фиксировали 4% ПФА. В качестве положительного контроля окрашивания клетки также фиксировали 4% ПФА непосредственно перед инкубацией в течение 24 ч (время T0). По прошествии последнего периода инкубации фиксированные клетки окрашивали конъюгированным с ФЭ антителом козы против IgG мыши и анализировали методом проточной цитометрии. Для каждого антитела регистрировали среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ), полученную после инкубации в течение 24 ч (T+24 ч), и сравнивали с СИФ, полученной на клетках Раджи, которые анализировали непосредственно перед периодами инкубации при температуре +37°C (T0). Результаты выражали в виде процентного снижения СИФ клеток, зарегистрированной после инкубации T+24 ч при температуре +37°C, по сравнению с СИФ, зарегистрированной в момент времени T0 до стадий инкубации.

Как показано на фиг. 21A, сразу после 24 ч инкубации клеток Раджи при температуре 37°C наблюдали существенное снижение СИФ кандидата 14, в то время как для кандидатов 19, 20 и 22, а также для антитела 2A1, но не для B6H12, наблюдали более слабое уменьшение. Эти результаты демонстрируют, что антитела против CD47 с очень быстрой кинетикой диссоциации, такие как кандидат 14, который характеризовался значением Koff более $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, будут более быстро и более интенсивно отсоединяться от опухолевых клеток Раджи, и могут, таким образом, быть менее эффективными для усиления фагоцитоза опухолевых клеток, чем антитела против CD47 с более медленной скоростью диссоциации, такие как

кандидат 19, 20 и 22, которые характеризуются значением K_{off} менее $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$.

Для решения данной проблемы сначала клетки Раджи метили красителем CFSE, а затем окрашивали антителами против CD47 в концентрации 0,1 или 1 мкг/мл в течение 30 мин при температуре $+4^\circ\text{C}$. Затем клетки Раджи промывали и инкубировали в течение 24 ч при температуре $+37^\circ\text{C}$ в среде, не содержащей антитела, как описано выше. По прошествии периода инкубации в течение 24 ч (T+24 ч) клетки Раджи исследовали в анализе фагоцитоза с hMDM с применением анализа фагоцитоза методом проточной цитометрии, по существу, как описано в публикации Tseng et al. (Tseng D., Volkmer J-P., Willingham S.B., Contreras-Trujillo H., et al. "Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response", PNAS 110(27): 11103-08 (2013)). Опухолевые клетки-мишени Раджи, предварительно меченные красителем CFSE до окрашивания антителами против CD47, инкубировали с hMDM, которые были предварительно помечены красителем Far-Red. Через 60 мин инкубации при температуре 37°C клетки собирали, анализировали методом проточной цитометрии и контролировали флуоресценцию CFSE и Far-Red. Популяции клеток, которые оказались дважды окрашенными CFSE и Far-Red, соответствовали опухолевым клеткам-мишеням, которые фагоцитозировали макрофаги. В качестве положительного контроля фагоцитоза (время T0) тот же эксперимент проводили с тем же препаратом hMDM, меченным Far-Red и инкубированным с мечеными CFSE клетками Раджи, окрашенными отличными антителами против CD47, в концентрации 0,1 или 1 мкг/мл, как выше, но клетки Раджи не инкубировали в течение 24 ч при температуре $+37^\circ\text{C}$. Это соответствовало времени T0 эталона до инкубации в среде, не содержащей антитела. Процент фагоцитозированных клеток рассчитывали на основании процента клеток, дважды окрашенных CFSE и Far-Red, в каждом состоянии. Процент фагоцитоза, специфичный для каждого антитела, рассчитывали посредством вычитания процента фагоцитоза, полученного с клетками Раджи, обработанными нерелевантным антителом в тех же условиях. Наконец, результаты выражали в виде процентного снижения специфического фагоцитоза, полученного в T+24 ч, по сравнению со специфическим фагоцитозом, измеренным в T0, для каждого исследованного антитела с применением формулы % снижения фагоцитоза = $(1 - (\% \text{ специфического фагоцитоза в T+24 ч с антителом A} / \% \text{ специфического фагоцитоза в T0 с антителом A})) \times 100$.

Как показано на фиг. 21B, на клетках Раджи, окрашенных кандидатом 14 против CD47, наблюдали весьма значительное снижение фагоцитоза: после окрашивания 1 мкг/мл кандидата 14 наблюдали снижение фагоцитоза приблизительно 60%, а на клетках Раджи, окрашенных 0,1 мкг/мл, наблюдали снижение даже вплоть до 100%. Напротив, в случае клеток Раджи, окрашенных кандидатами 19, 20 и 22, наблюдали исключительно слабое снижение фагоцитоза относительно референсных 2A1 и B6H12.

В целом, эти результаты демонстрируют, что антитела против CD47 с высокой скоростью диссоциации, которые характеризуются значением K_{off} более $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ (такие как кандидат 14), будут интенсивно и быстро отсоединяться от кКК, но также будут быстро утрачивать большую часть своей функциональной активности в отношении опухолевых клеток, т.е. усиление фагоцитоза опухолевых клеток. Таким образом, такие антитела могут обладать меньшим эффектом поглощения/побочным эффектом, но также более слабой противоопухолевой эффективностью. Напротив, антитела против CD47 с очень медленной скоростью диссоциации, которые характеризуются значением K_{off} менее $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ (такие как 2A1 и B6H12), будут более медленно отсоединяться от опухолевых клеток, но будут оставаться присоединенными к кКК и могут, таким образом, оказывать значительный эффект поглощения и, возможно, больше побочных эффектов. Вследствие этого антитела против CD47 с промежуточной кинетикой диссоциации, которые характеризуются значением K_{off} от 1×10^{-4} до $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ (такие как кандидаты 19, 20 или 22), будут характеризоваться оптимальным равновесием связывания/высвобождения CD47 для обеспечения слабого эффекта поглощения с поддержанием противоопухолевой эффективности.

11. Анализ апоптоза на клетках Юркат.

Было установлено, что среди 8 исследованных кандидатов кандидаты 14 и 15 вызывали значительный апоптоз клеток Юркат человека (клеток Т-клеточного лейкоза), и кандидат 26 также вызывал слабый апоптоз (данные не показаны), тогда как кандидаты 20 и 22 апоптоз не вызывали. Полученные данные позволяют предположить, что данное семейство антител распознавало эпитоп на hCD47, который обеспечивал активность передачи сигналов в CD47-экспрессирующие клетки после ангажирования CD47. Данный тип агонистических антител может вызывать ненаправленные действия *in vivo*.

12. Краткое описание исследования *in vitro*.

Вкратце, 34 антитела против CD47 получали, очищали и оценивали *in vitro* в отношении специфичности и функциональности. Восемь кандидатов (номер 7, 14, 15, 19, 20, 22, 26, 33) были предварительно выбраны на основании их активности связывания и функциональных анализов (ингибирование взаимодействия hCD47/hSIRP α , индукция фагоцитоза), а затем полностью охарактеризованы в анализах, в которых измеряли их аффинность и активность в отношении агглютинации кКК.

Все 8 кандидатов в высокой степени распознавали как hCD47, так и супоCD47, и связывались с hCD47 с аффинностью в диапазоне от 0,9 до 15,7 нМ. Все 8 кандидатов существенно ингибировали взаимодействие hCD47/hSIRP α и были способны индуцировать фагоцитоз клеток лимфомы Раджи макрофагами человека.

Три антитела (кандидаты 14, 15, 26), принадлежащие к одному семейству клонов, также перекрестно реагировали с mCD47 и, как было установлено, вызывали значительный апоптоз опухолевых клеток Юркат и вызывали существенную агглютинацию кКК. Эти кандидаты могут вызывать потенциальную токсичность при инъектировании *in vivo*.

Кандидат 20 (уникальный в данном семействе клонов) характеризовался наилучшим профилем с мощной функциональной активностью и очень слабой, но обнаруживаемой агглютинацией кКК, что свидетельствует о слабой потенциальной токсичности, в случае ее наличия.

Кандидаты 19 и 33 (одно семейство клонов), а также кандидаты 7 и 22 (уникальные в соответствующих семействах клонов) также демонстрировали значительную функциональную активность с некоторой, но приемлемой агглютинацией кКК в зависимости от формата исследованных IgG.

Кандидаты 19, 20 и 22 со значением K_{off} от 1×10^{-4} до $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ также демонстрировали быстрое высвобождение после связывания с кКК человека, но сохраняли эффективную функциональную активность, измеренную методом фагоцитоза опухолевых клеток макрофагами человека.

IV. Исследование выбранных кандидатов мыши против CD47 *in vivo*.

Выбранные кандидаты 19, 20 и 22, специфичные в отношении hCD47, изучали на ксенотрансплантатных моделях опухоли на мышах *in vivo*. Кандидаты 14 и 15 также исследовали *in vivo* в первых исследованиях в качестве антител против CD47, перекрестно реактивных с mCD47.

1. Модель лимфомы Раджи человека.

Кандидатов 14, 19, 20 и 22 против CD47 оценивали *in vivo* на ксенотрансплантатной модели неходжкинской лимфомы (НХЛ) человека на мышах NOG ($n=8$ на группу), которым трансплантировали клетки Раджи (1,5 млн клеток, инъектированных подкожно в правый бок). Через десять дней после трансплантации клеток опухоли являлись пальпируемыми; начинали терапию антителом (10 мг/кг/доза, интраперитонеальная инъекция, 3 раза в неделю в течение вплоть до 8 недель) - четырьмя кандидатами против CD47 параллельно с антителом отрицательного контроля и референсными антителами против CD47 2A1, B6H12 и VpX037-01LC1. Все антитела представляли собой формат изотипа mIgG1. Рост опухоли контролировали каждые 2 дня и регистрировали выживаемость мышей. Четыре кандидата 14, 19, 20 и 22 отсрочивали рост клеток Раджи, как и референсные B6H12 и 2A1, но не антитело VpX037-01LC1, которое существенно перекрестно реагировало с CD47 мыши (фиг. 9A). Как показано на фиг. 9B, также было установлено, что кандидаты 20 и 22 обеспечивали значительную защиту мышей по сравнению с контрольной группой, как и референсные B6H12 и 2A1, но не VpX037-01LC1.

Эти результаты свидетельствуют, что четыре исследованных кандидата (кандидаты 14, 19, 20 и 22) были способны контролировать рост опухолевых клеток НХЛ Раджи человека у мышей с ослабленной иммунной системой, как предварительно сообщалось для референсного антитела против CD47, такого как B6H12. Кандидаты 20 и 22 оказались более активными, чем кандидаты 14 и 19, в отношении увеличения выживаемости мышей.

2. Ксенотрансплантатная модель A2780 яичников человека.

Затем кандидата 20 против CD47 изучали *in vivo* на ксенотрансплантатной модели A2780 яичников человека в монотерапии или в комбинации с антителом против EGFR цетуксимабом (Эрбитукс®) или антителом против Her2 трастузумабом (Герцептин®). Клетки A2780 интенсивно экспрессировали CD47, что было обнаружено посредством связывания кандидата 20, а также Her2, что было обнаружено посредством связывания Герцептина® (данные не показаны). Напротив, клетки A2780 *in vitro* экспрессировали лишь низкие уровни EGFR, измеренные методом окрашивания Эрбитуксом® (данные не показаны). Мышам NOG ($n=4$ на группу) трансплантировали трансфицированные люциферазой клетки A2780 (A2780/Luc) (10 млн клеток, инъектированных интраперитонеально). Через один день после трансплантации клеток начинали терапию антителом (10 мг/кг/доза, интраперитонеальная инъекция, 3 раза в неделю в течение вплоть до 5 недель) - кандидатом 20 против CD47 в монотерапии или в комбинации с Герцептином® или Эрбитуксом®.

Интенсивность биолюминесценции (ИБЛ) контролировали каждые 5 дней в вентральном и дорзальном положениях. Результаты, представленные на фиг. 10, продемонстрировали, что лечение кандидатом 20 против CD47 в монотерапии отсрочивало рост опухолевых клеток A2780. Отсрочивание роста опухоли также наблюдалось в случае Герцептина® в монотерапии, но не в случае Эрбитукса® в монотерапии. Кроме того, комбинация кандидата 20 против CD47 с Герцептином® или Эрбитуксом® также отсрочивала рост клеток A2780.

Эти результаты позволяют предположить, что кандидат 20 был способен контролировать рост опухолевых клеток яичников A2780 *in vivo* на мышах NOG с ослабленным иммунитетом при применении в монотерапии, и может демонстрировать кооперативную активность в комбинации с антителом против Her2 (Герцептином®) или антителом против EGFR (Эрбитуксом®).

3. Ксенотрансплантатная модель A549 легких человека.

Кандидата 20 против CD47 также исследовали *in vivo* на ксенотрансплантатной модели аденокарциномы A549 легких человека (Steiner P., Joynes C., Bassi R., Wang S., Tonra J.R., et al. "Tumor Growth Inhibition with Cetuximab and Chemotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer Xenografts Expressing Wild-type

and Mutated Epidermal Growth Factor Receptor", Clin Cancer Res 13(5):1542-51(2007); Kellar A., Egan C., and Morris D. "Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications", BioMed Res Int 2015, ID 621324 (2015)) в монотерапии или в комбинации с антителом против EGFR цетуксимабом (Эрбитукс®) или антителом против Her2 трастузумабом (Герцептин®). Клетки A549 (ATCC-CCL-185) интенсивно экспрессировали CD47 *in vitro*, что было обнаружено посредством связывания кандидата 20, а также EGFR, что было измерено методом окрашивания Эрбитуксом®, и с более слабой интенсивностью экспрессировали Her2, что было обнаружено методом проточной цитометрии с применением Герцептина® (данные не показаны). Мышам NOG (n=4 на группу) трансплантировали клетки A549 (10 млн клеток, инъектированных подкожно). Через десять дней после трансплантации клеток, когда опухоль становилась пальпируемой (объем >30 мм³), начинали терапию антителом (10 мг/кг/доза, интраперитонеальная инъекция, 3 раза в неделю в течение вплоть до 10 недель) - кандидатом 20 против CD47 в монотерапии или в комбинации с Герцептином® или Эрбитуксом®.

Как показано на фиг. 11, кандидат 20 против CD47 в монотерапии, а также Эрбитукс® и Герцептин® были способны отсрочивать рост опухолевых клеток A549, что количественно определяли посредством измерения объема опухоли (фиг. 11A), и были способны в значительной степени обеспечивать защиту мышей по сравнению с группой наполнителя (фиг. 11B). Комбинация кандидата 20 против CD47 с Герцептином® привела к более значительному отсрочиванию роста клеток опухоли A549 (фиг. 11A) и к более значительной защите мышей в анализе выживаемости (фиг. 11B).

Эти результаты позволяют предположить, что кандидат 20 против CD47 при применении в монотерапии или в комбинации с Герцептином® был способен отсрочивать рост аденокарциномы легких A549 *in vivo* на мышах NOG.

V. Гуманизация кандидата 20 против CD47.

1. Гуманизированные кандидаты 20 против CD47.

Кандидат 20 мыши был выбран в качестве первого объекта для гуманизации. Пять вариантов VH и 5 VL получали посредством трансплантации CDR в акцепторные каркасные участки человека. Последовательности анализировали для удаления потенциальных Т-клеточных эпитопов с высокой аффинностью ГКГС класса II с применением алгоритмов *in silico*, а также для определения присутствия посттрансляционных модификаций, таких как гликозилирование и деамидирование Fv. Последовательности аминокислот 5 вариантов VH (VH1-VH5), выровненные с последовательностью VH мыши кандидата 20 (VH0), представлены на фиг. 7. Последовательности аминокислот 5 вариантов VL (VL1-VL5), выровненные с последовательностью VL мыши кандидата 20 (VL0), представлены на фиг. 8.

5 Гуманизированных вариантов VH клонировали в векторе экспрессии, содержащем остов Fcγ4-S228P человека (SEQ ID NO: 162), и 5 гуманизированных вариантов VL клонировали в векторе экспрессии, содержащем остов κ человека (SEQ ID NO: 176), для получения гуманизированных вариантов hIgG4/κ. В Fc-фрагмент всех антител hIgG4 вводили мутацию S228P во избежание потенциальных обменов цепей, которые наблюдались в случае hIgG4 (Angal S., King D.J., Bodmer M.W., Turner A., Lawson A.D., Roberts G., Pedley D., and Adair J.R. "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody", Mol. Immunol. 30(1): 105-8 (1993)). Получали двадцать пять вариантов hIgG4/κ, которые выделяли из клеток CHO, котрансфицированных одним из 5 векторов VH и одним из 5 векторов VL. В результате получали антитела, названные h20-VHx-VLx, где h20 означает гуманизированный кандидат 20, VHx означает вариабельный домен тяжелой цепи с гуманизированным вариантом VH x (от VH1 до VH5), и Lx означает вариабельный домен легкой цепи с гуманизированным вариантом VL x (от VL1 до VL5). Изучали активность связывания и специфичность 25 очищенных антител на клетках лимфомы Раджи человека и клетках CHO, трансфицированных или не трансфицированных hCD47 или mCD47, для определения их функциональной активности в отношении ингибирования связывания hSIRPα на клетках Раджи и способности вызывать агглютинацию кКК человека в анализе агглютинации цельной крови. Также измеряли константы кинетики (Kon и Koff) и аффинности (KD) посредством ПИР на приборе Biacore. Во всех анализах 25 гуманизированных вариантов сравнивали с химерным кандидатом 20 hIgG4, полученным посредством клонирования последовательностей VH0 и VL0 мыши в соответствующие векторы, содержащие Fcγ4-S228P человека и остов κ человека.

Все результаты, полученные в различных анализах, обобщены в табл. 12 и 13 ниже.

Характеристики гуманизированных вариантов кандидата 20

Номер кандидата	Антитело (hIgG4)	Связывание с CD47 (EC50 мкг/мл)	Ингибирование CD47/SIRPα (IC50 мкг/мл)	Фагоцитоз Раджи/ HDMC	Агглютинация кКК (3 донора)
20	Хим. 20	0,150	0,138	++	+/-
20.1	h20-VH1-VL1	0,193	0,161	++	++
20.2	h20-VH1-VL2	0,218	0,216	++	++
20.3	h20-VH1-VL3	0,184	0,228	++	++/+++
20.4	h20-VH1-VL4	0,248	0,261	++	-
20.5	h20-VH1-VL5	0,206	0,111	++	+/++
20.6	h20-VH2-VL1	0,177	0,098	++	+/++
20.7	h20-VH2-VL2	0,156	0,076	НП	+
20.8	h20-VH2-VL3	0,184	0,079	НП	+
20.9	h20-VH2-VL4	0,173	0,123	НП	+
20.10	h20-VH2-VL5	0,191	0,051	НП	-
20.11	h20-VH3-VL1	0,145	0,118	++	+/-
20.12	h20-VH3-VL2	0,153	0,160	НП	+/-
20.13	h20-VH3-VL3	0,147	0,173	НП	+/-
20.14	h20-VH3-VL4	0,143	0,135	НП	+
20.15	h20-VH3-VL5	0,143	0,113	НП	+
20.16	h20-VH4-VL1	0,113	0,100	++	+/-
20.17	h20-VH4-VL2	0,124	0,086	НП	+/-
20.18	h20-VH4-VL3	0,164	0,142	НП	+/-
20.19	h20-VH4-VL4	0,139	0,192	НП	-
20.20	h20-VH4-VL5	0,136	0,095	НП	+/-
20.21	h20-VH5-VL1	0,190	0,169	++	+
20.22	h20-VH5-VL2	0,189	0,174	НП	+/++
20.23	h20-VH5-VL3	0,190	0,169	НП	+/-
20.24	h20-VH5-VL4	0,177	0,133	НП	+/++
20.25	h20-VH5-VL5	0,159	0,112	НП	+/-

НП: не проводили. Для агглютинации кКК: +/-, слабая агглютинация, наблюдавшаяся исключительно при концентрации антитела 50 мкг/мл; +, агглютинация при концентрации антитела 50 мкг/мл; ++, агглютинация при концентрациях $\geq 16,7$ мкг/мл; +++, агглютинация при концентрациях $\geq 5,6$ мкг/мл.

Таблица 13

Кинетические константы и константы аффинности гуманизированных антител против CD47 кандидата 20 на приборе Biotac (средние значения независимых экспериментов)

Номер кандидата	Антитело (hIgG4)	Средняя K_{on} (1/Мс) $\times 10^3$	Средняя K_{off} (1/с) $\times 10^{-4}$	Средняя KD (нМ)
20	Хим. 20	169,33	5,05	3,22
20.1	h20-H1-L1	118,40	6,34	5,85
20.2	h20-H1-L2	119,50	6,91	6,45
20.3	h20-H1-L3	136,50	11,05	7,82
20.4	h20-H1-L4	130,95	8,39	7,33
20.5	h20-H1-L5	126,30	7,72	7,58
20.6	h20-H2-L1	197,50	5,95	3,53
20.7	h20-H2-L2	193,00	6,27	3,67
20.8	h20-H2-L3	189,00	6,60	3,77
20.9	h20-H2-L4	189,00	6,28	3,65
20.10	h20-H2-L5	219,00	6,32	3,34
20.11	h20-H3-L1	222,00	5,61	2,79
20.12	h20-H3-L2	246,00	5,60	2,49
20.13	h20-H3-L3	213,50	5,94	3,05
20.14	h20-H3-L4	216,50	5,81	3,02
20.15	h20-H3-L5	242,00	5,28	2,36
20.16	h20-H4-L1	175,00	6,19	3,86
20.17	h20-H4-L2	167,50	6,34	4,18
20.18	h20-H4-L3	180,00	7,33	4,37
20.19	h20-H4-L4	179,00	6,85	4,15
20.20	h20-H4-L5	192,00	6,24	3,5
20.21	h20-H5-L1	115,90	9,79	9,2
20.22	h20-H5-L2	142,00	11,65	8,55
20.23	h20-H5-L3	104,20	8,41	9,93
20.24	h20-H5-L4	103,25	10,21	10,99
20.25	h20-H5-L5	126,40	10,86	9,69

Все гуманизированные варианты с последовательностями VH1 и VH5 характеризовались меньшей аффинностью (более высокой KD), чем другие варианты, и меньшей аффинностью, чем таковая химерного кандидата 20. Другие варианты продемонстрировали константы K_{on} , K_{off} и KD, аналогичные таковым химерного кандидата 20. Ни один из вариантов не продемонстрировал значительного увеличения аффинности в отношении hCD47 по сравнению с химерным кандидатом 20. Значения K_{off} всех гуманизированных вариантов, как было установлено, находилось в диапазоне от $5,3 \times 10^{-4}$ до $11,7 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$.

Все 25 вариантов в значительной степени связывались с CD47, экспрессируемым на клетках Раджи, с EC_{50} , аналогичной EC_{50} химерного кандидата 20. Эти варианты также специфично распознавали hCD47, но не mCD47, экспрессируемый на клетках CHO, аналогично химерному кандидату 20 (данные не показаны).

Все 25 вариантов существенно ингибировали связывание hSIRP α с CD47, экспрессируемым на клетках Раджи, с IC_{50} в том же диапазоне, что и IC_{50} химерного кандидата 20. Варианты с последовательностью VH2 характеризовались меньшей IC_{50} , чем другие варианты, а также химерный кандидат 20.

Все исследованные варианты hIgG4 были способны усиливать фагоцитоз клеток Раджи макрофагами человека аналогично химерному кандидату 20 hIgG4.

Некоторые варианты семейства VH1 (h20-VH1-VL1, h20-VH1-VL2, h20-VH1-VL3, h20-VH1-VL5), вариант h20-VH2-VL1 и варианты h20-VH5-VL2 и h20-VH5-VL4 демонстрировали тенденцию вызывать большую агрегацию кКК, чем другие варианты, а также чем химерный кандидат 20.

2. Оптимизация гуманизированных антител и выбор объекта.

Анализ потенциальных Т-клеточных эпитопов в пределах последовательностей VH и VL гуманизированных вариантов позволил обнаружить присутствие высокоаффинного CD4+ Т-клеточного эпитопа (LIYFASTKESGV) в пределах домена CDR2 5 вариантов VL (от VL1 до VL5). Данный потенциальный Т-клеточный эпитоп, также присутствующий в пределах последовательности CDR2 VL0 мыши, не удаляли в 5 первых гуманизированных вариантах VL во избежание какой-либо утраты аффинности и/или активности первых гуманизированных кандидатов. Однако одной точечной мутации с F на Y в положении 56 (F56Y) последовательности VL (нумерация аминокислот без сигнального пептида) было достаточно для

устранения иммуногенности данного потенциального Т-клеточного эпитопа (с LIYFASTKESGV на LIY-YASTKESGV). Вследствие этого в гуманизированные последовательности VL1-VL5 вводили мутацию F56Y. Эти новые последовательности обозначали как VL1-F56Y - VL5-F56Y, и соответствующие гуманизированные антитела, полученные посредством сочетания одного из вариантов VH1-VH5 с одним из вариантов VL1-F56Y - VL5-F56Y, обозначали как h20-Hx-LxY. Пять гуманизированных вариантов (кандидаты 20.26 (h20-H2-L5Y), 20.27 (h20-H3-L2Y), 20.28 (h20-H3-L3Y), 20.29 (h20-H4-L4Y), 20.30 (h20-H4-L5Y)) выбирали и получали в формате IgG4 человека, содержащем мутацию S228P (SEQ ID NO: 162), которая, как известно, стабилизирует белок hIgG4 (Angal S. et al. Mol. Immunol., 1993). Затем очищенные антитела характеризовали *in vitro* в отношении их активности связывания с hCD47 на клетках Раджи в отношении их активности по ингибированию взаимодействия hCD47/hSIRPα на клетках Раджи и в отношении их активности по агглютинации кКК человека с применением цельной крови. 5 Гуманизированных вариантов Hx-LxY также сравнивали с химерным кандидатом 20, полученным в формате hIgG4-S228P, а также с гуманизированными антителами AB06.12 и Hu5F9, клонированными в hIgG4-S228P.

Как показано на фиг. 12 и 13, пять вариантов с мутацией F56Y связывались с клетками Раджи (фиг. 12) и ингибировали связывание hSIRPα с клетками Раджи (фиг. 13) с эффективностью, аналогичной эффективности их немутантных копий, и являлись аналогичными химерному кандидату 20. Пять гуманизированных вариантов с мутацией F56Y в анализе цельной крови характеризовались незначительно более высокой активностью агглютинации кКК, чем химерный кандидат 20, но все еще меньшей по сравнению с референсным антителом Hu5F9 (табл. 14).

Наконец, было установлено, что пять гуманизированных вариантов кандидата 20 с мутацией F56Y демонстрировали существенное распознавание hCD47 на клетках Раджи и существенное ингибирование связывания hSIRPα с hCD47 на клетках Раджи, аналогичное антителам AB06.12 и Hu5F9 (фиг. 14). Результаты, полученные в различных анализах, обобщены ниже в табл. 14.

Таблица 14

Характеристики гуманизированных вариантов h20-Hx-LxY кандидата 20
(репрезентативные для 2 независимых экспериментов)

Антитело (hIgG4-S228P)	Связывание с CD47 (EC50, нг/мл)	Ингибирование CD47/SIRPα (IC50, нг/мл)	Агглютинация кКК (4 донора)
h20-H2-L5Y, кандидат 20.26	97,5	112,6	++ ; + ; ++ ; +
h20-H3-L2Y, кандидат 20.27	85,4	101,1	+ ; + ; ++ ; +/-
h20-H3-L3Y, кандидат 20.28	116,7	169,9	+ ; + ; ++ ; +
h20-H4-L4Y, кандидат 20.29	146,6	180,7	+ ; + ; ++ ; +/-
h20-H4-L5Y, кандидат 20.30	105,1	149,5	++ ; + ; ++ ; ++
Химерный кандидат 20	75,1	110,2	+ ; +/- ; + ; +/-
Hu5F9	80,0	122,8	+++ ; + ; +++ ; +++
AB06.12	83,1	97,2	+ ; +/- ; +/- ; -

+/-, слабая агглютинация, наблюдавшаяся исключительно при концентрации антитела 50 мкг/мл; +, агглютинация при концентрации антитела 50 мкг/мл; ++, агглютинация при концентрациях $\geq 16,7$ мкг/мл; +++, агглютинация при концентрациях $\geq 5,6$ мкг/мл.

Кинетические константы (K_{on} и K_{off}) и константы аффинности (KD) 5 новых гуманизированных вариантов h20-Hx-LxY определяли методом ППП на приборе Biacore. Результаты табл. 15 демонстрируют, что 5 гуманизированных вариантов с мутацией VL CDR2-F56Y сохранили аффинность от 2,0 до 2,8 нМ, аналогичную аффинности кандидата 20, и являлись аналогичными соответствующим гуманизированным вариантам без мутации VL CDR2-F56Y (табл. 15).

Таблица 15

Кинетические константы и константы аффинности гуманизированных вариантов против CD47 кандидата 20 с мутацией VL CDR2-F56Y, измеренные на приборе Biacore (средние значения 2 независимых экспериментов)

Антитело (формат hIgG4)	Средняя K_{on} (1/Мс) $\times 10^3$	Средняя K_{off} (1/с) $\times 10^{-4}$	Средняя KD (нМ)	Средняя R_{max} (ЕО)
h20-H2-L5Y, кандидат 20.26	306,5	6,99	2,32	124,8
h20-H3-L2Y, кандидат 20.27	292,0	5,84	2,06	106,6
h20-H3-L3Y, кандидат 20.28	264,0	5,73	2,32	119,9
h20-H4-L4Y, кандидат 20.29	305,5	7,61	2,61	102,4
h20-H4-L5Y, кандидат 20.30	254,5	6,93	2,82	111,6
Химерный кандидат 20	225,0	5,43	2,48	144,6
Hu5F9-G4P	101,4	0,75	0,73	85,5

5 Гуманизированных вариантов с мутацией VL CDR2-F56Y также сохранили быструю кинетику диссоциации со значением K_{off} в диапазоне от $5,73 \times 10^{-4}$ до $7,61 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, что наблюдали для антитела мыши и кандидата 20 (табл. 13 и 15).

3. Гуманизация кандидата 22 против CD47.

Кандидата 22 мыши также выбрали для гуманизации. Четыре варианта VH и 4 VL получали посредством трансплантации CDR в акцепторные каркасные участки человека, по существу, как описано для кандидата 20 мыши. Последовательности анализировали для удаления потенциальных Т-клеточных эпитопов с высокой аффинностью ГКГС класса II с применением алгоритмов *in silico*, а также для определения присутствия посттрансляционных модификаций, таких как гликозилирование и деамидирование Fv.

2 Гуманизированных варианта VH h22-VH3 и h22-VH4 клонировали в векторе экспрессии, содержащем остов Fcγ4-S228P человека (SEQ ID NO: 162), и 4 гуманизированных варианта h22-VL клонировали в векторе экспрессии, содержащем остов κ человека (SEQ ID NO: 176), для получения гуманизированных вариантов hIgG4/κ. Восемь вариантов hIgG4/κ получали и очищали из клеток CHO, котрансфицированных одним из векторов h22-VH3 или h22-VH4 и одним из 4 h22-VL. Полученные в результате антитела обозначали h22-VHx-VLx, где h22 означает гуманизированный кандидат 22, VHx означает вариабельный домен тяжелой цепи с гуманизированным вариантом VH x (VH3-VH4), и Lx означает вариабельный домен легкой цепи с гуманизированным вариантом VL x (VL1-VL4). Кинетические константы (K_{on} и K_{off}) и константы аффинности (KD) 8 очищенных антител измеряли методом ППР на приборе Biacore. 8 Очищенных антител также исследовали в отношении активности и специфичности связывания на клетках лимфомы Раджи человека, в отношении функциональной активности по ингибированию связывания hSIRPα на клетках Раджи и в отношении способности вызывать агглютинацию кКК человека в цельной крови. Во всех анализах 8 гуманизированных вариантов сравнивали с химерным кандидатом hIgG4 22, полученным в результате клонирования последовательностей VH и VL мыши кандидата 22 в соответствующие векторы, содержащие Fcγ4-S228P человека и остов κ человека. Для агглютинации кКК 8 гуманизированных вариантов также сравнивали с антителом Hu5F9.

Все результаты, полученные в различных анализах, обобщены ниже в табл. 16 и 17.

Таблица 16

Характеристики гуманизированных вариантов кандидата 22

Номер кандидата	Антитело (hIgG4)	Связывание с CD47 (EC ₅₀ мкг/мл)	Ингибирование CD47/SIRP α (IC ₅₀ мкг/мл)	Агглютинация кКК (2 донора)
22	Хим. 22	0,122	0,140	++
22.9	h22-VH3-VL1	0,101	0,075	+++
22.10	h22-VH3-VL2	0,141	0,109	+++
22.11	h22-VH3-VL3	0,139	0,096	+++ /++++
22.12	h22-VH3-VL4	0,108	0,116	++++
22.13	h22-VH4-VL1	0,070	0,119	+++
22.14	h22-VH4-VL2	0,099	0,093	+++
22.15	h22-VH4-VL3	0,124	0,098	+++
22.16	h22-VH4-VL4	0,184	0,116	++++
-	Hu5F9	НИ	НИ	++ /+++

НИ; не исследовали; +/-, слабая агглютинация, наблюдавшаяся исключительно при концентрации антитела 50 мкг/мл; +, агглютинация при концентрации антитела 50 мкг/мл; ++, агглютинация при концентрациях >16,7 мкг/мл; +++, агглютинация при концентрациях $\geq 5,6$ мкг/мл; +++++, агглютинация при концентрациях $\geq 1,9$ мкг/мл.

Таблица 17

Кинетические константы и константы аффинности гуманизированных антител против CD47 кандидата 22 на приборе Biacore (средние значения 2 независимых экспериментов)

Номер кандидата	Антитело (hIgG4)	Средняя Kon (1/Mc) $\times 10^3$	Средняя Koff (1/c) $\times 10^{-4}$	Средняя KD (нМ)
22	Хим. 22	31,15	3,81	12,20
22.9	h22-VH3-VL1	24,65	3,18	12,95
22.10	h22-VH3-VL2	28,75	3,15	11,05
22.11	h22-VH3-VL3	28,35	3,06	10,91
22.12	h22-VH3-VL4	25,25	2,52	10,00
22.13	h22-VH4-VL1	25,60	3,37	13,20
22.14	h22-VH4-VL2	31,25	3,25	10,44
22.15	h22-VH4-VL3	29,10	3,51	12,10
22.16	h22-VH4-VL4	28,15	2,63	9,37

Все 8 гуманизированных вариантов с последовательностями h22-VH3 или h22-VH4, объединенными с последовательностями h22-VL1 - h22-VL4, продемонстрировали константы Kon, Koff и KD, аналогичные таковым химерного кандидата 22. Ни один из вариантов не продемонстрировал значительного увеличения аффинности в отношении hCD47 по сравнению с химерным кандидатом 22. Значения Koff всех гуманизированных вариантов кандидата 22, как было установлено, находились в диапазоне от $2,5 \times 10^{-4}$ до $3,8 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$.

Все 8 вариантов существенно связывались с CD47, экспрессированным на клетках Раджи, с EC₅₀, аналогичной EC₅₀ химерного кандидата 22.

Все 8 вариантов существенно ингибировали связывание hSIRP α с CD47, экспрессированным на клетках Раджи, с IC₅₀ в том же диапазоне, что и IC₅₀ химерного кандидата 22.

Все 8 вариантов демонстрировали тенденцию вызывать незначительно большую агглютинацию кКК, чем химерный кандидат 22. 5 из вариантов характеризовались аналогичным свойством агглютинации кКК, как и референсное антитело Hu5F9.

VI. Картирование эпитопа, димеризация и гликозилирование.

1. Картирование эпитопа.

Эпитоп, распознаваемый на антигене hCD47 кандидатами 20 и 22 мыши против CD47, определяли с применением способа с высоким разрешением, разработанного CovalX (Bich C., Scott M., Panagiotidis A., Wenzel R.J., Nazabal A., Zenobi R. "Characterization of antibody-antigen interactions: Comparison between surface plasmon resonance measurements and high-mass matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry", Analytical Biochem 375:35-45, (2008)). Получали комплексы антител против CD47 с растворимым препаратом внеклеточного домена CD47 человека, меченного 6His-меткой (SEQ ID NO: 160).

Затем комплексы антитела против CD47/hCD47 инкубировали с дейтерированными поперечно-

сшивающими линкерами и подвергали мультимерментному расщеплению. После обогащения поперечно-сшитых пептидов образцы анализировали методом масс-спектрометрии с высоким разрешением (nLC-Orbitrap MS), и полученные данные анализировали с применением программного обеспечения XQuest и Stavroх. Анализ MALDI ToF MS проводили с применением модуля взаимодействия CovalX NM4 со стандартным азотным лазером и фокусированием на различные диапазоны масс от 0 до 1500 кДа.

Как представлено на фиг. 15, химический поперечно-сшивающий анализ продемонстрировал, что эпитоп на hCD47, который распознавался химерным кандидатом 20, являлся непрерывным и содержал остатки аминокислот K59, R63, Y66, T67, H108, T109, T117 и T120 (SEQ ID NO: 151) или остатки аминокислот xxK₅₉xxxR₆₃xxY₆₆T₆₇xx.....xxH₁₀₈T₁₀₉xxxxxxxT₁₁₇xxT₁₂₀xx hCD47 (SEQ ID NO: 151), где "x" означает любой остаток аминокислоты (нумерация согласно SEQ ID NO: 151).

Аналогичный анализ продемонстрировал, что эпитоп на hCD47, который распознавался химерным кандидатом 22 (фиг. 16), являлся также непрерывным и содержал K59, K61, S107, H108, T117, T120 и R121 hCD47 (SEQ ID NO: 151) или остатки аминокислот xxK₅₉xxK₆₁xxxxxx.....xxxxxxxS₁₀₇H₁₀₈xxxxxxxT₁₁₇xxT₁₂₀R₁₂₁xx hCD47 (SEQ ID NO: 151), где "x" означает любой остаток аминокислоты (нумерация согласно SEQ ID NO: 151).

С применением того же способа эпитоп на hCD47, распознаваемый AB06.12, также был определен и, как было установлено, являлся отличным от эпитопа кандидата 20 или 22 (данные не показаны).

2. Димеризация CD47.

Анализ растворимого препарата hCD47 (внеклеточный домен IgV) методом High Mass MALDI ToF (время-пролётная ионизация лазерной десорбцией с использованием матрицы для высоких масс) и методом эксклюзионной ВЭЖХ продемонстрировал присутствие мономера, димера и мультимеров hCD47, образованных природным путем *in vitro*. Для дополнительного исследования способности кандидатов 20 и 22 распознавать димер hCD47 смесь антитела против CD47/растворимого hCD47 подвергали поперечному сшиванию с применением набора для анализа CovalX K200 MALDI MS при избытке антигена. Данные позволяют предположить, что кандидат 20 может связываться как с димером (60,8%), так и с мономером hCD47 (39,2%), хотя нельзя исключить, что обнаруживают комплексы одного антитела с 2 мономерами (табл. 18). Аналогично, кандидат 22 мог образовать поперечную сшивку с димером hCD47 (3,8%) и мономером (5%) (табл. 18). Следующие эксперименты подтвердили, что кандидаты 20 и 22 оба связывались с мономером CD47 человека и димером CD47 человека, которые были очищены методом эксклюзионной ВЭЖХ (см. фиг. 18 и 19). Анализ растворимого hCD47 методом эксклюзионной ВЭЖХ продемонстрировал гетерогенность препарата белка с присутствием предполагаемых мономеров и димеров CD47 (фиг. 17). Затем фракции мономера и димера очищали методом полупрепаративной эксклюзионной ВЭЖХ с применением Superdex 200 Increase 10/300 GL от GE Healthcare. Анализ методом ДСН-ПААГ в нередуцирующих условиях также продемонстрировал чистоту 2 фракций с большой полосой при ~30 кДа, наблюдавшейся для фракции мономера CD47, соответствующей ожидаемым размерам гликозилированного hCD47, и основной полосой незначительно выше 50 кДа, наблюдавшейся для фракции димера CD47 (фиг. 18). Затем планшеты для ELISA сенсibilizировали очищенными фракциями мономера и димера CD47 и изучали способность антител против CD47 распознавать 2 фракции. Как показано на фиг. 19, кандидаты 20 и 22 были способны связываться как с мономером, так и с димером hCD47 с аналогичной эффективностью.

Таблица 18

Анализ растворимого hCD47 в смеси с кандидатом 20, кандидатом 22 и после перекрестного связывания между растворимым hCD47 и кандидатом 20 и кандидатом 22

Молекулы	ММ (молекулярная масса, кДа)	% площади
Кандидат 20	149,981	0
Кандидат 20 и один hCD47	176,412	39,2
Кандидат 20 и два hCD47	202,491	60,8
Кандидат 22	150,150	91,2
Кандидат 22 и один hCD47	176,750	5,0
Кандидат 22 и два hCD47	201,135	3,8

3. Распознавание дегликозилированного hCD47.

В течение уже более 40 лет известно (см. Meezan E., Wu H.C, Black P.H., Robbins P.W. "Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. II Separation of glycoproteins and glycopeptides by Saphadex chromatography", Biochemistry 8 (6):2518-24 (1969)), что в опухолевых клетках механизмы гликозилирования могут модифицироваться,

что приводит к экспрессии белков с измененными паттернами гликозилирования (более недавние обзоры см. также в публикации Pinho S.S. and Reis C.A. "Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications", *Nat. Rev. Cancer* 15: 540-55 (2015)). CD47 является в высокой степени гликозилированным транс-мембранным белком с 6 сайтами N-гликозилирования в положениях N23, N34, N50, N73, N111, N206 (Lindberg F.P., Gresham H.D., Schwarz E., and Brown E.J. "Molecular cloning of integrin-associated protein: An immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in $\alpha_v\beta_3$ -dependent ligand binding", *J. Cell. Biol.* 123: 485-96 (1993)).

Поскольку паттерн гликозилирования CD47 в опухолевых клетках подвергается модификации, ключевым аспектом для оценки являлось то, зависит ли связывание терапевтических антител с мишенью от уровня гликозилирования CD47. Для решения данной проблемы растворимый hCD47 обрабатывали ПНГазой для удаления N-гликозилирований (Maley F., Trimble R.B., Tarentino A.L., and Plummer T.H. "Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases", *Anal. Biochem* 180:195-204 (1989)), затем кандидаты 20 или 22 поперечно сшивали с применением DSS и K200 в течение 180 мин при комнатной температуре для получения поперечно-сшитых комплексов антитела против CD47/дегликозилированного hCD47. Эти комплексы применяли для изучения природы данных нековалентных взаимодействий согласно способу, описанному в публикации CovalX (Bich C., Scott M., Panagiotidis A., Wenzel R.J., Nazabal A., Zenobi R. "Characterization of antibody-antigen interactions: Comparison between surface plasmon resonance measurements and hih-mass matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry", *Analytical Biochem* 375:35-45 (2008)). После изучения некомплексированных и комплексированных молекул методом MALDI-ToF авторы настоящего изобретения успешно идентифицировали пики, соответствующие растворимым антителам, добавленным в избытке (148,944 кДа для кандидата 20 и 149,173 кДа для 22), а также комплексам антитело-CD47 (174,407 кДа и 163,440 кДа соответственно), но идентифицировать пик, соответствующий некомплексированному дегликозилированному CD47 (15,901 кДа; см. табл. 19), не удалось. Полученные данные позволяют предположить, что весь доступный дегликозилированный hCD47 был комплексирован с кандидатом 20 или с кандидатом 22, что поддерживает идею о том, что антитела 20 и 22 способны распознавать как гликозилированный, так и N-дегликозилированный hCD47.

Таблица 19

Анализы растворимого дегликозилированного hCD47, поперечно-сшитого с кандидатом 20 или кандидатом 22, методом масс-спектрометрии

Молекула	ММ (кДа)	% площади
Кандидат 20	148,944	84,8
Кандидат 20 и мономерный дегликозилированный hCD47	174,407	15,2
Мономерный дегликозилированный hCD47	15,901	0
Кандидат 22	149,173	92,8
Кандидат 22 и мономерный hCD47	163,440	7,2
Мономерный дегликозилированный hCD47	15,901	0

Для подтверждения и количественного определения распознавания дегликозилированного hCD47 кандидатами 20 и 22, которое наблюдали с применением подхода CovalX, антитела изучали методом ELISA на сенсibilизированных препаратах hCD47 и дегликозилированного hCD47. Успешное удаление N-гликанов от hCD47 подтверждали анализом методом эксклюзионной хроматографии (не показан). Кандидатов 20 и 22 против CD47 исследовали в химерном формате hu-IgG4 параллельно с гуманизированным вариантом h20-H2L5Y также изотипа hu-IgG4. Антитела изучали наравне с гуманизированными антителами AB06.12 и Hu5F9, полученными в формате hu-IgG4, для обеспечения такой же эффективности распознавания методом ELISA. Как показано на фиг. 22A и в табл. 20, 21 и 22, несмотря на то, что Hu5F9 и AB06.12 демонстрировали связывание незначительно меньше максимального, все антитела существенно связывались с аналогичными профилями и значениями EC_{50} , EC_{95} , равновесной константы связывания и максимального специфичного связывания (B_{max}) с гликозилированным CD47 (B_{max_1}). Напротив, связывание Hu5F9 и AB06.12 с N-дегликозилированным CD47 было резко снижено по сравнению со связыванием, наблюдаемым для химерных кандидатов 20, 22 и для гуманизированного варианта h20-H2L5Y (фиг. 22B, табл. 20, 21 и 22). Действительно, химерные кандидаты 20, 22 и гуманизированное антитело h20-H2L5Y связывались с дегликозилированным CD47 со значением EC_{50} , которое менее чем в 3,0 раза превышало значение EC_{50} в отношении гликозилированного CD47, и/или со значением EC_{95} , ко-

торое менее чем в 10,0 раз превышало значение EC_{95} , измеренное в отношении гликозилированного CD47. Напротив, значения EC_{50} и EC_{95} AB06.12 и Hu5F9 более чем в 3,0 и 10,0 раз превосходили значения EC_{50} и EC_{95} , измеренные в отношении гликозилированного CD47, соответственно (табл. 20). Кроме того, значения равновесной константы связывания химерных кандидатов 20, 22 и гуманизированного антитела h20-H2L5Y составляли ≤ 60 пМ в отношении как гликозилированного, так и N-дегликозилированного CD47, тогда как значения равновесной константы связывания AB06.12 и Hu5F9 находились в диапазоне 90-130 пМ в отношении N-дегликозилированного CD47 (табл. 21). Наконец, химерные кандидаты 20, 22 и гуманизированное антитело h20-H2L5Y связывались как с гликозилированным, так и с N-дегликозилированным CD47 со значением максимального специфичного связывания (B_{max}) $\geq 1,9$ ОП с гликозилированным (B_{max_1}) и с дегликозилированным (B_{max_2}) CD47, тогда как значения B_{max_2} AB06.12 и Hu5F9 в отношении N-дегликозилированного CD47 составляли $< 1,5$ ОП (табл. 22).

Эти результаты также демонстрируют, что распознавание hCD47 кандидатами 20, 22 и гуманизированным антителом h20-H2L5Y не зависит от уровня N-гликозилирования CD47. И наоборот, антитела Hu5F9 и AB06.12 в значительной степени утрачивали свою способность связывания с N-дегликозилированным CD47. Поскольку на опухолевых клетках уровень гликозилирования и природа белков поверхности клетки могут быть модифицированы, возможно, что гликозилирование антигена CD47 при экспрессии или сверхэкспрессии опухолевыми клетками может также модифицироваться. Следует отметить, что паттерн гликозилирования CD47, как представляется, не является необходимым для взаимодействия CD47 с SIRP α (Subramanian S., Boder E.T., and Discher D.E. "Phylogenetic divergence of CD47 interactions with human signal regulatory protein α reveals locus of species specificity". J. Biol. Chem. 282(3): 1805-18 (2007)); это позволяет предположить, что неправильное гликозилирование не изменяет взаимодействие CD47/SIRP α . Вследствие этого раковые клетки, сверхэкспрессирующие CD47, обеспечивают себе защиту от фагоцитоза независимо от паттерна гликозилирования. И наоборот, паттерн N-гликозилирования hCD47 может влиять на связывание антитела и в значительной степени снижать терапевтическую эффективность. Как следствие, авторы настоящего изобретения ожидают более широкий противоопухолевый эффект от применения терапевтических антител против CD47, таких как 20, 22 и предпочтительно h20-H2L5Y, связывание которых с hCD47 не зависит от уровня его гликозилирования.

Таблица 20

Характеристики связывания химерных кандидатов 20 и 22 против CD47, гуманизированного антитела h20-H2L5Y и референсных антител с гликозилированным hCD47 по сравнению с N-дегликозилированным hCD47, измеренные методом ELISA
Значения EC_{50} и EC_{95} рассчитывали с применением нелинейной регрессии/log(антитела) по сравнению с моделью откликов (четырёхпараметровой) программного обеспечения GraphPad Prism

Антитело (hu-IgG4)	Связывание с гликозилированным hCD47-His методом ELISA		Связывание с N- дегликозилированным hCD47-His методом ELISA		Соотношение ЕС дегликозилированного / ЕС гликозилированного	
	EC_{50} (нМ)	EC_{95} (нМ)	EC_{50} (нМ)	EC_{95} (нМ)	Соотноше ние EC_{50}	Соотноше ние EC_{95}
Химерный кандидат 20	28,0	667,0	47,4	3335,0	1,7	5,0
h20-H2L5Y	44,0	1334,0	96,0	11339,0	2,2	8,5
Химерный кандидат 22	38,7	4669,0	42,0	6670,0	1,1	1,4
AB06.12	75,4	2054,4	427,5	214782,0	5,7	107,4
Hu5F9	54,7	1961,0	253,5	54027,0	4,6	27,6

Таблица 21

Равновесная константа связывания химерных кандидатов 20 и 22 против CD47, гуманизированного антитела h20-H2L5Y и референсных антител с гликозилированным hCD47 по сравнению с N-дегликозилированным hCD47, измеренная методом ELISA

Значения равновесной константы связывания рассчитывали с применением модели насыщения связывания/односайтового связывания программного обеспечения GraphPad Prism (среднее значение $\pm$ СО трех повторов)

Антитело (hu-IgG4)	Равновесная константа связывания с гликозилированным hCD47 (пМ)		Равновесная константа связывания с дегликозилированным hCD47 (пМ)	
	Среднее	СО	Среднее	СО
Химерный кандидат 20	27,3	3,3	38,8	4,6
h20-H2L5Y	43,6	7,2	55,7	10,5
Химерный кандидат 22	34,4	6,7	31,8	5,9
AB06.12	67,0	6,8	93,6	28,6
Hu5F9	49,0	4,9	129,0	43,2

Таблица 22

Максимальное специфичное связывание (B_{max}) химерных кандидатов 20 и 22 против CD47, гуманизированного антитела h20-H2L5Y и референсных антител с гликозилированным hCD47 (B_{max_1}) по сравнению с N-дегликозилированным (B_{max_2}) hCD47, измеренное методом ELISA. Значения B_{max} рассчитывали с применением модели насыщения связывания/односайтового связывания программного обеспечения GraphPad Prism (среднее значение $\pm$ СО трех повторов)

Антитело (hu-IgG4)	B_{max_1} с гликозилированным hCD47 (значение ОП)		B_{max_2} с дегликозилированным hCD47 (значение ОП)	
	Среднее	СО	Среднее	СО
Химерный кандидат 20	2,90	0,07	2,20	0,05
h20-H2L5Y	2,85	0,09	1,97	0,07
Химерный кандидат 22	2,85	0,11	2,57	0,09
AB06.12	2,48	0,05	0,97	0,06
Hu5F9	2,66	0,05	1,40	0,10

VII. Эффективность гуманизированного антитела против CD47 h20-H2L5Y in vivo.

Гуманизированный вариант h20-H2L5Y оценивали в формате hu-IgG4 (h20-H2L5Y-G4) в монотерапии и в комбинации с антителом против Her2 трастузумабом (Герцептин®) на ранее описанной ксенотрансплантатной модели аденокарциномы легких A549. Мышам NOG (n=8 на группу) трансплантировали клетки A549 (10 млн клеток, инъектированных подкожно). Терапию антителом начинали через четырнадцать дней после трансплантации клеток, когда объем опухоли составлял приблизительно 100 мм³. Антитело против CD47 h20-H2L5Y и Герцептин® инъектировали в монотерапии или в комбинации в дозе 10 мг/кг/доза посредством интраперитонеальной инъекции 3 раза в неделю в течение вплоть до 10 недель. Как показано на фиг. 23, комбинация антитела против CD47 h20-H2L5Y-G4 с Герцептином® в значительной степени увеличивала выживаемость получавших лечение мышей по сравнению с контрольной группой животных, которым инъектировали наполнитель (p<0,005), и по сравнению с группой животных, получавшей лечение Герцептином® в монотерапии (p<0,05). Таким образом, эти результаты демонстрируют увеличение эффективности комбинации гуманизированного антитела против CD47 h20-H2L5Y с Герцептином® для контроля роста аденокарциномы легких A549 на мышах NOG in vivo, и подтверждаются результаты, полученные ранее с кандидатом 20 мыши против CD47.

Гуманизированное антитело h20-H2L5Y также оценивали на ксенотрансплантатной модели Her2-положительного рака желудка на мышах в монотерапии и в комбинации с антителом против Her2 трастузумабом (Герцептин®), одобренным для лечения Her2-сверхэкспрессирующих метастатических типов рака желудка. Для данного исследования в качестве ксенотрансплантата для Her2-положительной

опухоли желудка, отвечающей на лечение Герцептином®, была выбрана линия клеток NCI-N87 человека (ATCC®-CRL-5822) (Matsui Y., Inomata M., Tojigamori M., Sonoda K., Shiraishi N., Kitano S. "Suppression of tumor growth in human gastric cancer with HER2 overexpression by an anti-HER2 antibody in a murine model", *Int. J. Oncol.* 27(3):681-5 (2005)). In vitro эти клетки весьма существенно экспрессировали Her2, что было обнаружено посредством связывания Герцептина®, и существенно экспрессировали CD47, что было измерено методом окрашивания антителом h20-H2L5Y и в анализе методом проточной цитометрии (данные не показаны). Исследования проводили на мышах NOG, и гуманизированное антитело h20-H2L5Y исследовали в формате hu-IgG4-S228P-L235E (h20-H2L5Y-G4PE). С данной целью гуманизированное антитело h20-H2L5Y затем получали в формате hu-IgG4, несущем мутации S228P и L235E, после клонирования варианта h20-VH2 в векторе экспрессии, содержащем остов Fcγ4-S228P-L235E человека (SEQ ID NO: 164). Было показано, что мутация L235E резко снижает аффинность hu-IgG4 в отношении рецепторов Fcγ (FcγR) и вследствие этого отменяет эффекторные функции Fc, такие как АЗКЦ или АЗКФ (антителозависимый клеточный фагоцитоз, Alegre M.L., Collins A.M., Pulito V.L., Brosius R.A., Olson W.C., et al. "Effect of a single amino acid mutation on the activating and immunosuppressive properties of a "humanized" OKT3 monoclonal antibody", *J. Immunol.* 148(11): 3461-68 (1992); Reddy M.P., Kinney CAS., Chaikin M.A., Fishman-Lobell J., Tsui P., et al. "Elimination of Fc Receptor-Dependent Effector Functions of a Modified IgG4 Monoclonal Antibody to Human CD4", *J. Immunol.* 164:1925-33 (2000)). Вследствие этого мутация L235E снизит риск побочных эффектов, таких как фагоцитоз или лизис опсонизированных нормальных клеток (таких как кКК, тромбоциты и т.д.). Мышам NOG (n=8 на группу) трансплантировали клетки NCI-N87 (10 млн клеток, инъецированных подкожно), и терапию антителом начинали через семь дней после трансплантации клеток, когда объем опухоли составлял приблизительно 100 мм³. Антитело против CD47 h20-H2L5Y-G4PE инъецировали в монотерапии или в комбинации в дозе 10 мг/кг/доза, тогда как Герцептин® инъецировали в монотерапии или в комбинации в дозе 2,5 мг/кг/доза. Антитела вводили посредством интраперитонеальной инъекции 3 раза в неделю в течение вплоть до 5 недель. Как показано на фиг. 24, отсрочивание роста NCI-N87 наблюдалось в группе мышей, получавшей лечение антителом против CD47 h20-H2L5Y-G4PE в монотерапии, и более заметное отсрочивание роста NCI-N87 наблюдалось у мышей, получавших лечение комбинацией Герцептина® с антителом против CD47 h20-H2L5Y-G4PE (фиг. 24). Аналогичные результаты были получены, когда исследование проводили на мышах NOD/SCID (данные не показаны). Данное снижение роста опухоли NCI-N87 в группе мышей, получавших лечение комбинацией Герцептина® и антитела против CD47 h20-H2L5Y-G4PE, являлось статистически большим по сравнению с группой мышей, получавшей лечение Герцептином® в монотерапии ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента), таким образом, демонстрируя кооперативный эффект между антителом против CD47 h20-H2L5Y и Герцептином® в отношении контроля пролиферации опухолевых клеток NCI-N87 in vivo и, вероятно, других Her2-положительных опухолей желудка.

Дополнительные аспекты.

1. Антитело, выбранное из группы антител, состоящей из

(а) группы 1 антител, которые содержат тяжелую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 1-3 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 4-6 (номенклатура IMGT), и легкую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 7-9 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 10-12 (номенклатура IMGT); или

(b) группы 2 антител, которые содержат тяжелую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 13-15 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 16-18 (номенклатура IMGT), и легкую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 19-21 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 22-24 (номенклатура IMGT); или

(c) группы 3 антител, которые содержат тяжелую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 25-27 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 28-30 (номенклатура IMGT), и легкую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 31-33 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 34-36 (номенклатура IMGT); или

(d) группы 4 антител, которые содержат тяжелую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 37-39 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 40-42 (номенклатура IMGT), и легкую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 43-45 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 46-48 (номенклатура IMGT); или

(e) группы 5 антител, которые содержат тяжелую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 49-51 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 52-54 (номенклатура IMGT), и легкую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 55-57 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 58-60 (номенклатура IMGT); или

(f) группы 6 антител, которые содержат тяжелую цепь, содержащую каждую из последовательно-

SEQ ID NO: 132; или

(g) группы 7 антител, которые содержат VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 133, и/или VL, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 134; или

(h) группы 8 антител, которые содержат VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 135, и/или VL, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 136; или

(i) группы 9 антител, которые содержат VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 137, и/или VL, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 138; или

(j) группы 10 антител, которые содержат VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 139, и/или VL, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 140; или

(k) группы 11 антител, которые содержат VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 129, и/или VL, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 154;

(l) причем группа антител, которые являются предпочтительными, выбрана из группы антител, состоящей из группы 5 антител, которые содержат VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 129, и/или VL, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 130, группы 6 антител, которые содержат VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 131, и/или VL, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 132, и группы 11 антител, которые содержат VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 129, и/или VL, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 154.

3. Антитело согласно любому из аспектов 1-2, представляющее собой полноразмерное химерное антитело, антитело мыши или гуманизированное антитело.

4. Антитело согласно аспекту 3, характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 141, и VL, выбранную из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 146-150 и/или SEQ ID NO: 155-159; или характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 142, и VL, выбранную из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 146-150 и/или SEQ ID NO: 155-159; или характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 143, и VL, выбранную из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 146-150 и/или SEQ ID NO: 155-159; или характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 144, и VL, выбранную из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 146-150 и/или SEQ ID NO: 155-159; или характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 145, и VL, выбранную из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 146-150 и/или SEQ ID NO: 155-159; или характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 168, и VL, выбранную из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 172-175; или характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 169, и VL, выбранную из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 172-175; или характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 170, и VL, выбранную из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 172-175; или характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 171, и VL, выбранную из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 172-175.

5. Антитело согласно любому из аспектов 1-4, имеющее значение Koff, составляющее приблизительно $1,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ (1/с) или более.

6. Антитело согласно любому из аспектов 1-5, содержащее константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или IgA человека, предпочтительно IgG4 человека, необязательно с мутацией S228P (SEQ ID NO: 162) и/или необязательно с мутациями S228P-L235E (SEQ ID NO: 164).

7. Антитело согласно любому из аспектов 1-5, представляющее собой фрагмент антитела и характеризующееся тем, что указанный фрагмент антитела необязательно представляет собой F(ab')₂- или Fab-фрагмент.

8. Антитело согласно любому из аспектов 1-7, представляющее собой биспецифическое антитело.

9. Антитело согласно любому из аспектов 1-8, характеризующееся тем, что указанное антитело специфично связывается с CD47 человека и не активирует CD47 после связывания.

10. Антитело согласно любому из аспектов 1-9, характеризующееся тем, что указанное антитело связывается с прерывистым эпитопом на CD47, предпочтительно CD47 человека.

11. Антитело согласно аспекту 10, характеризующееся тем, что указанный прерывистый эпитоп содержит остатки аминокислот K59, R63, Y66, T67, H108, T109, T117 и T120 (SEQ ID NO: 151); или указанный прерывистый эпитоп содержит остатки аминокислот K59, K61, S107, H108, T117, T120 и R121 hCD47 (SEQ ID NO: 151).

12. Антитело согласно любому из аспектов 1-11, характеризующееся тем, что указанное антитело связывается с мономером CD47 и димером CD47, предпочтительно с мономером и димером CD47 человека соответственно.

13. Антитело согласно любому из аспектов 1-12, характеризующееся тем, что указанное антитело связывается с гликозилированной и дегликозилированной формами CD47, предпочтительно с гликозилированной и дегликозилированной формами CD47 человека соответственно.

14. Полинуклеотид, кодирующий антитело, представленное в любом из аспектов 1-13.

15. Клетка, которая продуцирует антитело, представленное в любом из аспектов 1-13.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, представленное в любом из аспектов 1-13, также необязательно содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

17. Антитело согласно любому из аспектов 1-13 или фармацевтическая композиция согласно аспекту 16 для применения в лечении заболевания у субъекта.

18. Антитело или композиция для применения согласно аспекту 17 для применения в лечении рака.

19. Антитело или композиция для применения согласно аспекту 17 или аспекту 18 для применения в качестве монотерапии.

20. Антитело или композиция для применения согласно аспекту 17 или аспекту 18 для применения в комбинированной терапии, предпочтительно в комбинации с ингибитором Her2 или антителом против Her2 либо с ингибитором EGFR или антителом против EGFR.

21. Антитело или композиция для применения согласно аспектам 17-20, характеризующиеся тем, что указанный субъект представляет собой человека и/или животное, отличное от человека.

22. Способ обнаружения присутствия CD47 в биологическом образце или ткани, причем указанный способ включает (i) осуществление контакта указанного образца или ткани с антителом, представленным в любом из аспектов 1-13, и (ii) определение присутствия антитела, связавшегося с указанными тканью или образцом.

23. Способ получения антитела согласно любому из аспектов 1-13, включающий культивирование клетки согласно аспекту 15 таким образом, чтобы экспрессировалась нуклеиновая кислота согласно аспекту 14, и необязательно восстановление антитела из культуры клеток.

24. Способ лечения или предотвращения рака у субъекта, включающий введение субъекту, страдающему от рака или подверженному риску развития рака, эффективного количества антитела согласно аспектам 1-13.

Дополнительные варианты реализации определены в следующих пронумерованных пунктах.

1. Антитело, которое связывается с гликозилированным и негликозилированным CD47, причем связывание антитела с CD47 не зависит от гликозилирования CD47.

2. Антитело по п.1, характеризующееся тем, что указанное антитело является подходящим для применения в качестве терапевтического антитела.

3. Антитело по п.1 или 2, характеризующееся тем, что указанное антитело связывается с гликозилированной и дегликозилированной формами CD47 человека.

4. Антитело по п.3, характеризующееся тем, что указанная гликозилированная форма CD47 человека содержит один или несколько N-гликозилированных остатков в положениях N23, N34, N50, N73, N111 и/или N206 в последовательности аминокислот CD47 человека (SEQ ID NO: 151).

5. Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что указанная дегликозилированная форма CD47 человека содержит гликозилированный CD47 человека, который был обработан пептид-N-гликозидазой (ПНГазой) для удаления N-гликозилирований.

6. Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что (i) соотношение EC_{50} связывания антитела с негликозилированной по сравнению с гликозилированной формами CD47 меньше 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,25, предпочтительно находится в диапазоне от 4 до 1, более предпочтительно от 3 до 1, наиболее предпочтительно от 2 до 1; и/или (ii) соотношение EC_{95} связывания антитела с негликозилированной по сравнению с гликозилированной формами CD47 меньше 25, 20, 10, 1, 0,5 или 0,25, предпочтительно находится в диапазоне от 10 до 1, более предпочтительно от 9 до 1, наиболее предпочтительно от 9 до 1.

7. Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что указанное антитело связывается с каждым из гликозилированного и негликозилированного CD47 с равновесной константой связывания, составляющей 80 пМ или менее, предпочтительно 70 пМ или менее, более предпочтительно 60 пМ или менее.

8. Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что максимальная связывающая способность ($B_{\max 2}$) антитела с негликозилированным CD47 составляет по меньшей мере 60% от максимальной связывающей способности ($B_{\max 1}$) антитела с гликозилированным CD47.

9. Антитело по любому из предшествующих пунктов, имеющее значение K_{off} связывания с гликозилированным и/или негликозилированным CD47, составляющим приблизительно $1,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ (1/с) или более.

10. Антитело по п.9, имеющее значение K_{off} связывания с гликозилированным и/или негликозилированным CD47 от $1,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $1,0 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$.

11. Антитело по п.10, имеющее значение K_{off} связывания с гликозилированным и/или негликозилированным CD47 от $2,5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $8,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$.

12. Антитело, которое связывается с CD47, имеющее значение K_{off} связывания с CD47 от $1,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $1,0 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$.

13. Антитело, которое выбрано из группы антител, состоящей из (i) группы антител, которые содержат тяжелую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 49-51 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 52-54 (номенклатура IMGT), и легкую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 55-57 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 58-60 (номенклатура IMGT), (ii) группы антител, которые содержат тяжелую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 61-63 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 64-66 (номенклатура IMGT), и легкую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 67-69 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 70-72 (номенклатура IMGT); и (iii) группы антител, которые содержат тяжелую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 49-51 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 52-54 (номенклатура IMGT), и легкую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 55, 152, 57 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 58, 153, 60 (номенклатура IMGT).

14. Антитело по п.13, характеризующееся тем, что указанное антитело выбрано из группы антител, состоящей из

(a) группы антител, которые содержат VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 129, и VL, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 130; или

(b) группы антител, которые содержат VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 131, и VL, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 132; или

(c) группы антител, которые содержат VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 129, и VL, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 154.

15. Антитело по любому из пп.13-14, представляющее собой полноразмерное химерное антитело, антитело мыши или гуманизированное антитело.

16. Антитело по п.15, характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 141, и VL, выбранную из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 146-150 и/или SEQ ID NO: 155-159; или характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 142, и VL, выбранную из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 146-150 и/или SEQ ID NO: 155-159; или характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 143, и VL, выбранную из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 146-150 и/или SEQ ID NO: 155-159; или характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 144, и VL, выбранную из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 146-150 и/или SEQ ID NO: 155-159; или характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 145, и VL, выбранную из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 146-150 и/или SEQ ID NO: 155-159; или характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 168, и VL, выбранную из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 172-175; или характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 169, и VL, выбранную из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 172-175; или характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 170, и VL, выбранную

из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 172-175; или характеризующееся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 171, и VL, выбранную из группы VL, состоящей из последовательностей аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 172-175.

17. Антитело по любому из пп.13-16, имеющее значение K_{off} от $1,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $1,0 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$.

18. Антитело по любому из пп.13-17, содержащее константную область IgG4 человека необязательно с мутацией S228P (SEQ ID NO: 162) или необязательно с мутациями S228P-L235E (SEQ ID NO: 164).

19. Антитело по любому из пп.13-18, представляющее собой фрагмент антитела, и характеризующееся тем, что указанный фрагмент антитела необязательно представляет собой $F(ab')_2$ - или Fab-фрагмент.

20. Антитело по любому из пп.13-19, представляющее собой биспецифическое антитело.

21. Антитело по любому из пп.13-20, характеризующееся тем, что указанное антитело специфично связывается с CD47 и нарушает взаимодействие CD47 с SIRP α , предпочтительно антитело специфично связывается с CD47 человека и нарушает взаимодействие CD47 человека с SIRP α соответственно.

22. Антитело по любому из пп.13-21, характеризующееся тем, что указанное антитело связывается с прерывистым эпитопом на CD47, предпочтительно CD47 человека.

23. Антитело по п.22, характеризующееся тем, что указанный прерывистый эпитоп содержит остатки аминокислот K59, R63, Y66, T67, H108, T109, T117 и T120 CD47 человека (SEQ ID NO: 151); или указанный прерывистый эпитоп содержит остатки аминокислот K59, K61, S107, H108, T117, T120 и R121 CD47 человека (SEQ ID NO: 151).

24. Антитело по любому из пп.13-23, характеризующееся тем, что указанное антитело связывается с мономером CD47 и димером CD47, предпочтительно мономером и димером CD47 человека соответственно.

25. Антитело по любому из пп.13-24, характеризующееся тем, что указанное антитело связывается с гликозилированной и дегликозилированной формами CD47, предпочтительно с гликозилированной и дегликозилированной формами CD47 человека соответственно.

26. Полинуклеотид, кодирующий антитело, представленное в любом из пп.1-24.

27. Клетка, которая продуцирует антитело, представленное в любом из пп.1-24.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, представленное в любом из пп.1-24, также необязательно содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

29. Антитело по любому из пп.1-24 или фармацевтическая композиция по п.28 для применения в лечении заболевания у субъекта.

30. Антитело или композиция для применения по п.29 для применения в лечении рака.

31. Антитело или композиция для применения по п.30 для применения в качестве монотерапии.

32. Антитело или композиция для применения по п.30 для применения в комбинированной терапии, предпочтительно в комбинации с ингибитором Her2 или антителом против Her2 либо с ингибитором EGFR или антителом против EGFR.

33. Антитело или композиция для применения по пп.29-32, характеризующиеся тем, что указанный субъект представляет собой человека или животное, отличное от человека.

34. Способ обнаружения присутствия CD47 в биологическом образце или ткани, причем указанный способ включает: (i) осуществление контакта указанного образца или ткани с антителом, представленным в любом из пп.1-24, и (ii) определение присутствия антитела, связавшегося с указанными тканью или образцом.

35. Способ получения антитела по любому из пп.1-24, включающий культивирование клетки по п.27 таким образом, чтобы экспрессировалась нуклеиновая кислота по п.26, и необязательно восстановление антитела из культуры клеток.

36. Способ лечения или предотвращения рака у субъекта, включающий введение субъекту, страдающему от рака или подверженному риску развития рака, эффективного количества антитела по пп.1-24.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против CD47, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит:

а) тяжелую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 49-51 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 52-54 (номенклатура IMGT), и легкую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 55, 152 и 57 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 58, 153 и 60 (номенклатура IMGT); или

б) тяжелую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 49-51 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 52-54 (номенклатура IMGT), и легкую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 55-57 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 58-60 (номенклатура IMGT).

2. Биспецифическое антитело, которое связывается с CD47, характеризующееся тем, что указанное

аа) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 145, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 147;

bb) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 145, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 148;

сс) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 145, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 149;

dd) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 145, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 150.

4. Антитело против CD47, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 61-63 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 64-66 (номенклатура IMGT), и легкую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 67-69 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 70-72 (номенклатура IMGT).

5. Биспецифическое антитело, которое связывается с CD47, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 61-63 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 64-66 (номенклатура IMGT), и легкую цепь, содержащую каждую из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 67-69 (номенклатура согласно Кэботу) или SEQ ID NO: 70-72 (номенклатура IMGT).

6. Антитело по п.4 или 5, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит:

а) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 168, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 172;

б) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 168, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 173:

с) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 168, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174;

d) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 168, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 175:

е) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 169, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 172:

г) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 169, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 173:

g) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 169, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174;

h) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 169, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 175:

и) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 170, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 172;

ж) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 170, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 173:

к) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 170, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174;

l) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 170, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 175;

т) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 171, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 172;

n) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 171, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 173:

о) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 171, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174; или

р) последовательность VH, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 171, и последовательность VL, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 175.

7. Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что указанное антитело связывается с гликозилированным и негликозилированным CD47, причем связывание указанного антитела с CD47 не зависит от гликозилирования CD47.

8. Антитело по п.7, характеризующееся тем, что

а) указанная гликозилированная форма CD47 человека содержит один или несколько N-гликозилрованных остатков в положениях N23, N34, N50, N73, N111 и/или N206 в последовательности аминокислот CD47 человека (SEQ ID NO: 151); и/или

б) указанная дегликозилированная форма CD47 человека содержит гликозилированный CD47 человека, который был обработан пептид-N-гликозидазой (ПНГазой) для удаления N-гликозилированных; и/или

с) указанное антитело специфично связывается с гликозилированным и негликозилированным

CD47 и нарушает взаимодействие CD47 с SIRP α .

9. Антитело по п.8(с), характеризующееся тем, что указанное антитело специфично связывается с гликозилированным и негликозилированным CD47 человека и нарушает взаимодействие CD47 человека с SIRP α соответственно.

10. Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что указанное антитело представляет собой фрагмент антитела.

11. Антитело по п.10, характеризующееся тем, что указанный фрагмент антитела представляет собой F(ab')₂-, scFv или Fab-фрагмент.

12. Антитело по любому из предшествующих пунктов, содержащее IgG4 человека.

13. Антитело по п.12, содержащее IgG4 человека с мутацией S228P (SEQ ID NO: 162).

14. Антитело по п.13, содержащее IgG4 человека с двойной мутацией S228P-L235E (SEQ ID NO: 164).

15. Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что

а) указанное антитело связывается с прерывистым эпитопом на CD47, предпочтительно CD47 человека; и/или

б) указанное антитело связывается с мономером CD47 и димером CD47, предпочтительно с мономером и димером CD47 человека соответственно.

16. Антитело по п.15(а), характеризующееся тем, что указанный прерывистый эпитоп содержит остатки аминокислот K59, R63, Y66, T67, H108, T109, T117 и T120 CD47 человека (SEQ ID NO: 151); или указанный прерывистый эпитоп содержит остатки аминокислот K59, K61, S107, H108, T117, T120 и R121 CD47 человека (SEQ ID NO: 151).

17. Антитело по любому из предшествующих пунктов, характеризующееся тем, что

а) соотношение EC₅₀ связывания антитела с негликозилированной по сравнению с гликозилированной формами CD47 меньше 4:1, 3:1, 2:1, 1:2, 1:3 или 1:4; и/или

б) соотношение EC₉₅ связывания антитела с негликозилированной по сравнению с гликозилированной формами CD47 меньше 25:1, 20:1 или 10:1, 1:10, 1:20 или 1:25; и/или

с) указанное антитело связывается с каждым из гликозилированного и негликозилированного CD47 с равновесной константой связывания, составляющей 80 пМ или менее; и/или

д) максимальная связывающая способность (Bmax₂) антитела с негликозилированным CD47 составляет по меньшей мере 60% от максимальной связывающей способности (Bmax₁) антитела с гликозилированным CD47; и/или

е) указанное антитело имеет значение K_{off} связывания с гликозилированным и/или негликозилированным CD47, составляющим приблизительно $1,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ (1/с) или более; в том числе указанное антитело имеет значение K_{off} связывания с гликозилированным и/или негликозилированным CD47 от $1,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $1,0 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, в том числе указанное антитело имеет значение K_{off} связывания с гликозилированным и/или негликозилированным CD47 от $2,5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $8,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$; и/или

ф) указанное антитело имеет значение K_{off} связывания с CD47 от $1,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $1,0 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$.

18. Антитело по п.17(а), характеризующееся тем, что соотношение EC₅₀ связывания антитела с негликозилированной по сравнению с гликозилированной формами CD47 находится в диапазоне от 4:1 до 1:4.

19. Антитело по п.17(а), характеризующееся тем, что соотношение EC₅₀ связывания антитела с негликозилированной по сравнению с гликозилированной формами CD47 находится в диапазоне от 3:1 до 1:3.

20. Антитело по п.17(а), характеризующееся тем, что соотношение EC₅₀ связывания антитела с негликозилированной по сравнению с гликозилированной формами CD47 находится в диапазоне от 2:1 до 1:2.

21. Антитело по п.17(б), характеризующееся тем, что соотношение EC₅₀ связывания антитела с негликозилированной по сравнению с гликозилированной формами CD47 находится в диапазоне от 10:1 до 1:10.

22. Антитело по п.17(б), характеризующееся тем, что соотношение EC₅₀ связывания антитела с негликозилированной по сравнению с гликозилированной формами CD47 находится в диапазоне от 9:1 до 1:9.

23. Антитело по п.17(с), характеризующееся тем, что указанное антитело связывается с каждым из гликозилированного и негликозилированного CD47 с равновесной константой связывания, составляющей 70 пМ или менее.

24. Антитело по п.17(с), характеризующееся тем, что указанное антитело связывается с каждым из гликозилированного и негликозилированного CD47 с равновесной константой связывания, составляющей 60 пМ или менее.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, представленное в любом из пп.1-24, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

26. Полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп.1-24.

27. Клетка, содержащая полинуклеотид по п.26, причем указанная клетка продуцирует антитело по любому из пп.1-24.

28. Способ получения антитела по любому из пп.1-24, включающий культивирование клетки по п.27 таким образом, чтобы экспрессировался полинуклеотид по п.26.

29. Способ по п.28, включающий восстановление антитела из культуры клеток.

30. Применение антитела по любому из пп.1-24 в лечении заболевания у субъекта.

31. Применение по п.30, причем антитело применяется в комбинированной терапии.

32. Применение по п.31, причем комбинированная терапия представляет собой комбинацию с ингибитором Her2 или антителом против Her2 либо с ингибитором EGFR или антителом против EGFR.

33. Применение по любому из пп.30-32, причем заболевание представляет собой рак.

34. Применение по п.33, характеризующееся тем, что указанный рак представляет собой рак желудка, легких, яичников или молочной железы.

35. Применение по любому из пп.30-34, характеризующееся тем, что субъект представляет собой человека или животное, отличное от человека.

36. Применение фармацевтической композиции по п.25 для лечения заболевания у субъекта.

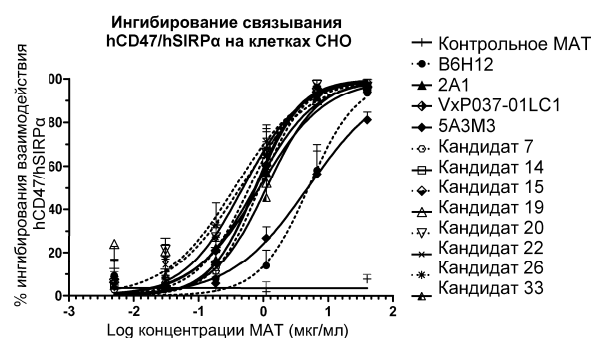
37. Применение по п.36, причем антитело применяется в комбинированной терапии.

38. Применение по п.37, причем комбинированная терапия представляет собой комбинацию с ингибитором Her2 или антителом против Her2 либо с ингибитором EGFR или антителом против EGFR.

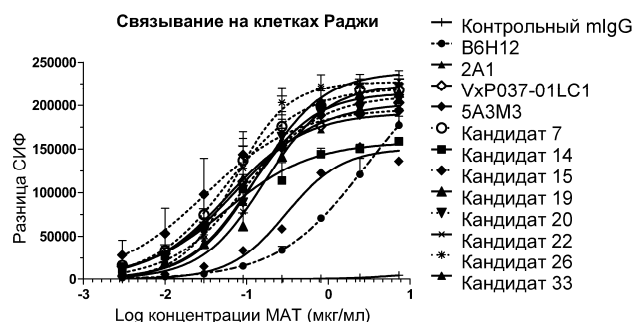
39. Применение по любому из пп.36-38, причем заболевание представляет собой рак.

40. Применение по п.39, характеризующееся тем, что указанный рак представляет собой рак желудка, легких, яичников или молочной железы.

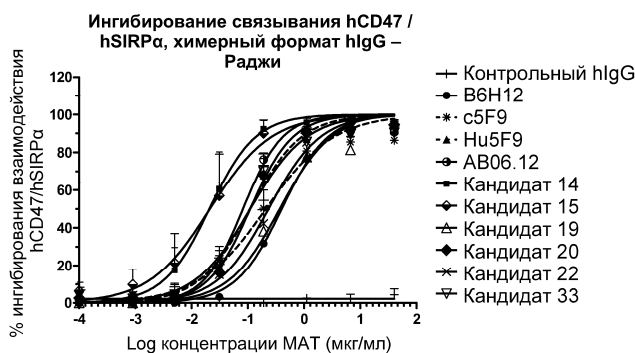
41. Применение по любому из пп.36-40, характеризующееся тем, что субъект представляет собой человека или животное, отличное от человека.



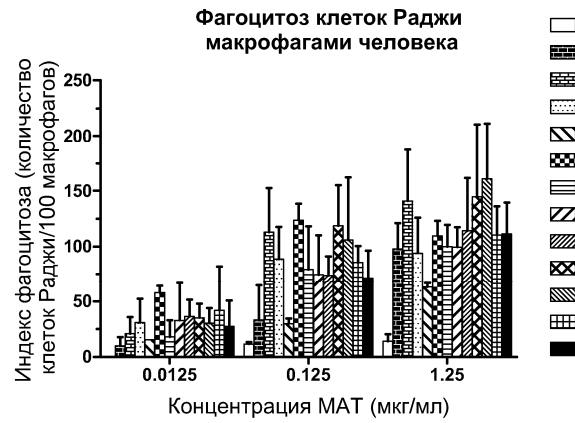
Фиг. 1



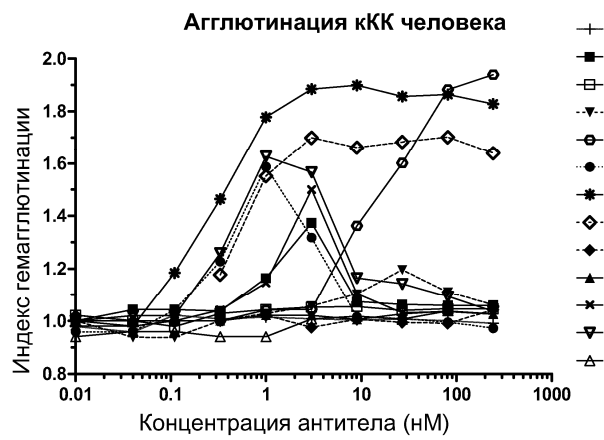
Фиг. 2



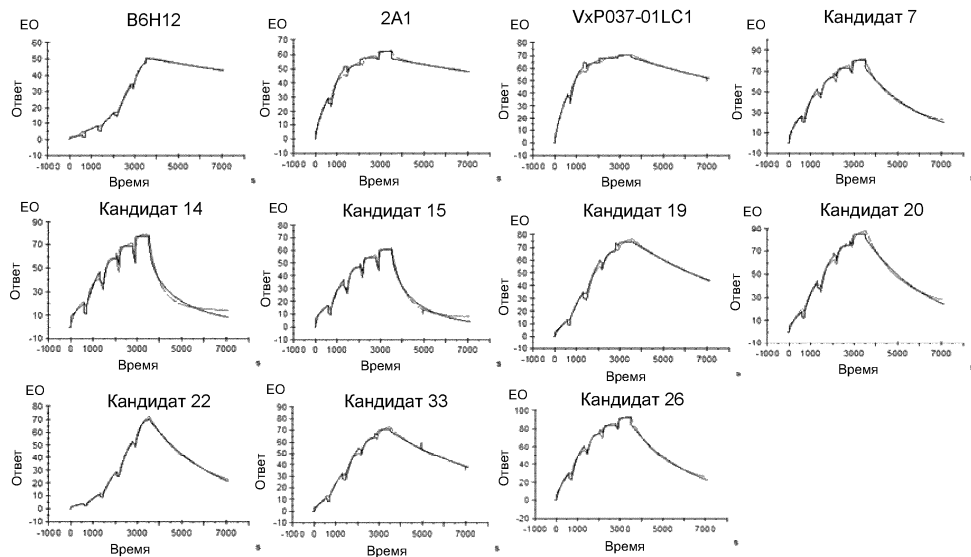
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



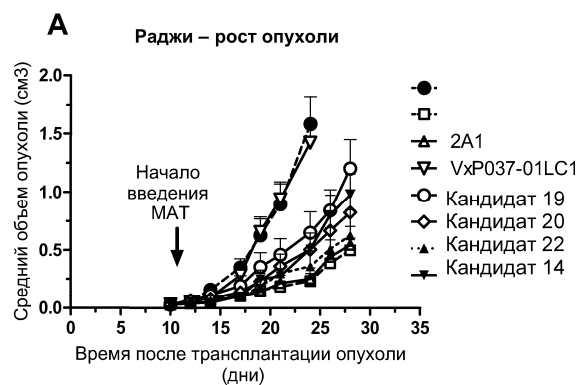
Фиг. 6

		1		50
VH0	(1)	QVQLKQSGAEIVRPGASVKLSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGGQGLEWIA		
VH1	(1)	QVQLLESQAVLARPGETSVKLSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGGQGLEWIGR		
VH2	(1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGGQGLEWMGR		
VH3	(1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGGQGLEWMGR		
VH4	(1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGGQGLEWMGR		
VH5	(1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGGQGLEWMGR		
		51		100
VH0	(51)	IYPGIGNTYYNKKFKGRATLTAEKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCARGH		
VH1	(51)	IYPGIGNTYYNKKFKGRATLTAAISASIAYLEFSSLTNEEDSAVYFCARGH		
VH2	(51)	IYPGIGNTYYNKKFKGRVTITRTDSASTAYMELSSLRSEDATAVYFCARGH		
VH3	(51)	IYPGIGNTYYNKKFKGRVTITRTDSISTAHMELSSLRSDDTAVYFCARGH		
VH4	(51)	IYPGIGNTYYNKKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDATAVYFCARGH		
VH5	(51)	IYPGIGNTYYNKKFKGRVTITRTYSISTAYMELSLRSEDATAVYFCARGH		
		101		118
VH0	(101)	YGRGMDYWGQGTSTVTVSS		
VH1	(101)	YGRGMDYWGQGTSTVTVSS		
VH2	(101)	YGRGMDYWGQGTSTVTVSS		
VH3	(101)	YGRGMDYWGQGTSTVTVSS		
VH4	(101)	YGRGMDYWGQGTSTVTVSS		
VH5	(101)	YGRGMDYWGQGTSTVTVSS		

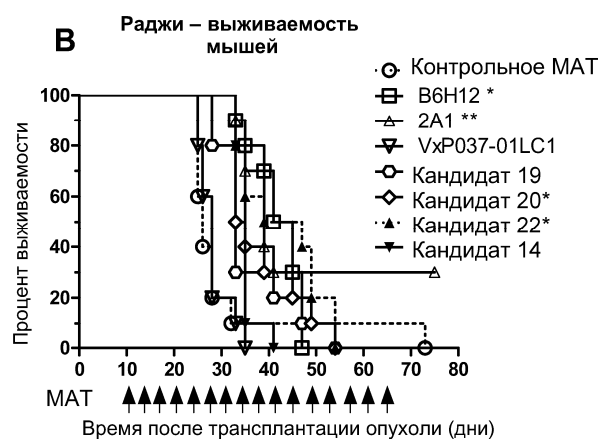
Фиг. 7

		1		50
VL0	(1)	DIVMTQSPSSSLAMSVGCKVTMNCSSQSLNLSIDQKNYLAWYQQKPGQSP		
VL1	(1)	DIVMTQSPSSSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSIDQKNYLAWYQQKPGQSP		
VL2	(1)	DIVMTQSPSSSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSIDQKNYLAWYQQKPGQSP		
VL3	(1)	DIVMTQSPSSSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSIDQKNYLAWYQQKAGQSP		
VL4	(1)	DIVMTQSPSSSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSIDQKNYLAWYQQKPGQSP		
VL5	(1)	DIVMTQSPSSSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSIDQKNYLAWYQQKPGQSP		
		51		100
VL0	(51)	KLLIYFASTKESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISISQAEDLADYFCQQHYST		
VL1	(51)	KLLIYFASTKESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISISQAEDVAVYFCQQHYST		
VL2	(51)	KLLIYFASTKESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISISQAEDVAVYFCQQHYST		
VL3	(51)	KLLIYFASTKESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISISQAEDVAVYFCQQHYST		
VL4	(51)	KLLIYFASTKESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISISQAEDVAVYFCQQHYST		
VL5	(51)	KLLIYFASTKESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISISQAEDVAVYFCQQHYST		
		101		113
VL0	(101)	PWTFGGGTKVEIK		
VL1	(101)	PWTFGGGTKVEIK		
VL2	(101)	PWTFGGGTKVEIK		
VL3	(101)	PWTFGGGTKVEIK		
VL4	(101)	PWTFGGGTKVEIK		
VL5	(101)	PWTFGGGTKVEIK		

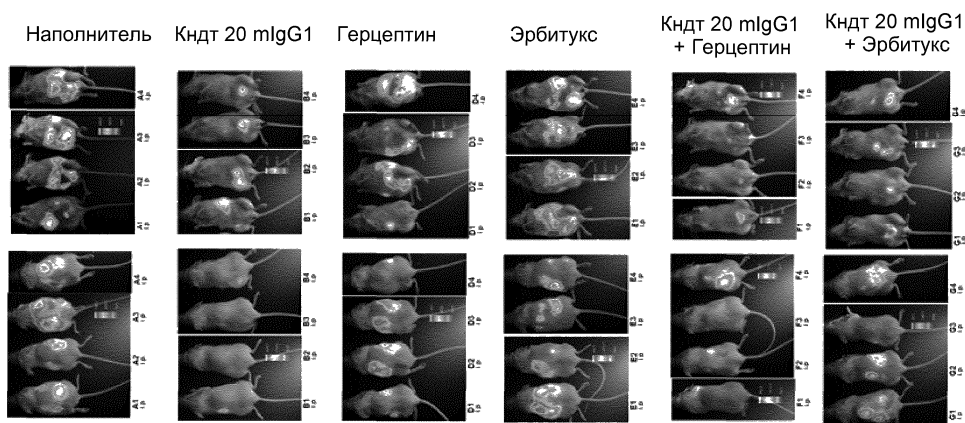
Фиг. 8



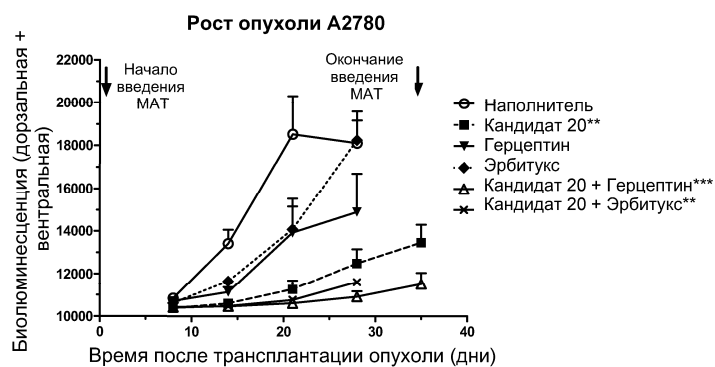
Фиг. 9А



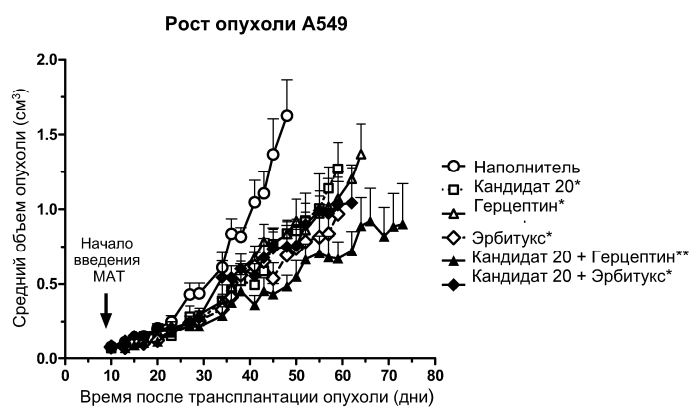
Фиг. 9В



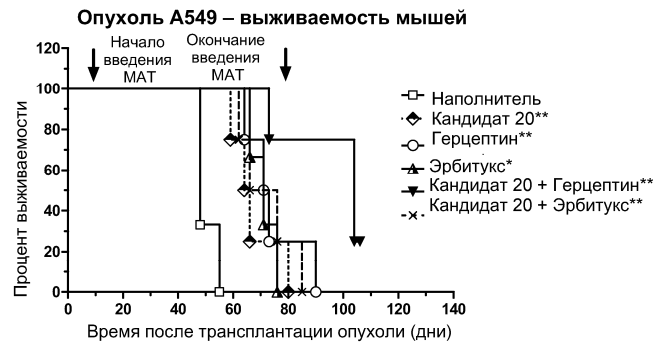
Фиг. 10А



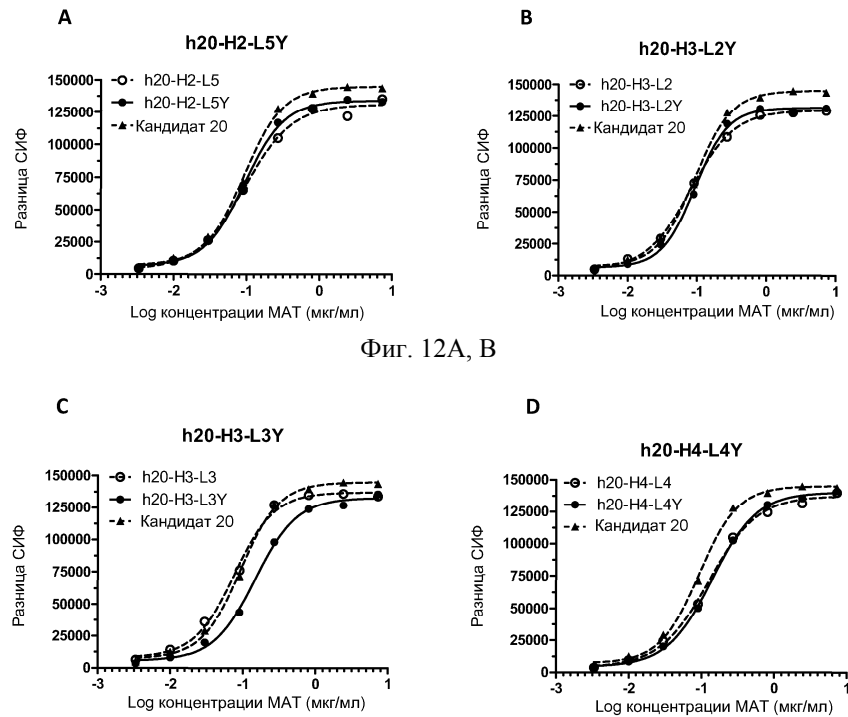
Фиг. 10В



Фиг. 11А

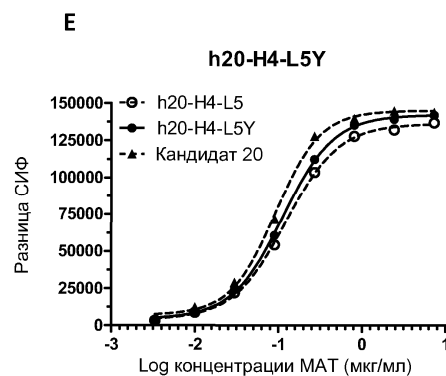


Фиг. 11В

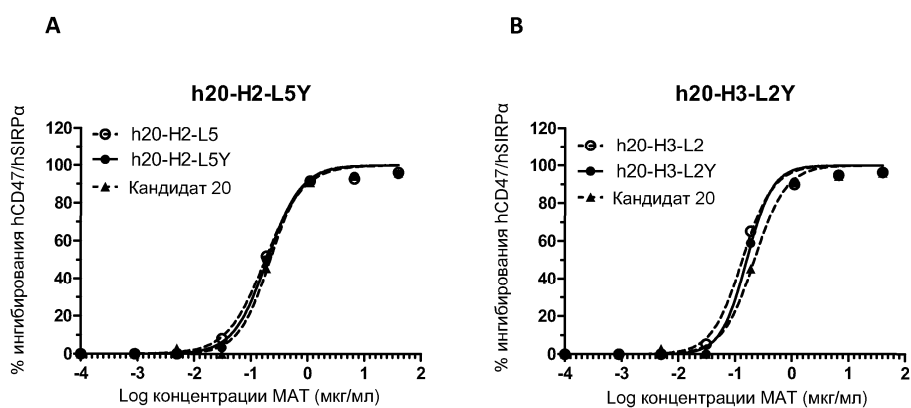


Фиг. 12А, В

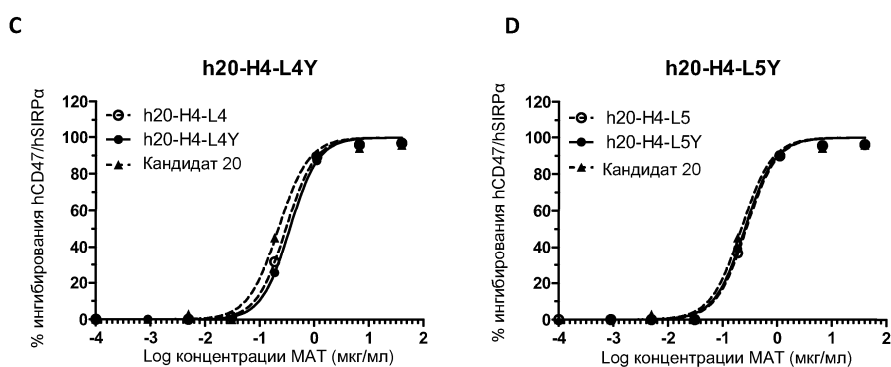
Фиг. 12С, D



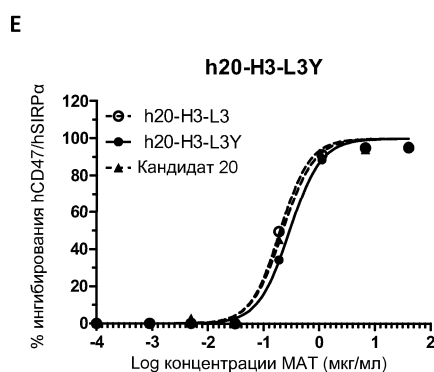
Фиг. 12Е



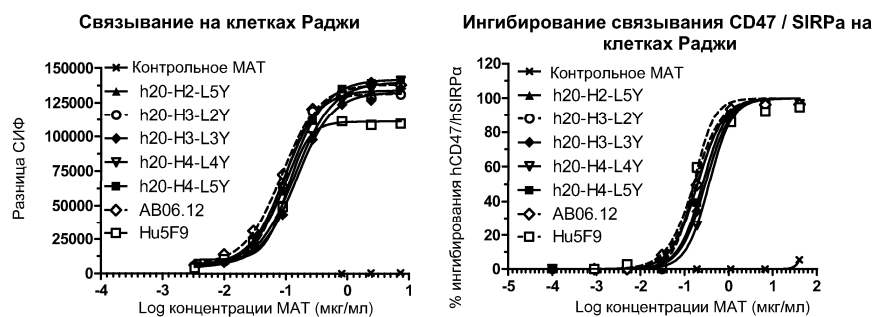
Фиг. 13А, В



Фиг. 13С, D

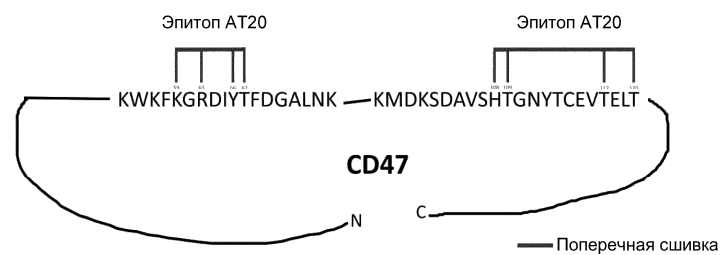


Фиг. 13Е

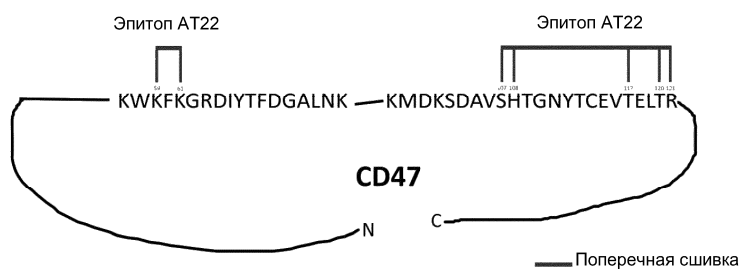


Фиг. 14

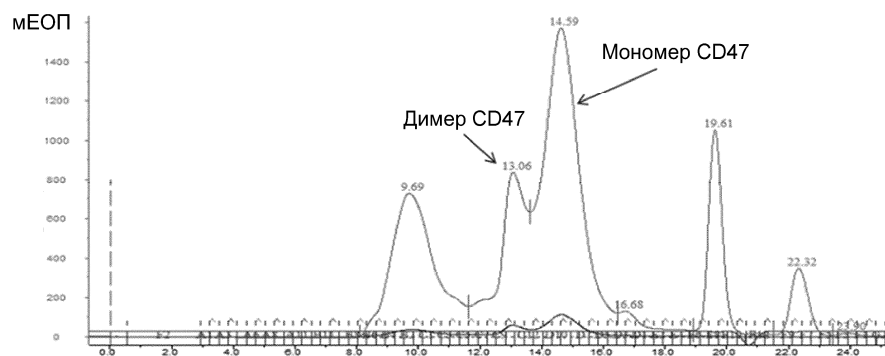
038880



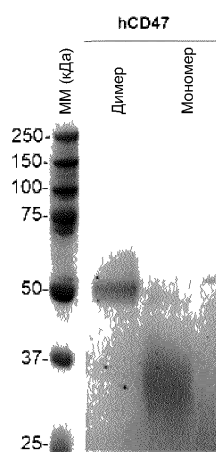
Фиг. 15



Фиг. 16

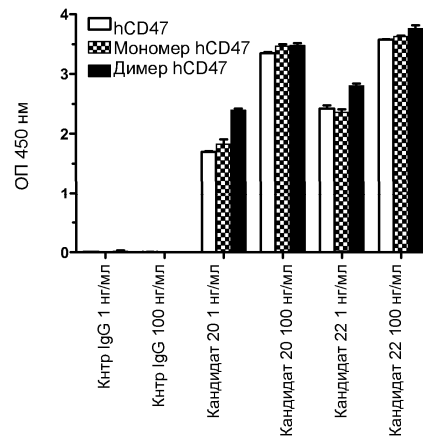


Фиг. 17



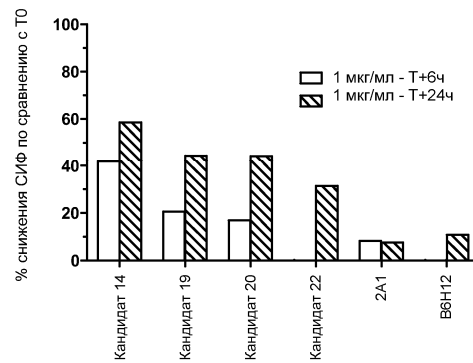
Фиг. 18

**Распознавание мономера и димера hCD47
методом связывающего анализа ELISA**



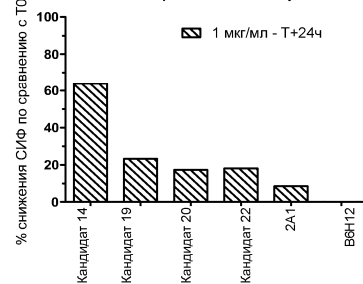
Фиг. 19

**Снижение связывания МАТ с CD47 на
кКК**

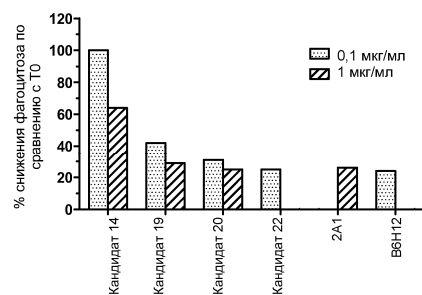


Фиг. 20

**А Снижение связывания МАТ с CD47 на клетках
Раджи (Т+24 часа по сравнению с Т0)**

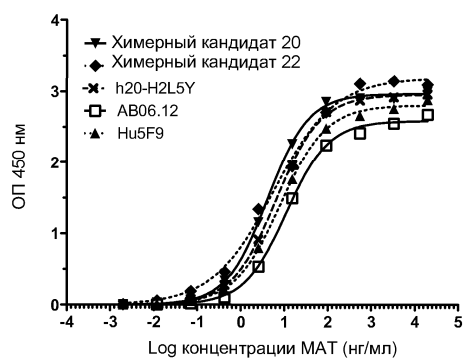


**В Снижение фагоцитоза клеток Раджи hMDM (Т+24
часа по сравнению с Т0)**

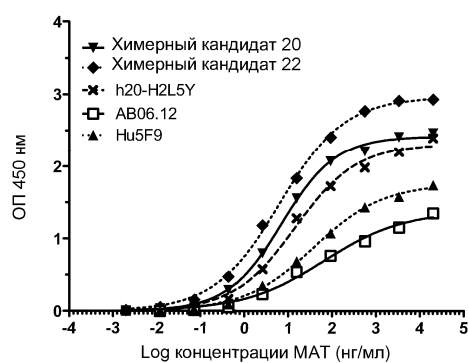


Фиг. 21

А

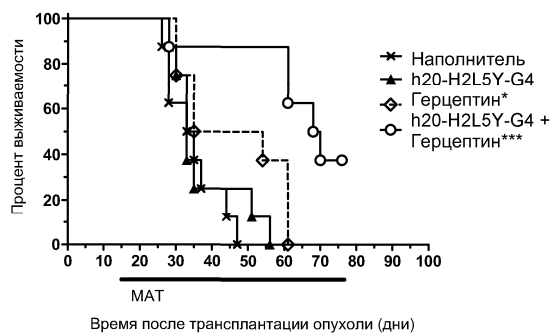
Связывание с гликозилированным
hCD47-His методом ELISA

В

Связывание с N-дегликозилированным
hCD47-His методом ELISA

Фиг. 22

A549 – выживаемость мышей



Фиг. 23

Рост опухоли NCI-N87 на мышах NOG



Фиг. 24



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2