

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041310**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.07

(21) Номер заявки
201990764

(22) Дата подачи заявки
2017.10.20

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) НОВЫЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К CD47 И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

(31) PCT/CN2016/102720; PCT/
CN2017/076462; PCT/CN2017/000329

(32) 2016.10.20; 2017.03.13; 2017.04.27

(33) CN

(43) 2020.01.17

(86) PCT/US2017/057535

(87) WO 2018/075857 2018.04.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**И-МАБ БАЙОФАРМА ЮЭС
ЛИМИТЕД (US)**

(72) Изобретатель:
**Ванг Чжэни, Фанг Лэй, Гуо Бингши,
Занг Цзину (CN)**

(74) Представитель:
**Вашук Т.В., Емельянова В.А.,
Королева С.В. (BY)**

(56) US-A1-20150238604
WO-A1-2016081423

O'CONNOR et al. "309: A novel peptide that defines a functional epitope on CD47 identified using phage display", Gastroenterology, 16 May 2008 (16.05.2008), Vol. 120, Iss. 5, Suppl. 1, Pg. A59, entire document

US-A1-20080131431

WEISKOPF et al. "CD47-blocking immunotherapies stimulate macrophage-mediated destruction of small-cell lung cancer", The Journal of Clinical Investigation, 13 June 2016 (13.06.2016), Vol. 126, Iss. 7, Pgs. 2610-2620, entire document

(57) Изобретение касается новых антител к CD47 и их иммунологических фрагментов, которые обладают низкой иммуногенностью у человека и вызывают незначительную или вообще не вызывают деплецию или гемагглютинацию эритроцитов, а также фармакологических композиций, содержащих такие антитела, которые можно применять для лечения заболеваний, опосредуемых CD47, и ингибирования фагоцитоза или агрегации тромбоцитов.

B1

041310

**041310
B1**

Отсылки к родственным заявкам

В заявке на данное изобретение заявляется приоритет по международной заявке № PCT/CN2016/102720, поданной 20 октября 2016 г., международной заявке № PCT/CN2017/076462, поданной 13 марта 2017 г., и международной заявке № PCT/CN2017/000329, поданной 20 октября 2016 г., содержание которых включено в данный документ в полном объеме.

Предпосылки создания изобретения

Впервые CD47 (кластер дифференцировки 47) был идентифицирован в 80-х годах прошлого века как опухолевый антиген при раке яичников у человека. С тех пор экспрессия CD47 была обнаружена во многих видах опухолей человека, включая острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (ALL), неходжкинскую лимфому (NHL), множественную миелому (MM), рак мочевого пузыря и другие твердые опухоли. Высокие уровни CD47 позволяют раковым клеткам избежать фагоцитоза, несмотря на более высокие показатели уровня кальретикулина - мощного профагоцитарного сигнала.

CD47, известный также как интегрин-ассоциированный белок (IAP), антиген рака яичников OA3, антиген, связанный с Rh, и MER6, представляет собой многоспиральный трансмембранный рецептор, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов. Экспрессия и активность CD47 проявляется в ряде заболеваний и расстройств. CD47 - широко экспрессируемый трансмембранный гликопротеин из одного Ig-подобного домена и пяти спиральных участков мембраны, действующий как клеточный лиганд для SIRP α , связывание которого с сигнальным регуляторным белком α (SIRP α) опосредуется через NH₂-концевой V-подобный домен. SIRP α экспрессируется прежде всего на поверхности миелоидных клеток, включая макрофаги, гранулоциты, миелоидные дендритные клетки (DC), мастоциты, а также их предшественников, включая гемопоэтические стволовые клетки.

Макрофаги обеспечивают удаление патогенов и поврежденных или состарившихся клеток из кровяного русла путем фагоцитоза. Клеточно-поверхностный CD47 взаимодействует со своим рецептором на поверхности макрофагов, SIRP α и ингибирует фагоцитоз здоровых нормальных клеток. SIRP α ингибирует фагоцитоз клеток-хозяев при помощи макрофагов, причем лигирование SIRP α с макрофагами при помощи CD47, экспрессируемого на целевой клетке-хозяине, генерирует ингибиторный сигнал, опосредуемый SHP-1, которая негативно регулирует фагоцитоз.

Согласно роли CD47, которую он играет в ингибировании фагоцитоза нормальных клеток, есть свидетельства, указывающие на то, что он имеет повышенный уровень транзиторной экспрессии в гемопоэтических стволовых клетках (HSC) и клетках-предшественниках непосредственно перед или во время фазы миграции клеток и что уровень CD47 в этих клетках определяет вероятность их захвата *in vivo*.

CD47 также имеет повышенный уровень конститутивной экспрессии в некоторых видах рака, включая миелоидные лейкозы. Сверхэкспрессия CD47 в клетках линии миелоидного лейкоза увеличивает его патогенность, вследствие чего он не участвует в фагоцитозе. Было сделано заключение, что повышенный уровень экспрессии CD47 является важным механизмом обеспечения защиты нормальных HSC во время их опосредованной воспалением мобилизации и что лейкоэмические клетки-предшественники также используют эту способность для защиты от убийства макрофагами.

Было показано, что некоторые антитела к CD47 восстанавливают фагоцитоз и предотвращают атеросклероз. См., например, Kojima et al., Nature, vol. 36, 86-90 (Aug. 4, 2016). Настоящее изобретение обеспечивает новые антитела к CD47 и их иммунологически активные фрагменты, которые обладают низкой иммуногенностью у человека и снижают или не повышают уровень деплеции эритроцитов. Специалисту в данной области известно, что такие антитела могут также называться "анти-CD47-антителами".

Краткое изложение сущности изобретения

Согласно одному аспекту настоящего изобретения обеспечиваются выделенные моноклональные антитела и их иммунологически активные фрагменты, которые связываются с CD47 человека. Для краткости эти CD47-связывающие выделенные моноклональные антитела и их иммунологически активные фрагменты далее называются "антителами к CD47". Антитела к CD47 по данному изобретению способны модулировать, т.е. блокировать, ингибировать, редуцировать, антагонизировать, нейтрализовать или иным образом воздействовать на экспрессию, активность и/или передачу сигнала CD47 либо на взаимодействие CD47 с SIRP α . Весьма примечательно, что антитела к CD47 по данному изобретению обычно не вызывают значительную деплецию или гемагглютинацию уровня эритроцитов в крови человека и, что более удивительно, во многих случаях вообще не вызывают деплецию или гемагглютинацию эритроцитов в крови человека. Кроме того, антитела к CD47 по данному изобретению демонстрируют потенциальную антиопухолевую активность.

Согласно вариантам осуществления антитела к CD47 по данному изобретению содержат (а) последовательность вариативной области тяжелой (VH) цепи, которая по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 95%) идентична аминокислотной последовательности, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23,

SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77; и (b) последовательность вариабельной области легкой (VL) цепи, которая по меньшей мере на 90% (например, по меньшей на 95%) идентична аминокислотной последовательности, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 78.

Согласно еще одним вариантам осуществления антитела к CD47 по данному изобретению содержат последовательности спаренных VH/VL цепей, которые по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99 или 99,5%) идентичны паре VH и VL аминокислотных последовательностей, выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 (т.е. 1A1), SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 (т.е. 1F8), SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 (т.е. 2A11), SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 (т.е. 2C2), SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 (т.е. 2D7), SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 (т.е. 2G4), SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14 (т.е. 2G11), SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16 (т.е. 6F4), SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 (т.е. 5H1), SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20 (т.е. 5F6), SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22 (т.е. 1F3), SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 (т.е. 2A4), SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26 (т.е. 2B12), SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28 (т.е. 13A11), SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 (т.е. 15E1), SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32 (т.е. 13H3), SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34 (т.е. 14A8), SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36 (т.е. 16H3), SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38 (т.е. 1A1), SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40 (т.е. 1A1-A), SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42 (т.е. 1A1-Q), SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44 (т.е. 1A2), SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46 (т.е. 1A8), SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48 (т.е. 1B1), SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 50 (т.е. 1B2), SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52 (т.е. 1H3), SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54 (т.е. 1H3-Q), SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56 (т.е. 1H3-A), SEQ ID NO: 57 и SEQ ID NO: 58 (т.е. 2A2), SEQ ID NO: 59 и SEQ ID NO: 60 (т.е. 2A3), SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62 (т.е. 2A6), SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 64 (т.е. 2A10), SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66 (т.е. 2B1), SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 68 (т.е. 2C6), SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70 (т.е. 2E7), SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72 (т.е. 2E9), SEQ ID NO: 73 и SEQ ID NO: 74 (т.е. 2F1), SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76 (т.е. 2F3) и SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78 (т.е. 34C5).

В некоторых случаях антитела к CD47 по данному изобретению содержат пару последовательностей VH и VL цепей, выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 (т.е. 1A1), SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 (т.е. 1F8), SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 (т.е. 2A11), SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 (т.е. 2C2), SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 (т.е. 2D7), SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 (т.е. 2G4), SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14 (т.е. 2G11), SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16 (т.е. 6F4), SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 (т.е. 5H1), SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20 (т.е. 5F6), SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22 (т.е. 1F3), SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 (т.е. 2A4), SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26 (т.е. 2B12), SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28 (т.е. 13A11), SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 (т.е. 15E1), SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32 (т.е. 13H3), SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34 (т.е. 14A8), SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36 (т.е. 16H3), SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38 (т.е. 1A1), SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40 (т.е. 1A1-A), SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42 (т.е. 1A1-Q), SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44 (т.е. 1A2), SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46 (т.е. 1A8), SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48 (т.е. 1B1), SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 50 (т.е. 1B2), SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52 (т.е. 1H3), SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54 (т.е. 1H3-Q), SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56 (т.е. 1H3-A), SEQ ID NO: 57 и SEQ ID NO: 58 (т.е. 2A2), SEQ ID NO: 59 и SEQ ID NO: 60 (т.е. 2A3), SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62 (т.е. 2A6), SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 64 (т.е. 2A10), SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66 (т.е. 2B1), SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 68 (т.е. 2C6), SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70 (т.е. 2E7), SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72 (т.е. 2E9), SEQ ID NO: 73 и SEQ ID NO: 74 (т.е. 2F1), SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76 (т.е. 2F3) и SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78 (т.е. 34C5).

Антитела к CD47 по данному изобретению могут быть химерными или гуманизированными. Они могут предотвратить или значительно уменьшить взаимодействие CD47 человека с SIRP α либо стимулировать макрофаг-опосредованный фагоцитоз CD47-экспрессирующей клетки.

Антитела к CD47 по данному изобретению не вызывают значительную или заметную деплецию или гемагглютинацию уровня эритроцитов и во многих случаях вообще не вызывают деплецию или гемагглютинацию эритроцитов.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения обеспечиваются выделенные биспецифические моноклональные антитела. Каждое из таких выделенных биспецифических моноклональных антител содержит первое плечо и второе плечо, при этом первое плечо содержит первое моноклональное ан-

титело или его иммунологически активный фрагмент, как показано выше, и второе плечо содержит второе моноклональное антитело, которое не связывается с CD47 человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения второе плечо в выделенных биспецифических моноклональных антителах связывается с раковой клеткой.

В еще одних вариантах осуществления изобретения биспецифические моноклональные антитела ингибируют взаимодействие CD47 человека с SIRP α человека.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения обеспечиваются фармацевтические композиции, каждая из которых содержит одно из антител к CD47 по данному изобретению или выделенное биспецифическое антитело по данному изобретению, а также фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент" в том виде, в котором он здесь используется, означает носитель или эксципиент, используемый для приготовления фармацевтической композиции или лекарственной формы, которая, как правило, безопасна, нетоксична и не является биологически или иным образом нежелательной. Обычно применяемый носитель или эксципиент предназначен для введения человеческим субъектам или другим млекопитающим. При изготовлении композиций активный ингредиент смешивают с носителем или эксципиентом, разбавляют носителем или эксципиентом или заключают в носитель или эксципиент. Если носитель или эксципиент служит в качестве разбавителя, он может быть твердым, полутвердым или жидким материалом, который действует в качестве носителя, наполнителя или среды для активного ингредиента антитела.

Объектом настоящего изобретения также является способ лечения заболевания у человеческого субъекта, который в этом нуждается, который включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела к CD47 по данному изобретению, биспецифического моноклонального антитела по данному изобретению или фармацевтической композиции по данному изобретению, и заболевание представляет собой рак, фиброзное заболевание или заболевание, связанное с ингибированием фагоцитоза. Например, онкологическое заболевание может выбираться из группы, включающей рак яичников, толстой кишки, груди, легких, головы и шеи, мочевого пузыря, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, неходжкинскую лимфому, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лейкоз ворсистых клеток (HCL), Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов, Т-клеточный лейкоз взрослых, множественную миелому, меланому, лейомиому, лейомиосаркому, глиому, глиобластому, миелому, моноцитарные лейкозы, лейкозы, происходящие из В-клеток, лейкозы, происходящие из Т-клеток, лимфомы, происходящие из В-клеток, лимфомы, происходящие из Т-клеток, рак эндометрия, почки, меланокарциному, рак простаты, щитовидной железы, шейки матки, желудка, печени и твердые опухоли; фиброзное заболевание выбирают из группы, включающей инфаркт миокарда, ангину, остеоартрит, фиброз легких, астму, муковисцидоз, бронхит и бронхиальную астму. Примеры твердых опухолей включают рак эндометрия, щитовидной железы, шейки матки, желудка, опухоли молочной железы, яичников, легких, поджелудочной железы, blastомы предстательной железы, опухоли в виде меланомы, колоректальные опухоли, опухоли головы и шеи, мочевого пузыря, опухоли, относящиеся к пищеводу, опухоли печени и почек, а также опухоли CNS, происходящие из нейроblastов. Заболевание, связанное с ингибированием фагоцитоза, может представлять собой заболевание сердечно-сосудистой системы (например, атеросклероз, инсульт, гипертензивную кардиопатию, ревмокардит, кардиомиопатию, аритмию сердца, врожденный порок сердца, порок клапана сердца, кардит, аневризму аорты, заболевание периферических артерий или венозный тромбоз).

Термин "эффективное количество" в том виде, в котором он здесь используется, означает количество антитела к CD47, достаточное или необходимое для эффективного лечения, прогнозирования или диагностики заболевания, связанного с CD47-зависимой передачей сигнала, как здесь показано, при введении субъекту. Терапевтически эффективные количества антител по данному изобретению, применяемые как отдельно, так и в сочетании между собой, могут различаться в зависимости от относительной активности антител (например, стимулирования опосредованного макрофагами фагоцитоза раковых клеток, экспрессирующих CD47) и от состояния заболевания субъекта, подлежащего лечению, веса и возраста субъекта, серьезности заболевания, способа введения и т.п., что легко определяется специалистом в данной области.

Термин "выделенный", предшествующий антителу к CD47 по данному изобретению, в том виде, в котором он здесь используется, означает, что указанное антитело по существу свободно от другого клеточного материала. В варианте осуществления изобретения выделенное антитело по существу свободно от других белков одного и того же вида. В еще одном варианте осуществления изобретения выделенное антитело экспрессируется клеткой разного вида и по существу свободно от других белков указанного разного вида. Белок может быть по существу свободным от естественно ассоциированных компонентов (либо компонентов, ассоциированных с клеточной экспрессионной системой, используемой для продуцирования антител) путем выделения, использования методов очистки белка, известных из уровня техники. В еще одном варианте осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению выделяются.

Объектом настоящего изобретения также являются слитые белки, каждый из которых содержит первую аминокислотную последовательность и вторую аминокислотную последовательность, причем первая аминокислотная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75 или SEQ ID NO: 77, либо аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 95%) идентична указанным последовательностям, и вторая аминокислотная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76 или SEQ ID NO: 78, либо аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 95%) идентична указанным последовательностям.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок по данному изобретению содержит комбинацию первой аминокислотной последовательности и второй аминокислотной последовательности, и такая комбинация этих двух аминокислотных последовательностей представляет собой SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 (т.е. 1A1), SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 (т.е. 1F8), SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 (т.е. 2A11), SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 (т.е. 2C2), SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 (т.е. 2D7), SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 (т.е. 2G4), SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14 (т.е. 2G11), SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16 (т.е. 6F4), SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 (т.е. 5H1), SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20 (т.е. 5F6), SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22 (т.е. 1F3), SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 (т.е. 2A4), SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26 (т.е. 2B12), SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28 (т.е. 13A11), SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 (т.е. 15E1), SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32 (т.е. 13H3), SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34 (т.е. 14A8), SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36 (т.е. 16H3), SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38 (т.е. 1A1), SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40 (т.е. 1A1-A), SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42 (т.е. 1A1-Q), SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44 (т.е. 1A2), SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46 (т.е. 1A8), SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48 (т.е. 1B1), SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 50 (т.е. 1B2), SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52 (т.е. 1H3), SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54 (т.е. 1H3-Q), SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56 (т.е. 1H3-A), SEQ ID NO: 57 и SEQ ID NO: 58 (т.е. 2A2), SEQ ID NO: 59 и SEQ ID NO: 60 (т.е. 2A3), SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62 (т.е. 2A6), SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 64 (т.е. 2A10), SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66 (т.е. 2B1), SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 68 (т.е. 2C6), SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70 (т.е. 2E7), SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72 (т.е. 2E9), SEQ ID NO: 73 и SEQ ID NO: 74 (т.е. 2F1), SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76 (т.е. 2F3) и SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78 (т.е. 34C5) либо комбинацию, которая по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 95%) идентична указанным последовательностям в отношении любой первой аминокислотной последовательности и любой второй аминокислотной последовательности.

Еще в некоторых вариантах осуществления слитый белок по данному изобретению содержит комбинацию первой аминокислотной последовательности и второй аминокислотной последовательности, и такая комбинация этих двух аминокислотных последовательностей представляет собой SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 (т.е. 1A1), SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 (т.е. 1F8), SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 (т.е. 2A11), SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 (т.е. 2C2), SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 (т.е. 2D7), SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 (т.е. 2G4), SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14 (т.е. 2G11), SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16 (т.е. 6F4), SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 (т.е. 5H1), SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20 (т.е. 5F6), SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22 (т.е. 1F3), SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 (т.е. 2A4), SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26 (т.е. 2B12), SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28 (т.е. 13A11), SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 (т.е. 15E1), SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32 (т.е. 13H3), SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34 (т.е. 14A8), SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36 (т.е. 16H3), SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38 (т.е. 1A1), SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40 (т.е. 1A1-A), SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42 (т.е. 1A1-Q), SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44 (т.е. 1A2), SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46 (т.е. 1A8), SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48 (т.е. 1B1), SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 50 (т.е. 1B2), SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52 (т.е. 1H3), SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54 (т.е. 1H3-Q), SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56 (т.е. 1H3-A), SEQ ID NO: 57 и SEQ ID NO: 58 (т.е. 2A2), SEQ ID NO: 59 и SEQ ID NO: 60 (т.е. 2A3), SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62 (т.е. 2A6), SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 64 (т.е. 2A10), SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66 (т.е. 2B1), SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 68 (т.е. 2C6), SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70 (т.е. 2E7), SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72 (т.е. 2E9), SEQ ID NO: 73 и SEQ ID NO: 74 (т.е. 2F1), SEQ ID NO: 75 и

SEQ ID NO: 76 (т.е. 2F3) и SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78 (т.е. 34C5).

В еще одних вариантах осуществления слитый белок по данному изобретению может также содержать дополнительный белок в дополнение к первой и второй аминокислотным последовательностям. Дополнительный белок представляет собой антитело или цитокин.

В еще других вариантах осуществления слитый белок по данному изобретению может быть конъюгирован с небольшой молекулой, которая является терапевтическим агентом (например, противоопухолевым или противовоспалительным агентом), либо маркером (например, биомаркером или флуоресцентным маркером).

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения обеспечиваются иммунодоминантные эпитопы, кодируемые геном CD47, которые содержат рекомбинантный белок, содержащий в конформационном состоянии петлевой участок TNMEAQ (остатки 26-31), T34, E35, L74 и LTR шарнирный участок (остатки 101-103) CD47.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения обеспечиваются биологические молекулы, которые специфически связываются с конформационным эпитопом, имеющим аминокислотную последовательность, содержащую петлевой участок TNMEAQ (остатки 26-31), T34, E35, L74 и LTR шарнирный участок (остатки 101-103) CD47, причем антитело способно специфически связываться с CD47.

Термин "биологические молекулы" в том виде, в котором он здесь используется, включает в себя синтетические антитела (моноклональные или биспецифические), пептиды, а также биомиметические молекулы. Термин "биомиметические молекулы" означает молекулы, сконструированные или разработанные таким образом, чтобы их строение или свойства были похожими или сходными со строением или свойствами естественно встречающихся крупных соединений, таких как белки или нуклеотиды, и молекулярная масса составляла бы, например, по меньшей мере 3000, по меньшей мере 5000 или по меньшей мере 10000.

Все перечисленные в настоящем документе ссылки включены здесь путем отсылки во всей их полноте.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - дозозависимый ответ на антитела к CD47, связанные с мономерным CD47-ECD.

Фиг. 2а и 2b - дозозависимый ответ на антитела к CD47, связанные с димерным CD47-ECD.

Фиг. 3а-3с - дозозависимый ответ на антитела к CD47, блокирующие связывание CD47 с SIRP α .

Фиг. 4а и 4b - дозозависимый ответ на антитела к CD47, связанные с CD47+клетками Раджи.

Фиг. 4с-4е - кинетика связывания и данные, касающиеся антител к CD47, полученные путем измерений с помощью анализа Biosoge.

Фиг. 5а и 5b - фагоцитоз опухолевых клеток МФ человека вместе с антителами к CD47.

Фиг. 6а-6с - макрофаг-опосредованный фагоцитоз различных клеточных линий из гемобластозов человека, вызванный антителами к CD47.

Фиг. 7а и 7b - исследование (RBC)-сберегающих свойств эритроцитов методом агглютинации RBC вместе с антителами к CD47.

Фиг. 8а-8d - активность связывания RBC и индуцирования агглютинации RBC с помощью CD-антител при разных и более высоких дозах.

Фиг. 9а-9d - RBC-связывающая активность антител к CD47.

Фиг. 10 - результаты агглютинации эритроцитов с использованием многочисленных образцов крови человека, индуцированной антителами к CD47.

Фиг. 11 - активность связывания тромбоцитов крови человека антителами к CD47 и сливанием SIRP α -Ig с CD61, окрашенным в качестве поверхностного маркера для тромбоцитов.

Фиг. 12 - результаты тестирования агглютинации эритроцитов яванской макаки, индуцированной *in vitro* антителами к CD47 и сливанием SIRP α -Ig.

Фиг. 13 - результаты тестирования фагоцитоза и связывания AML клеток антителами к CD47 и контроль.

Фиг. 14а и 14b - эффективность лечения антителами к CD47 и контроль на модели ксенотрансплантата у мышей клеток Раджи, содержащих люциферазу.

Фиг. 15 - поляризация макрофагов имеющих опухоль мышей, индуцированная антителами к CD47, и контроль.

Фиг. 16 - профили экспрессии CD47 с использованием образцов PDX разных видов рака у человека.

Фиг. 17 - результаты исследования безопасности лекарственного средства (гематология) на яванских макаках.

Фиг. 18 - завершение связывания CD47 антитела 1F8 с антителом 5F9, а также антитела 1F8 с антителом 2A1 вследствие разности их эпитопов и структура комплекса 5F9/CD47 и комплекса 1F8/CD47.

Фиг. 19а-19h - влияние 13H3-антитела к CD47 на агрегацию RBC, гемоглобин, тромбоциты и лимфоциты соответственно.

Фиг. 20 - сильная аффинность связывания 34C5 с рекомбинантным CD47-ECD.

Фиг. 21 - сильная аффинность связывания 34C5 к CD47-несущим клетками Раджи.

Фиг. 22 - свидетельство того, что 34C5 способно эффективно блокировать связывание CD47 с SIRP α с EC₅₀=0,30 nM.

Фиг. 23 - свидетельство того, что антитело 34C5 стимулировало фагоцитоз злокачественных клеток МФ человека.

Фиг. 24 - показано, что антитело 34C5 не вызывает *in vitro* RBC агглютинацию.

Фиг. 25 - показано, что связывание антитела 34C5 с RBC уменьшается, если уменьшается концентрация этого антитела.

Фиг. 26 - аминокислотные последовательности некоторых антител к CD47 по данному изобретению и их соответствующие нуклеотидные последовательности.

Фиг. 27 - аминокислотная последовательность для CD47 иммуноглобулин-подобного домена (Ig-V) 19-141.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает новые выделенные моноклональные антитела к CD47, которые способны предотвращать взаимодействие CD47 человека с SIRP α или стимулировать макрофаг-опосредованный фагоцитоз CD47-экспрессирующей клетки. Указанные антитела к CD47 не вызывают какое-либо значительное или заметное изменение уровня гемагглютинации или деплеции эритроцитов и во многих случаях вообще не вызывают гемагглютинацию или деплецию эритроцитов.

Как пример воплощения, антитела к CD47 по данному изобретению содержат (a) последовательность варибельной области тяжелой (VH) цепи, которая по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 95%) идентична аминокислотной последовательности, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77; и (b) последовательность варибельной области легкой (VL) цепи, которая по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 95%) идентична аминокислотной последовательности, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 78.

Еще в одном воплощении антитела к CD47 по данному изобретению содержат объединенную последовательность VH/VL цепей, которая по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 95%) идентична аминокислотной последовательности, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57 и SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 и SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73 и SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78.

Термин "антитело" используется здесь в самом широком смысле и конкретно охватывает моноклональные антитела (включая моноклональные антитела полной длины), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты таких антител при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность. "Антитела" (или "Abs") и "иммуноглобулины" (или "Igs") являются гликопротеинами, имеющими одинаковую структуру. Если антитела проявляют специфичность связывания с конкретным антигеном, то иммуноглобулины - это антитела и другие антителоподобные молекулы, которые не обладают антигенной специфичностью. Полипептиды последних производятся, например, в незначительном количестве лимфосистемой и в большом количестве - миеломами.

Термин "эпитоп" в том виде, в котором он здесь используется, означает антигенную детерминанту

на поверхности антигена, с которым связывается паратоп антитела. Эпитопические детерминанты, как правило, содержат химически активные поверхностные группирования молекул, такие как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные характеристики, а также специфические зарядные характеристики.

Термин "нативные антитела и иммуноглобулины" в том виде, в котором он здесь используется, означает гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой около 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь соединяется с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью (также называемой "парой VH/VL"), причем количество дисульфидных связей является разным у тяжелых цепей разных иммуноглобулиновых изотипов. Каждая тяжелая и легкая цепь также содержит равномерно расположенные межцепочные дисульфидные мостики. На одном конце каждой тяжелой цепи имеется варибельный домен (VH), за которым следует несколько константных доменов. У каждой легкой цепи имеется варибельный домен (VL) на одном конце и константный домен на другом ее конце; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, и варибельный домен легкой цепи выровнен с варибельным доменом тяжелой цепи. Предполагается, что конкретные аминокислотные остатки образуют интерфейс (границу раздела) между варибельными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. См., например, Clothia et al., *J. Mol. Biol.*, 186:651 (1985); Novotny and Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:4592 (1985).

Термин "варибельный" в том виде, в котором он здесь используется, означает, что некоторые части варибельных доменов у антител сильно отличаются по последовательности и используются при связывании и определении специфичности каждого конкретного антитела для его конкретного антигена. Однако варибельность не распределена равномерно по варибельным доменам антител. Она сконцентрирована в трех сегментах, называемых областями, определяющими комплементарность (CDR), или гиперварибельными областями варибельных доменов как легкой, так и тяжелой цепей. Более высококонсервативные части варибельных доменов называют каркасом (FR). Каждый варибельный домен тяжелой цепи и легкой цепи состоит из четырех FR областей, преимущественно принимающих конфигурацию в форме В-складки, соединенных тремя CDR, которые образуют петлевые участки, соединяющие В-складчатую структуру и в некоторых случаях образующие часть В-складчатой структуры. CDR в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью FR областей, и CDR из другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител. См., например, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991). Константные домены напрямую не вовлечены в связывание антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, например участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности. Последовательности варибельных участков интереса содержат предложенные последовательности гуманизованных варибельных участков для антител к CD47. Например, 1A1 содержит SEQ ID NO: 1 (тяжелая цепь) и SEQ ID NO: 2 (легкая цепь), 1F8 содержит SEQ ID NO: 3 (тяжелая цепь) и SEQ ID NO: 4 (легкая цепь), и 2A11 содержит SEQ ID NO: 5 (тяжелая цепь) и SEQ ID NO: 6 (легкая цепь).

При расщеплении антител папаином образуются два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, именуемые "Fab" фрагментами, каждый из которых имеет один антигенсвязывающий сайт, и остаточный фрагмент "Fc", чье название отражает его способность легко кристаллизоваться. При обработке пепсином образуется F(ab)₂ фрагмент, который имеет два антигенкомбинирующих сайта и все еще способен к поперечному связыванию антигена. "Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, содержащий целый сайт узнавания и связывания антигена. В двухцепочечном Fv фрагменте этот участок состоит из димера одной тяжелой цепи и одной легкой цепи в варибельном участке, тесно соединенных между собой нековалентной связью. В одноцепочечном Fv фрагменте (scFv) одна тяжелая цепь и одна легкая цепь в варибельном домене могут ковалентно соединяться гибким пептидным линкером так, что легкая и тяжелая цепи способны образовывать "димерную" структуру, аналогичную димерной структуре в двухцепочечном Fv фрагменте. Именно в такой конфигурации указанные три CDR каждого варибельного домена взаимодействуют между собой для определения антигенсвязывающего сайта на поверхности димера VH-VL. В совокупности эти шесть CDR придают антителу антигенсвязывающую специфичность. Однако даже один варибельный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичные в отношении антигена) обладает способностью узнавать и связывать антиген, хотя и при более низкой аффинности по сравнению с целым связывающим сайтом. См., например, Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, p. 269-315 (1994).

Fab-фрагмент также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков на карбоксильном конце домена CH1, включая один или несколько цистеинов их шарнирного участка антитела. Fab'-SH обозначает здесь Fab', в котором цистеиновый остаток (остатки) константных доменов несет три свободные тиольные группы. Фрагменты F(ab')₂ антитела изначально были образованы в виде пар Fab'-фрагментов, которые имеют цистеины шарнирного участка между ними. Известны также другие химические соединения фрагментов антитела.

Имеется пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2. Константные домены тяжелой цепи, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, называются α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации иммуноглобулинов хорошо известны.

Термин "фрагмент антитела" и все его грамматические варианты в том виде, в котором они здесь используются, означают часть интактного антитела, которая содержит антигенсвязывающий сайт или переменный участок интактного антитела, причем эта часть свободна от константных доменов тяжелой цепи (т.е. CH2, CH3 и CH4, в зависимости от изотипа антитела) участка Fc интактного антитела. Примеры фрагментов антитела включают Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ и Fv фрагменты; диатела; любой фрагмент антитела, представляющий собой полипептид, который имеет первичную структуру, состоящую из одной непрерывной последовательности заменимых аминокислотных остатков (именуемых здесь "одноцепочечный фрагмент антитела" или "одноцепочечный полипептид"), включая, но не ограничиваясь этим, (1) одноцепочечные Fv (scFv) молекулы; (2) одноцепочечные полипептиды, содержащие только один переменный домен легкой цепи, либо их фрагмент, содержащий три CDR переменного домена легкой цепи без соединения с компонентами тяжелой цепи; а также (3) одноцепочечные полипептиды, содержащие только один переменный участок тяжелой цепи, либо их фрагмент, содержащий три CDR переменного участка тяжелой цепи без соединения с компонентами легкой цепи; и мультиспецифические или мультивалентные структуры, образованные из фрагментов антител. Во фрагменте антитела, состоящем из одной или нескольких тяжелых цепей, тяжелая цепь (цепи) может содержать любую последовательность константного домена (например, CH1 в IgG изоформе), обнаруживаемую вне Fc участка интактного антитела, и/или любую последовательность шарнирного участка, обнаруживаемую в интактном антителе, и/или последовательность лейциновой "молнии", слитую с или расположенную в последовательности шарнирного участка или последовательности константного домена тяжелой цепи (цепей).

Если специально не указано иное, используемый здесь термин "конъюгат" означает гетерогенную молекулу, образованную ковалентным присоединением одного или нескольких фрагментов антитела к одной или нескольким полимерным молекулам, причем гетерогенная молекула является водорастворимой молекулой, т.е. растворимой в физиологических жидкостях, таких как кровь, и свободной от любых структурных агрегатов. Конъюгат интереса представляет собой полиэтиленгликоль (PEG). В контексте предыдущего определения термин "структурный агрегат" означает (1) любой агрегат молекул в водном растворе, имеющий шаровидную структуру или шаровидную структуру оболочечного типа, при этом гетерогенная молекула не имеет мицеллярную или иную эмульсионную структуру и не "заякорена" в липидный бислой, везикулу или липосому; и (2) любой агрегат молекул в твердой или инсолубилизированной форме, такой как матрица для хроматографии с использованием микроносителей, который в контакте с водной средой не высвобождает гетерогенную молекулу в раствор. Соответственно, термин "конъюгат" в том виде, в котором он здесь определяется, охватывает вышеупомянутые гетерогенные молекулы, проявляющиеся в виде преципитата, осадка, биоразрушаемой матрицы или другого твердого образования, способных высвобождать гетерогенные молекулы в водный раствор при гидратации твердого вещества.

Термин "моноклональное антитело" (mAb) в том виде, в котором он здесь используется, означает антитело, полученное из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела высокоспецифичны и направлены против одного антигенного сайта. Каждое mAb направлено против одной детерминанты на антигене. Помимо специфичности, моноклональные антитела имеют то преимущество, что они могут синтезироваться культурой гибридом, не контаминированной другими иммуноглобулинами. Модификатор "моноклональное" указывает характер антитела, как получаемого по существу из гомогенной популяции антител, и его не следует понимать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, подлежащие использованию согласно данному изобретению, могут быть получены с использованием иммортализованной В клетки и ее гибридомы, а также на основе рекомбинантной ДНК.

Моноклональные антитела по данному изобретению включают гибридные и рекомбинантные антитела, полученные путем сплайсинга переменного (включая гиперпеременный) домена антитела к CD47 с константным доменом (например, "гуманизированные" антитела), либо легкой цепи с тяжелой цепью, либо цепи из одного вида с цепью из другого вида, либо слияний с гетерологичными белками, независимо от исходного вида или класса или подкласса иммуноглобулина, а также фрагменты таких антител (например, Fab, F(ab')₂ и Fv), если они проявляют желаемую биологическую активность.

Моноклональные антитела по данному изобретению, в частности, включают "химерные" антитела (иммуноглобулины), у которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител, полученным из конкретных видов, или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи (цепей) идентична или гомоло-

гична соответствующим последовательностям антител, полученным из другого вида, или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, если они проявляют желаемую биологическую активность.

Термин "выделенное" антитело в том виде, в котором он здесь используется, означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или изолировано из компонента естественной среды антитела. Загрязняющие компоненты естественной среды являются материалами, которые препятствуют диагностическому или терапевтическому применению антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В некоторых вариантах осуществления антитело должно быть очищено (1) до степени, превышающей 75 вес.% антитела, определяемого по методу Лоури, и более предпочтительно до степени, превышающей 80, 90 или 99 вес.%; либо (2) до гомогенности, по данным анализа SDS-PAGE, в восстановительных или невосстановительных условиях, с использованием красителя Кумаси синего или предпочтительно серебряного красителя. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент естественной среды антитела не будет присутствовать. Однако обычно для выделения антитела проводят по меньшей мере одну стадию очистки.

Термин "меченый эпитоп" в том виде, в котором он здесь используется, означает антитело к CD47, соединенное с "меткой эпитопа". Полипептид метки эпитопа содержит достаточно остатков, чтобы обеспечивать эпитоп, против которого может быть получено антитело, однако является достаточно коротким и не мешает активности антитела к CD47. Метка эпитопа предпочтительно является достаточно уникальной, так чтобы антитело, специфичное к эпитопу, по существу не могло перекрестно реагировать с другими эпитопами. Подходящие полипептиды-метки, как правило, содержат по меньшей мере 6 аминокислотных остатков и обычно от 8 до 50 аминокислотных остатков (предпочтительно от 9 до 30 остатков). Примеры включают метку с-тус и антитела к ней - 8F9, 3C7, 6E10<G4, B7 и 9E10 (см., например, Evan et al, Mol. Cell. Biol., 5(12):3610-3616 (1985)) и метку, представляющую собой гликопротеин D (gD) вируса простого герпеса и антитело к ней (см., например, Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)).

Термин "метка" в том виде, в котором он здесь используется, означает детектируемое соединение или состав, который напрямую или косвенно конъюгируется с антителом. Метка может быть сама по себе детектируемой (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или, в случае ферментативной метки, может катализировать химическое изменение субстрата или состава, которые детектируются.

Термин "твердая фаза" в том виде, в котором он здесь используется, означает неводную матрицу, к которой может прикрепляться антитело по данному изобретению. Примеры твердых фаз, охватываемых настоящим изобретением, включают фазы, образованные частично или полностью из стекла (например, стекла с контролируемым размером пор), полисахаридов (например, агарозы), полиакриламидов, полистирола, поливинилового спирта и силиконов. В определенных вариантах осуществления, в зависимости от контекста, твердая фаза может содержать лунку планшета; в других она представляет собой колонку для очистки (например, колонку для аффинной хроматографии). Данный термин также включает непрерывную твердую фазу дискретных частиц. См., например, патент США № 4275149.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанные антитела к CD47, и способам лечения заболеваний у субъекта этими антителами к CD47 и фармацевтическими композициями.

Термин "лечение" или "терапия" в том виде, в котором он здесь используется, означает терапевтическое лечение заболевания и профилактические или превентивные меры по предупреждению заболевания (такого как рак или фиброзное заболевание). К числу лиц, нуждающихся в лечении, относятся лица с существующим заболеванием, а также лица, нуждающиеся в предотвращении заболевания.

Примеры рака включают, но не ограничиваются этим, рак яичников, толстой кишки, груди, легких, головы и шеи, мочевого пузыря, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, неходжкинскую лимфому, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, множественную миелому, меланому, лейомиому, лейомиосаркому, глиому, глиобластому, миеломы, моноцитарные лейкозы, лейкозы, происходящие из В-клеток, лейкозы, происходящие из Т-клеток, лимфомы, происходящие из В-клеток, лимфомы, происходящие из Т-клеток, рак эндометрия, почки, меланосаркому, рак простаты, щитовидной железы, шейки матки, желудка, печени и твердые опухоли. Фиброзное заболевание может представлять собой инфаркт миокарда, ангину, остеоартрит, фиброз легких, астму, муковисцидоз, бронхит и бронхиальную астму.

Термин "субъект" для целей лечения в том виде, в котором он здесь используется, означает любое животное, классифицируемое как млекопитающее, включая человека, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных, содержащихся в зоопарке, спортивных или домашних животных, таких как собаки, лошади, кошки, коровы и т.п. Предпочтительно млекопитающее представляет собой человека.

Антитела к CD47 по данному изобретению могут также применяться *in vitro* и *in vivo* для мониторинга хода проводимой терапии заболевания с помощью CD47. Так, например, измерение увеличения

или уменьшения количества клеток, экспрессирующих CD47, в частности раковых клеток, экспрессирующих CD47, позволяет определять, является ли действие конкретного терапевтического режима, направленного на улучшение самочувствия, эффективным.

Антитела к CD47 по данному изобретению могут также использоваться *in vitro* для проведения иммунологических исследований, где они могут быть в жидкой фазе или связанными с носителем твердой фазы. Кроме того, антитела к CD47 в проводимых иммунологических исследованиях могут помечаться разными метками для их детекции. Примеры видов иммунологических исследований, в которых можно использовать моноклональные антитела по данному изобретению, включают проточную цитометрию, например FACS, MACS, иммуногистохимию, конкурентные и неконкурентные методы иммунологических исследований в прямом или косвенном формате. Детекцию антигенов с использованием антител к CD47 по данному изобретению можно проводить, применяя иммунологические исследования прямого, обратного и одновременного определения, включая иммуногистохимические исследования на физиологических образцах. Специалисты в данной области могут отметить другие форматы иммунологических исследований и смогут легко установить это без ненужного экспериментирования.

Антитела к CD47 по данному изобретению могут быть связаны со многими различными носителями и использованы для детекции присутствия CD47-экспрессирующих клеток. Примеры хорошо известных носителей включают стекло, полистирол, полипропилен, полиэтилен, декстран, нейлон, амилазы, природные и модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, агарозы и магнетит. Для целей настоящего изобретения носители могут быть растворимыми или нерастворимыми. Специалисты в данной области могут отметить другие подходящие носители для связывания моноклональных антител и смогут установить это с использованием обычного экспериментирования.

Специалистам с обычной квалификацией в данной области известны многие разные метки, а также способы мечения, которые находят применение в качестве индикаторов при реализации терапевтических методов, используются в диагностических методах и т.п. Для диагностических целей метка может быть ковалентно или нековалентно присоединена к антителу по данному изобретению или его фрагменту, включая фрагменты, содержащие или состоящие из последовательностей CDR. Примеры типов меток, которые могут использоваться в настоящем изобретении, включают ферменты, радиоизотопы, флуоресцентные соединения, коллоидные металлы, хемилюминесцентные соединения, а также биолюминесцентные соединения. Специалисты в данной области могут отметить другие подходящие метки для связывания с моноклональными антителами по данному изобретению и смогут установить это с использованием обычного экспериментирования. Более того, связывание указанных меток с моноклональными антителами по данному изобретению может осуществляться с использованием стандартных методик, известных специалистам в данной области.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD47 по данному изобретению присоединяется к наночастице, например, для применения в исследовании с визуализацией. Полезные наночастицы, известные из уровня техники, например, включают, но не ограничиваются этим, Раман-кремниевые-золотые наночастицы (R-Si-Au-NP). R-Si-Au-NP состоят из рамановской органической молекулы с узкополосной сигнатурой спектра, адсорбированной на поверхности ядра из золота. Поскольку рамановская органическая молекула может изменяться, каждая из наночастиц может нести свою собственную сигнатуру, позволяя, тем самым, многочисленным наночастицам одновременно и независимо друг от друга детектироваться путем мультиплексирования. Целая наночастица заключается в кремниевую оболочку, поддерживающую рамановскую органическую молекулу на поверхности наноядра из золота. Как вариант, полиэтиленгликолизация (PEG) наночастиц R-Si-Au-NP может увеличивать их биодоступность и обеспечивать функциональные "держатели" для присоединения целевых веществ. См., например, Thakor et al., (2011), *Sci. Transl. Med.*, (79):79ra33; Jokerst et al., (2011), *Small*, 7(5):625-33; Gao et al., (2011), *Biomaterials*, 32(8):2141-8.

Для целей изобретения CD47 можно детектировать посредством антител к CD47 по данному изобретению, если они находятся в биологических жидкостях и тканях, *in vivo* и *in vitro*. Может быть использован любой образец, содержащий детектируемое количество CD47. Образец может быть жидким, таким как моча, слюна, спинномозговая жидкость, кровь, сыворотка крови и т.п., твердым или полутвердым, таким как ткани, кал и т.п., либо, как вариант, твердой тканью, такой как те, что обычно используются в гистологической диагностике.

Еще одним методом мечения, который может приводить к более высокой чувствительности, является связывание антител с низкомолекулярными гаптенами. Указанные гаптены могут затем специфически детектироваться посредством побочной реакции. Например, является обычным использование гаптенных, например биотина, который связывается с авидином, либо динитрофенолом, пиридоксалем, либо флуоресцеином, способных связываться со специфическими антигаптеновыми антителами.

Для удобства использования антитело к CD47 по данному изобретению может обеспечиваться в виде набора, т.е. упакованной комбинации реагентов в дозированных количествах с инструкцией по проведению диагностических исследований. Если антитело будет помечено ферментом, набор будет включать субстраты и кофакторы, необходимые для фермента (например, субстрат-предшественник, обеспечивающий детектируемый хромофор или флуорофор). Кроме того, в набор могут входить другие вспомога-

тельные компоненты, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или лизисный буфер) т.п. Относительные количества различных реагентов могут существенно отличаться, чтобы обеспечивать концентрации в растворе реагентов, существенным образом оптимизирующие чувствительность исследований. В частности, реагенты могут быть в виде сухих порошков, обычно лиофилизированных, которые при растворении будут давать раствор реагентов соответствующей концентрации.

Лекарственные препараты, содержащие одно или несколько антител по данному изобретению, готовятся для хранения путем смешивания антител, которые имеют желаемый уровень очистки, с вариантами физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) в виде лиофилизированных форм или водных растворов. Композиция антитела формируется, дозируется и вводится так, чтобы соответствовать надлежащей медицинской практике. Факторы, которые следует учитывать в этом контексте, включают конкретное заболевание, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние конкретного пациента, причину заболевания, место введения препарата, способ введения препарата, схему введения препарата, а также другие факторы, известные практикующим медицинским работникам. "Терапевтически эффективное количество" антитела, подлежащее введению, должно учитывать указанные соображения и быть минимальным количеством, необходимым для предотвращения заболевания, связанного с CD47.

Терапевтическая доза может составлять по меньшей мере около 0,01 мкг/кг веса тела, по меньшей мере около 0,05 (μg/kg) веса тела, по меньшей мере около 0,1 мкг/кг веса тела, по меньшей мере около 0,5 мкг/кг веса тела, по меньшей мере около 1 мкг/кг веса тела, по меньшей мере около 2,5 мкг/кг веса тела, по меньшей мере около 5 мкг/кг веса тела и не более по меньшей мере около 100 мкг/кг веса тела. Специалисту в данной области понятно, что указанные рекомендации должны быть скорректированы в зависимости от молекулярной массы активного вещества, например, при использовании фрагментов антител или конъюгатов антител. Дозировка может изменяться в зависимости от локального введения препарата, например интраназальное введение, ингаляционное введение и т.п., либо от системного введения, например внутривенное (I.V.), внутримышечное (I.M.) введение и т.п.

Антитело к CD47 по данному изобретению нет необходимости формировать, но как вариант формируется с одним или несколькими веществами, которые стимулируют действие или которые иным образом усиливают терапевтический эффект. Указанные вещества обычно применяются в тех же дозировках и теми же способами, как отмечено здесь выше, либо составляют от 1 до 99% применяемых доз, отмеченных выше.

Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы не являются токсичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и содержащие другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (например, октадецил диметил бензил хлорид аммония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; бутиловый или бензиловый спирт; алкиловые парабыны, такие как метил- или пропилапарабен; катехол; резорцинол; циклогексанола; 3-пентанол; и м-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (менее 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин, либо иммуноглобулины; аминокислоты, такие как глицин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие карбогидраты, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелирующие вещества, например, EDTA; сахара, такие как цукроза, маннитол, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, например натрий; металлокомплексы (например, комплексы белков с Zn); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, например TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG). Препараты, подлежащие применению для *in vivo* введения, должны быть стерильными. Это легко достигается фильтрацией с использованием стерильных фильтрационных мембран.

Активные ингредиенты, содержащие антитела к CD47, могут также быть заключены в микрокапсулы, полученные методами коацервации или полимеризации на границе раздела фаз, например микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы на основе поли(метилметакрилата) соответственно, в коллоидные системы для доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и наночапсулы) или в макроэмульсии. Указанные методы раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1986).

Антитело к CD47 или фармацевтическую композицию по данному изобретению можно вводить любым подходящим способом, включая парентеральный, подкожный, интраперитонеальный, внутривенный и интраназальный. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, интраартериальное, внутривенное или подкожное введение. Подходящим способом введения анти-CD47 антитела является импульсная инфузия, особенно с уменьшением доз антитела.

Для профилактики или лечения заболевания соответствующая дозировка антитела зависит от типа заболевания, подлежащего лечению, как отмечено выше, остроты протекания заболевания; если антитело вводится для профилактических целей, его дозировка зависит от предыдущей терапии, клинической истории болезни пациента и реакции пациента на антитело, а также усмотрения лечащего врача. Подходя-

шим способом антитело вводят пациенту один раз или в течение нескольких курсов лечения.

В еще одном варианте осуществления изобретения обеспечивается готовое изделие, содержащее материалы, полезные для лечения недомоганий, описанных выше. Готовое изделие содержит контейнер и этикетку. Подходящие контейнеры включают, например, флаконы, ампулы, шприцы и аналитические пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, например стекла или пластмассы. Контейнер содержит композицию, которая является эффективной для лечения заболевания, и может иметь выход со стерильным доступом (например, контейнер может быть пакетом для внутривенного вливания или флаконом, имеющим пробку, прокалываемую иглой для подкожных инъекций). Активный агент в композиции представляет собой анти-CD47-антитело. Этикетка на контейнере или связанная с контейнером указывает на то, что композиция применяется для лечения выбранного заболевания. Готовое изделие может дополнительно включать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как забуференный фосфатом раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он может дополнительно включать другие материалы, желатинные с коммерческой и потребительской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и листки-вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

Следующие примеры приведены с тем, чтобы обеспечить специалистов в данной области полным раскрытием и описанием того, как осуществить и использовать настоящее изобретение, и не предназначены ограничивать объем того, что авторы изобретения считают своим изобретением, либо создавать представление о том, что нижеследующие эксперименты представляют собой все или единственные эксперименты, которые были проведены. Были предприняты усилия, чтобы обеспечить точность в отношении использованных чисел (например, количества, температура и т.п.), но некоторые экспериментальные ошибки или отклонения должны быть приняты в расчет. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура дается в градусах Цельсия, и давление является равным или близким к атмосферному.

Все публикации и патентные заявки, процитированные в настоящем описании, включены здесь посредством ссылки в той степени, как если бы каждая индивидуальная публикация или патентная заявка была прямо и по отдельности включена в данное описание путем ссылки.

Конкретные варианты осуществления, что раскрыты в настоящем изобретении, представляют варианты, разработанные или предложенные авторами изобретения и являющиеся предпочтительными вариантами при практическом осуществлении изобретения. Специалисты в данной области, в свете настоящего раскрытия, должны понимать, что в конкретных вариантах осуществления, которые раскрыты, можно делать много модификаций и изменений, не отклоняясь от цели и объема изобретения. Например, вследствие избыточности кодонов изменения могут быть внесены в исходную последовательность ДНК без оказания отрицательного воздействия на последовательность белков. Более того, исходя из соображений биологической функциональной эквивалентности, изменения могут быть внесены в структуру белка без оказания отрицательного воздействия на биологическое действие в отношении характера либо количества. Все такие изменения должны включаться в рамках объема прилагаемой формулы изобретения.

Создание фаговой библиотеки.

CD47 представляет собой мембранный рецептор массой 50 кДа, имеющий внеклеточный N-концевой IgV домен, пять трансмембранных доменов и короткий внутриклеточный C-концевой хвост. В качестве антитела для пэннинга фаговой библиотеки использовали белок домена человеческого CD47-IgV, конъюгированный с человеческим Fc или биотинилированным белком домена человеческого CD47-IgV (ACROBiosystems).

Фаговую библиотеку конструировали с использованием фагмидных векторов, содержащих фрагменты генов антител, которые были амплифицированы из селезенки или костного мозга >50 здоровых человеческих субъектов. Формат антитела представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (VH + линкер + VL). Размер библиотеки составил 1.1×10^{10} . Разнообразие последовательностей анализировали следующим образом. В отношении 62 клонов, взятых из библиотеки и затем секвенированных, 16 последовательностей имели усечения, сдвиг рамки считывания и кодоны-терминаторы; 46 последовательностей имели scFv полной длины, у которых все HCDR3 последовательности были уникальны. У 46 scFv полной длины 13 последовательностей имели легкую цепь типа лямбда и 33 последовательности имели легкую цепь типа каппа.

Фаговый пэннинг и отбор клонов.

Для получения фаговых клонов, специфически связывающихся с доменом человеческого CD47-IgV, были применены два метода фагового пэннинга.

1. Пэннинг в иммунной пробирке фаговой библиотеки против человеческого CD47-IgV.

Согласно данному методу фаговые библиотеки, сконструированные, как показано выше, сначала инкубировали в покрытой казеином иммунной пробирке в течение 2 ч. Для первого цикла пэннинга использовали слитый белок CD47-IgV-Fc человека. Несвязанные фаги удаляли 5-20-кратными промывками в PBST. Связанные фаги элюировали 100 мМ свежеприготовленного раствора триэтиламина и нейтрализовали добавлением Трис-хлор буфера с получением первого фагового пула. Данный первый фаговый

пул "спасали" посредством инфицирования клетками TG-1 E. coli и амплифицировали, после чего следовал второй цикл пэннинга с использованием биотинилированного CD47-IgV человека в качестве антигена. Связанные фаги элюировали, как показано выше, с получением второго фагового пула, который затем "спасали", после чего следовал третий цикл пэннинга с использованием слитого белка CD47-IgV-Fc человека в качестве антигена. Связанные фаги становились, таким образом, третьим фаговым пулом и претерпевали четвертый цикл пэннинга с использованием биотинилированного CD47-IgV человека.

2. Пэннинг в растворе фаговой библиотеки против человеческого CD47-IgV.

Согласно данному методу фаговые библиотеки сначала инкубировали на заблокированных казеином 100 мкл магнитных микроносителях, покрытых стрептавидином, с целью деплеции связывающих веществ, покрытых стрептавидином микроносителей. Магнитные микроносители, покрытые стрептавидином, и AG0084-hulgG1/k использовали для негативной деплеции. Деплетированную библиотеку "спасали", после чего следовал второй цикл пэннинга с использованием биотинилированного CD47-IgV человека в качестве антигенов, и подвергали негативной деплеции заблокированными казеином магнитными микроносителями, покрытыми стрептавидином. Несвязанные фаги удаляли 5-20-кратными промывками в PBST. Связанные фаги элюировали 100 mM свежеприготовленного раствора триэтиламина, нейтрализовали добавлением Трис-хлор буфера и затем "спасали", после чего следовал третий цикл пэннинга с использованием гибридного белка CD47-IgV-Fc человека, и деплетировали с помощью AG0084-hulgG1/k. Связанные фаги становились, таким образом, третьим фаговым пулом и претерпевали четвертый цикл пэннинга с использованием биотинилированного CD47-IgV человека и негативной деплеции заблокированными казеином магнитными микроносителями, покрытыми стрептавидином.

После этого получали и обогащали многочисленные клоны, специфически связанные с доменом человеческого CD47-IgV. Затем их разбавляли, помещали в планшет, растили при 37°C в течение 8 ч и улавливали фильтром, покрытым антителом типа анти-каппа, в течение ночи. Биотинилированный CD47-IgV человека (50 nM) и конъюгат NeutrAvidin-AP (разбавление 1:1000) наносили на фильтр для детекции позитивно связанных фаговых клонов. Позитивные фаговые бляшки собирали и элюировали 100 мкл элюирующего буфера. Около 10-15 мкл элюированных фагов использовали для инфицирования 1 мл клеток HL1-Blue, чтобы получить фаг с высоким титром (НТ) для анализа фагов ELISA по одной точке (SPE). Одиночные позитивные клоны, собранные путем прямого переноса с фильтра, подвергали связыванию со слитым белком CD47-IgV-Fc человека и биотинилированным белком домена человеческого CD47-IgV. Указанные одиночные позитивные клоны также секвенировали для составления их VH и VL генов. Все позитивные "хиты" с уникальными VH и VL генами клонировали в экспрессионные векторы pFUSE2ss-CLlg-hk (легкая цепь, InvivoGen, № регистрации pfuse2ss-hclck) и pFUSEss-CHlg-hG1 (тяжелая цепь, Inivo Gen, № регистрации pfusess-hchg1). Антитела экспрессировали в клетках HEK293 и очистку проводили на протеин А-агарозе.

Аффинное созревание антител к CD47.

Аффинность связывания антител к CD47 по данному изобретению улучшалась путем *in vitro* созревания аффинности, например путем сайт-специфической случайной мутации, результатом которой стали мутировавшие последовательности, также являющиеся объектом настоящего изобретения.

Например, BioCore анализ 1F8, антитела к CD47 по данному изобретению, показал аффинность связывания (KD), равную 2,8 nM с высоким уровнем диссоциации 1,04E-03 л/с, что можно было улучшить путем *in vitro* созревания аффинности. Всесторонний анализ последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи 1F8 позволил идентифицировать несколько остатков в участках HCDR1 и LCDR1, которые могли случайно мутировать. Таким образом, библиотеки случайного мутагенеза можно конструировать и вводить в конкретные остатки для генерирования множества новых последовательностей. Библиотеки CDR мутагенеза подвергают пэннингу в растворе с использованием биотинилированного растворимого CD47 ECD в условиях равновесного состояния. После многочисленных циклов пэннинга при пониженной концентрации антигена обогащенные связывающие вещества отбирают для проведения ELISA-теста связывания и последующего преобразования в полные IgG, которые подвергают BioCore анализу в целях отбора определенной последовательности с улучшенной скоростью диссоциации. Посредством такого скрининга можно конструировать молекулы антител по данному изобретению для оптимального клинического использования.

Пример 1. ELISA скрининг фаговых клонов, связанных с рекомбинантным белком CD47-ECD.

Раствором 2 мкг/мл рекомбинантного слитого белка CD47-Fc человека (Acrobiosystems) в фосфатно-солевом буфере (PBS) покрывали титрационные микропланшеты при комнатной температуре (RT) в течение 2 ч. После покрытия антигена лунки планшета блокировали с 1% BSA-PBS/0,05% Tween (PBST) при комнатной температуре (RT) в течение 1 ч, очищенные фаги одиночных клонов добавляли в лунки и инкубировали при RT в течение 1 ч. Для детекции клонов, связывающих фаги, добавляли вторичные антитела к M13 (Jackson Immuno Research), конъюгированные с HRP, с последующим добавлением флуоресцентных субстратов (Roche). Между всеми стадиями инкубации лунки планшета три раза промывали PBST. Флуоресценцию измеряли с помощью планшетного ридера TECAN Spectrafluor. Отбирали позитивные фаговые клоны для секвенирования генов тяжелой цепи и легкой цепи.

Все протестированные антитела к CD47 по данному изобретению демонстрировали хорошую свя-

зывающую способность в отношении слитого белка CD47-Fc человека.

Пример 2. ELISA анализ антител, блокирующих взаимодействие CD47 с SIRP α .

Раствором 1 мкг/мл рекомбинантного слитого белка, содержащего CD47 человека и Fc мыши, в PBS покрывали титрационные микропланшеты при RT в течение 2 ч. После покрытия антигена лунки блокировали с 1% BSA-PBS/0,05% Tween (PBST) при RT в течение 1 ч. После промывки лунок PBST антитела, разбавленные в PBS, добавляли в лунки (5 мкг/мл) и инкубировали 1 ч при RT. Для детекции связывающих антител добавляли HRP, конъюгированную с вторичными антителами к Fc человека (Jackson Immuno Research), с последующим добавлением флуорогенных субстратов (Roche). Между всеми стадиями инкубации лунки планшета три раза промывали PBST. Флуоресценцию измеряли с помощью планшетного ридера TECAN Spectrafluor.

Все протестированные антитела к CD47 по данному изобретению демонстрировали хорошую связывающую способность в отношении слитого белка CD47-Fc человека и биотинилированного белка CD47.

Пример 3. ELISA анализ антител, блокирующих взаимодействие CD47 с SIRP α .

Раствором 1 мкг/мл рекомбинантного слитого белка CD47-Fc (Acrobiosystems) в PBS покрывали титрационные микропланшеты при 4°C в течение 16 ч. После блокировки с 1% BSA в PBST при RT в течение 1 ч добавляли 1 мкг/мл белка SIRP α -His при отсутствии или в присутствии антител к CD47 (10 мкг/мл) при RT в течение 1 ч. Планшеты затем троекратно промывали и инкубировали с анти-His вторичным антителом, конъюгированным с HRP, 1 ч при RT. После отмывки добавляли раствор TMB на 30 мин и реакцию останавливали добавлением 2 M H₂SO₄, OD измеряли при 490 нм.

Все протестированные антитела к CD47 по данному изобретению эффективно блокировали связывание белка CD47 с SIRP α .

Пример 4. Дозозависимый ответ антител к CD47 на связывание с мономерным CD47-ECD.

После прямого связывания и конкурентного скрининга для данного теста отбирали 1F8 антитело к CD47 по данному изобретению сравнением с двумя существующими референсными антителами. Раствором 1 мкг/мл биотинилированного белка CD47 (Acrobiosystems) в PBS покрывали титрационные микропланшеты при RT в течение 2 ч. После покрытия антигена лунки блокировали с 1% BSA-PBS/0,05% Tween (PBST) при RT в течение 1 ч. После промывки лунок PBST в каждую лунку добавляли различные концентрации антител к CD47 и инкубировали 1 час при RT. Для детекции связывающих антител добавляли вторичные антитела к Fc человека (Jackson Immuno Research), конъюгированные HRP, с последующим добавлением флуорогенных субстратов (Roche). Между всеми стадиями инкубации лунки планшета три раза промывали PBST. Флуоресценцию измеряли с помощью планшетного ридера TECAN Spectrafluor.

Референсные антитела 5F9 и 2A1 получали согласно последовательностям Hu5F9 и CC-90002, которые были раскрыты исследователями Стэнфордского университета, Inhibrx LLC и Celgene Corp. (см., например, патенты США № 9017675 B2, 9382320, 922908, US Pat. Application Pub. No. 2014/0140989 и WO 2016/109415), и использовались для аналогичных исследований.

Как показано на фиг. 1, все три антитела (1F8, 5F9 и 2A1) демонстрировали одинаковую способность связывания с мономерным CD47-ECD.

Пример 5. Дозозависимый ответ антител к CD47 на связывание с димерным CD47-ECD.

Три антитела к CD47, которые использовались в Примере 4 (т.е. 1F8, 5F9 и 2A1), были также использованы в данном исследовании.

Раствором 1 мкг/мл слитого белка, содержащего CD47/Fc мыши, в PBS покрывали титрационные микропланшеты при RT в течение 2 ч. После покрытия антигена лунки блокировали с 1% BSA-PBS/0,05% Tween (PBST) при RT в течение 1 ч. После промывки лунок PBST в каждую лунку добавляли различные концентрации анти-CD47-антител и инкубировали 1 ч при RT. Для определения связывающих антител добавляли вторичные антитела к Fc человека (Jackson Immuno Research), конъюгированные HRP, с последующим добавлением флуорогенных субстратов (Roche). Между всеми стадиями инкубации лунки планшета три раза промывали PBST. Флуоресценцию измеряли с помощью планшетного ридера TECAN Spectrafluor.

Аналогичным образом, как показано на фиг. 2a, все три протестированных антитела (1F8, 5F9 и 2A1) демонстрировали одинаковую способность связывания с димерным CD47-ECD.

Было проведено еще одно исследование связывания, чтобы сравнить связывающую аффинность двух антител по данному изобретению, т.е. 1F8 и 13H3, с рекомбинантным CD47-ECD. Как показано на фиг. 2b, указанные два антитела также демонстрировали одинаковую дозозависимую способность связывания при EC₅₀, равной 0,038 нм для 1F8 и 0,045 нм для 13H3.

Пример 6. Дозозависимый ответ антител к CD47 на блокирование связывания CD47 с SIRP α .

В данном исследовании также использовали три антитела к CD47 (т.е. 1F8, 5F9 и 2A1).

Раствором 1 мкг/мл рекомбинантного слитого белка CD47-Fc (Acrobiosystems) в PBS покрывали титрационные микропланшеты при 4°C в течение 16 ч. После блокировки с 1% BSA в PBST при RT в течение 1 ч добавляли 1 мкг/мл белка SIRP α -His при отсутствии или в присутствии различных концен-

траций анти-CD47-антител при RT в течение 1 ч. Планшеты затем троекратно промывали и инкубировали с анти-His вторичным антителом, конъюгированным HRP, 1 ч при RT. После отмывки в каждую лунку добавляли раствор TMB на 30 мин и реакцию останавливали добавлением 2 М H₂SO₄, OD измеряли при 490 нм.

Как показано на фиг. 3а, все три антитела демонстрировали одинаковую активность в блокировании связывания CD47 с SIRP α .

Было проведено еще одно исследование, чтобы сравнить способность двух антител к CD47 1F8 и 13H3 по данному изобретению блокировать связывание CD47 с SIRP α . Как показано на фиг. 3b и 3c, указанные два антитела также демонстрировали одинаковую дозозависимую способность блокирования при IC₅₀, равной 0,78 нМ для 1F8 и 0,20 нМ для 13H3.

Пример 7. Дозозависимый ответ антител к CD47 на связывание с CD47⁺ клетками Раджи.

В данном исследовании также использовали три антитела к CD47 (т.е. 1F8, 5F9 и 2A1).

Клетки Раджи, которые эндогенно экспрессируют на поверхности CD47 человека, окрашивали антителами 1F8, 5F9 и 2A1 в различных концентрациях 30 мин при 4°C. После этого клетки троекратно промывали PBS и инкубировали со специфическим анти-Fc-антителом человека (Invitrogen), меченным APC, 30 мин при 4°C. Связывание измеряли с помощью FACSCanto (Becton-Dickinson).

Как показано на фиг. 4а, все три антитела демонстрировали одинаковую дозозависимую способность связывания с CD47⁺ клетками Раджи.

Было проведено еще одно исследование, чтобы сравнить способность связывания двух антител к CD47 1F8 и 13H3 по данному изобретению с клетками Раджи, несущими CD47. Как показано на фиг. 4b, в отличие от 1F8 13H3 демонстрировало более сильную аффинность связывания клеток Раджи, несущих CD47, при EC₅₀, равной 2,95 нМ для 1F8 и 1,06 нМ для 13H3.

На фиг. 4c и 4d показана кинетика связывания 1F8 и 13H3 соответственно, измеренная на BioCore, и на фиг. 4e представлены соответствующие данные.

Пример 8. Исследование фагоцитоза опухолевых клеток макрофагами человека (МФ)/

В данном исследовании также использовали три антитела к CD47 (т.е. 1F8, 5F9 и 2A1).

PBMC выделяли из крови человека и макрофаги дифференцировали из моноцитов в течение 6 дней. Полученные из моноцитов макрофаги (MDM) соскребали, снова вносили в лунки 24-луночного планшета и оставляли склеиваться на 24 ч. Отбирали линию опухолевых клеток Раджи человека, эндогенно экспрессирующих CD47, в качестве клеток-мишеней и метили 1 (мкМ CFSE, затем прибавляли к MDM в соотношении 5:1 опухолевых клеток на фагоцит и добавляли различные дозы антител к CD47. После инкубации в течение 3 ч клетки-мишени, не ставшие объектом фагоцитоза, удаляли отмывкой PBS, а оставшиеся фагоциты соскребали, метили антителом к CD47 для макрофагового маркера и анализировали с помощью проточной цитометрии. Фагоцитоз измеряли путем гейтирования по CD47⁺ клеткам и затем оценивали процентное содержание CFSE⁺ клеток.

Как показано на фиг. 5а, все три протестированных антитела (т.е. 1F8, 5F9 и 2A1) демонстрировали одинаковую способность содействовать фагоцитозу опухолевых клеток МФ человека. На фиг. 6а-6с показан опосредованный макрофагами фагоцитоз трех разных линий клеток гемобластоза человека, вызванный тремя антителами к CD47.

Было проведено еще одно исследование, чтобы сравнить способность двух антител к CD47 1F8 и 13H3 по данному изобретению содействовать фагоцитозу опухолевых клеток МФ человека. Как показано на фиг. 5b, 13H3 и 1F8 демонстрировали одинаковую способность, хотя при определенных концентрациях антитело 13H3 демонстрировало более выраженную способность к фагоцитозу.

Пример 9. Анализ RBC-сберегающего действия посредством RBC агглютинации.

RBC человека разбавляли PBS до 10% и инкубировали 2 ч при 37°C с проведением титрования антител к CD47 в 96-луночном планшете с круглым дном. Свидетельством агглютинации являлось присутствие не осевших RBC, наблюдаемых в виде дымки, в отличие от прерывистой красной точки не агглютинированных RBC (см. фиг. 7а и 8а). Графы на фиг. 7b и 8b дают количественные показатели анализа агглютинации (именуемые "индексом агглютинации"), которые определяются по количеству RBC в осадке в присутствии антитела, нормализованные до такого количества в присутствии IgG контроля.

Как показано на фиг. 7а, 7b, 8а и 8b, хотя 5F9 антитело к CD47 демонстрировало значительный уровень RBC агглютинации уже при концентрации, равной или превышающей 0,1 мкг/мкл, антитела к CD47 1F8 и 2A1 по существу не демонстрировали RBC агглютинации при тестируемых концентрациях до 30 мкг/мкл (фиг. 7а и 7b) или даже до 150 мкг/мл (фиг. 8а и 8b).

На фиг. 8с и 8d показано, что антитела к CD47 по данному изобретению (т.е. 1F8 и 13H3) аналогичным образом по существу не демонстрировали RBC агглютинации при тестируемых концентрациях до 150 мкг/мл, в то время как 5F9 антитело к CD47 демонстрировало значительный уровень RBC агглютинации уже при концентрации, равной или превышающей 0,1 мкг/мкл.

Пример 10. Анализ RBC связывания.

Связывание антител к CD47 с RBC человека исследовали с помощью проточной цитометрии. RBC человека инкубировали с антителами к CD47 (10 мкг/мкл) 1 ч при 4°C с последующим добавлением вто-

ричного антитела, конъюгированного с APC в течение 30 мин при 4°C.

Как показано на фиг. 9a и 9b, удивительно, но 1F8 антитело к CD47 не связывалось с RBC, в то время как 5F9 и 2A1 антитела к CD47 связывались при тестируемых концентрациях.

Аналогично, на фиг. 9c и 9d показано, что в то время как 1F8 антитело к CD47 не связывалось с RBC при тестируемых концентрациях, антитело 13H3 демонстрировало наименее выраженную способность к связыванию при тестируемых концентрациях.

Пример 11. Анализ RBC агглютинации.

Собирали RBC от шести здоровых лиц мужского пола и шести женского пола для RBC агглютинации путем добавления антител к CD47. На фиг. 10a и 10b показаны результаты анализа гемагглютинации (именуемые "индекс агглютинации"), определенные по количеству RBC в осадке в присутствии антитела, нормализованные до такого количества в присутствии IgG контроля или референсного антитела.

Пример 12. Анализ связывания тромбоцитов.

Связывание антител к CD47 по данному изобретению с тромбоцитами человека исследовали с помощью проточной цитометрии. Цельную периферическую кровь человека инкубировали с тестируемыми антителами к CD47 по данному изобретению (10 мкг/мкл) или слиянием SIRP α -Ig и CD61 в качестве поверхностного маркера метили тромбоциты. Связывание антител к CD47 или слияния SIRP α -Ig измеряли путем гейтирования по позитивной популяции CD61 (тромбоцит) и затем определяли в процентах связывание CD47 или слияния SIRP α -Ig.

Как показано на фиг. 11, тестируемые антитела к CD47 по данному изобретению не демонстрировали явно выраженную готовность к связыванию с тромбоцитами человека, а белки SIRP α такую готовность демонстрировали.

Пример 13. Анализ агглютинации RBC яванской макаки.

RBC мужских и женских особей яванских макак разбавляли до 10% в PBS и инкубировали 2 ч при 37°C с заданными концентрациями антител к CD47 в 96-луночном планшете с круглым дном. Свидетельством гемагглютинации являлось присутствие не осевших RBC, наблюдаемых в виде дымки, в отличие от прерывистой красной точки не гемагглютинированных RBC, как показано фиг. 12a. На фиг. 12b представлены результаты титрования (именуемые "индексом агглютинации"), которые определены по измерению количества RBC в осадках в присутствии антитела, нормализованных до такого количества в присутствии IgG контроля.

Данные показывают, что тестируемые антитела к CD47 по данному изобретению существенно не индуцировали агглютинацию RBC яванской макаки *in vitro*.

Пример 14. Фагоцитоз первичных клеток AML человека антителами к CD47.

Первичные PRBC AML пациента (AML-PB003F) метили 1 μ M CPSE в течение 10 мин, затем прибавляли к MDM в соотношении 5:1 опухолевых клеток на фагоцит и добавляли указанные антитела к CD47 в различных концентрациях. После инкубации в течение 3 ч клетки-мишени, не ставшие объектом фагоцитоза, удаляли отмывкой PBS, а оставшиеся фагоциты соскребали, метили антителом к CD47 и анализировали с помощью проточной цитометрии. Фагоцитоз измеряли путем гейтирования по CD14⁺ клеткам и затем оценивали процентное содержание CFSE⁺ клеток. Фагоцитоз измеряли, как показано ранее.

Как показано на фиг. 13a-13h, все тестируемые антитела к CD47 по данному изобретению демонстрировали высокую способность AML связывания (более 75%) и способность к фагоцитозу (по меньшей мере 36%), что значительно превышает указанные в отношении референсного антитела, которое использовалось в том же анализе.

Пример 15. *In vivo* эффективность 1F8 с использованием модели ксенотрансплантата у мышей клеток Раджи, содержащих люциферазу (CDX).

Мышам NSG трансплантировали с помощью инъекции Raji Luc-EGFP в хвостовую вену в концентрации 1 млн клеток/мышь. Мышей визуализировали *in vivo* для определения уровня приживления клеток через пять дней после введения трансплантата. Лечение антителами к CD47 (т.е. 1F8, 5F9 и 2A1) началось в тот же день дозой 10 мг/кг. Всех мышей инъецировали интраперитонеально через день. Визуализацию мышей *in vivo* осуществляли с помощью системы визуализации IVIS Lumina III в следующие моменты времени: 0-й день лечения антителом, 2-й день лечения, 6-й день лечения и 9-й день лечения. Рост опухоли у мышей измеряли посредством биолюминесцентного отображения *in vivo* с помощью системы визуализации в режиме реального времени.

Как показывает анализ биолюминесцентного отображения, представленный на фиг. 14a, опухоли у мышей практически не растут в течение первых трех дней после начала лечения тестируемым антителом к CD47 по данному изобретению (т.е. 1F8), и опухоли уменьшаются с 6-го дня после начала лечения. Для сравнения: опухоли у мышей, которых лечили референсным антителом к CD47, продолжали расти на протяжении того же срока лечения.

На фиг. 14b показано, что 13H3 антитело к CD47 также продемонстрировало эффективность *in vivo* при использовании модели ксенотрансплантата клеток Раджи в тестах с различными концентрациями.

По завершении исследования с использованием модели ксенотрансплантата у мышей клеток Раджи

всех мышей подвергали эвтаназии действием CO₂. Спленциты четырех групп мышей изолировали и анализировали на процентное содержание макрофагов типа M1 (% CD80-позитивных в F4/80 позитивных макрофагах) и типа M2 (% CD206-позитивных в F4/80 позитивных макрофагах) посредством точной цитометрии.

Как показано на фиг. 15a, 15b, все тестируемые антитела к CD47 (включая 1F8) были способны индуцировать поляризацию макрофагов у мышей с опухолью.

Пример 16. Профиль экспрессии CD47 с использованием PDX образцов разных форм рака человека.

54 PDX образца (7 типов рака человека) анализировали на экспрессию CD47 методом иммуногистохимического окрашивания. Уровни CD47 окрашивания в разных PDX образцах подсчитывали по параметрам геометрии и интенсивности окрашивания. На фиг. 16a-16c приведены различные уровни экспрессии CD47 после обработок антителами к CD47.

Пример 17. Исследование безопасности лекарственного средства (in vivo исследование PK на яванской макаке).

Яванских макак, не использовавшихся ранее в опытах, внутривенно инфузировав "проводником" (n=2), 1F8 (n=3, 15 мг/кг) и 5F9 (n=3, 15 мг/кг). Гематологию (CBC) анализировали в течение 24 ч после забора крови, дважды до инъекций и на 3, 6, 10 и 21-й день после введения антитела. Изучаемые показатели CBC включали подсчет количества эритроцитов (RBC), уровень гемоглобина HGB, подсчет абсолютного количества ретикулоцитов и подсчет количества тромбоцитов. Результаты, приведенные на фиг. 17a-17d, показывают, что обработки 1F8 не влияли на гематологические показатели у яванских макак.

Подобным образом яванских макак, не использовавшихся ранее в опытах (n=2), внутривенно инфузировав 13H3-антителом к CD47 дозой 20 мг/кг. Сбор образцов их крови осуществляли путем венопункции в пробирки без коагулянта в различные периоды времени. Уровень 13H3 антитела к CD47 в сыворотке крови измеряли посредством ELISA с использованием белка CD47 в качестве покрывающего реагента, затем проводили детекцию HRP-конъюгированным античеловеческим каппа-вторичным антителом. Фармакокинетические параметры у яванских макак анализировали с помощью программы Winolin. Они показаны на фиг. 17e и представлены в следующей таблице.

T _{1/2} (h)	C _{max} (µg/ml)	AUC _{0-t} (день·µg/ml)	AUC _{inf} (день·µg/ml)	CL (ml/hr/kg)
145.2±10.8	536.4±63.9	10692.1±1300.9	10712.5±1298.4	1.880±0.228

Исследование безопасности 13H3-антитела (гематология) на примере яванской макаки.

Яванских макак, не использовавшихся ранее в опытах, внутривенно инфузировав однократной дозой или многократными дозами (еженедельно) 13H3-антитела (20 мг/кг). Изучаемые гематологические параметры (CBC) включали подсчет количества эритроцитов (RBC), уровень гемоглобина HGB, подсчет количества тромбоцитов и подсчет количества лимфоцитов в заданные периоды времени после введения антитела.

На фиг. 19a-19h показано влияние 13H3-антитела к CD47 на скопление RC, гемоглобина, тромбоцитов и лимфоцитов.

Пример 18. Структура 1F8 антитела.

Эпитоп-специфическую сортировку антител к CD47 оценивали методом конкурентного анализа ELISA. Белок CD47 ECD и первое анти-CD47-антитело преинкубировали и добавляли к биотинилированному второму анти-CD47-антителу, детектированному с помощью стрептавидин-HRP антитела. Если первое анти-CD47-антитело конкурировало с CD47 ECD в связывании со вторым антителом, то оба антитела находились в тех же или перекрывающихся эпитопных группах. В противном случае они находились в неперекрывающихся эпитопных группах. Результаты, представленные на фиг. 18a и 18b, показывают, что 1F8-антитело к CD47 по данному изобретению имеет эпитоп, отличающийся от эпитопов референсных антител 5F9 и 2A1.

На фиг. 18c представлена кристаллическая структура референсного Ab 5F9 (верхняя часть) в комплексе с человеческим CD47-ECD (зеленый цвет), известная из публикаций (см., например, J. Clin. Investigation, 126, 7:2610-2620).

На фиг. 18d представлена кристаллическая структура 1F-Fab (верхняя часть) в комплексе с человеческим CD47-ECD (зеленый цвет). Структура комплекса CD47-1F9 Fab имеет более правильную ориентацию по типу "голова к голове", в то время как структуры комплексов CD47-SIRPα и CD47-5F9 диатела имеют скошенную ориентацию по типу "голова к голове". Эпитоп 1F8 в составе CD47 представляет собой распространенный прерывистый эпитоп, состоящий из остатков L3, V25, T26, N27, M28, E29, A30, Q31, T34, E35, Y37, A53, L54, L74, K75, G76, T99, E100, L101, T102 и R103, из которых L3, N27, E29, Q31, T34, E35, Y37, A53, T99, E100, L101, T102 и R103 вовлечены во взаимодействие с SIRPα, что объясняет антагонистические свойства 1F8. В структуре комплекса также имеется VH домен 1F8 к CD47, состоящий из 8 водородных связей и 4 солевых мостиков, и VL домен 1F8 к CD47, также состоящий из 8 водородных связей.

В отличие от опубликованных структур комплекса CD47-IgV/антитело или SIRPα антитело 1F8

связывает большинство различных эпитопов мишени, несмотря на то, что связывание всех происходит в одинаковой ориентации "голова к голове". Эпитоп 1F8 в составе CD47 является конформационным прерывистым эпитопом, который содержит петлевой участок TNMEAQ (остатки 26-31), T34, E35, L74 и LTR шарнирный участок (остатки 101-103) CD47. Образование многих водородных связей происходит в результате взаимодействий между боковыми цепями остатков антитела и атомами кислорода главной цепи CD47. Солевой мостик также образуется между R103 антитела 1F8 и E35 белка CD47. Отмечены несколько ван-дер-ваальсовых контактов, которые критичны для поддержания соответствующей ориентации. VH домен антитела 1F8 прежде всего участвует в связывании с T34, E35 и LTR шарнирным участком (остатки 101-103), а VK домен взаимодействует с петлевым участком TNMEAQ (остатки 26-31) и L74. Указанные эпитопы в составе CD47 отличаются от эпитопа в составе антитела 5F9 и SIRP α . Структурный анализ позволяет предположить, что две длинные цепи (остатки 26-38 и 52-59) антитела 1F8 позволяют ему связываться с CD47 в почти вертикальной ориентации, что может приводить к его отдалению так, что CD47 на прилегающих клетках не сможет связаться мостиком с антителом, предотвращая, таким образом, агрегацию большинства кровяных клеток.

На фиг. 18е показано взаимодействие 5F9 и 1F8 с CD47.

Суперпозиция структуры комплекса 5F9/CD47 референсного антитела на структуре комплекса 1F8/CD47 показывает, что ориентация связывания CD47 у обоих комплексов сильно отличается. Хотя оба комплекса имеют ориентацию связывания по типу "голова к голове", CD47 повернут по горизонтали почти на 180°. Структура комплекса 1F8/CD47 имеет CD47 с пироглутаматом на N-конце вблизи остатков петли легкой цепи, а 5F9 имеет CD47, являющийся N-концевой частью среди трех петлевых участков W52, N32 и W101 тяжелой цепи. В антителе 1F8 остатки тяжелой цепи Trp33 и Arg103 образуют ван-дер-ваальсовый контакт и солевой мостик с CD47 Leu101 и Glu35 соответственно. В аналогичной позиции остаток Tyr101 антитела 5F9 обращен к N-концевой части CD47 через ван-дер-ваальсовый контакт и Arg102 образует водородную связь с CD47 Glu104. Остатки Asn31, Trp33 петлевого участка антитела 1F8 и остатки Arg53 и Asp56 шарнирного участка образуют сеть междоменных водородных связей, затем Asn31 и Arg53 образуют водородные связи с главной цепью CD47 Leu101 и Thr34. По всей видимости, в том же поверхностном участке 5F9 не взаимодействует, только остаток Tyr52 образует ван-дер-ваальсовый контакт с Leu3 на поверхности CD47. Шарнирный участок (остатки 52-56) представляет собой три более коротких остатка по сравнению с 1F8 (остатки 52-59). В легкой цепи Fab 1F8 и Fab 5F9 имеют ряд важных водородных связей с CD47 из петлевого участка (V29-Y38 у 1F8 и V152-Y158 у 5F9). Остатки Y97 и Y98 у 1F8 "отгалкивают" петлевой участок (остатки 26-38) в сторону, и он образует две водородные связи между 1F8 и CD47, в частности между Arg34 1F8 и главной цепью Leu74 на поверхности CD47, а также между Arg36 1F8 и главной цепью Thr26 на поверхности CD47. Однако остатки Gly218 и Ser219 5F9 (которые соответствуют Tyr97 и Tyr98 у 1F8) заставляют петлевой участок (остатки 149-158) у 5F9 образовывать три водородные связи с CD47 (на участке Asn157-Lys39, Tyr159-Glu104 и Lys177-Thr99). Как и у тяжелой цепи, петлевой участок (остатки 149-158) у 5F9 является на три остатка короче, чем у 1F8 (остатки 26-38). Такие более длинные петли у 1F8 в основном содействуют ориентации связывания CD47.

Пример 19. 34C5 антитело к CD47.

Для получения античеловеческих антител к CD47 различные штаммы 6-8 недельных мышей, включая BALB/C, C57/BL6 или SJL, иммунизировали рекомбинантным человеческим белком CD47 внеклеточного домена в несколько раундов. После иммунизации у мышей с достаточными титрами анти-CD47 IgG проводилась бустер-иммунизация тем же антигеном с последующим слиянием. Супернатанты гибридомы тестировали на прямое связывание с человеческим белком CD47-ECD и конкурентное связывание SIRP α с CD47 путем ELISA скрининга. В результате нескольких стадий скрининга отбирали 34C5 для гуманизации и последующей *in vitro* характеристики в соответствии с исследованиями, описанными выше.

На фиг. 20 и 21 показана сильная аффинность связывания 34C5 с рекомбинантным CD47-ECD (с $EC_{50}=0,27$ нМ) и CD47 с клетками Раджи (с $EC_{50}=0,83$ нМ) соответственно.

На фиг. 22 показана способность 34C5 эффективно блокировать связывание CD47 с SIRP α при $EC_{50}=0,30$ нМ.

На фиг. 23 показано, что 34C5 антитело стимулирует фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами человека.

На фиг. 24 показано, что 34C5 антитело не вызывает *in vitro* RBC агглютинации.

На фиг. 25 показано уменьшение связывания 34C5 антитела с RBC с уменьшением концентрации этого антитела.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с CD47 человека, указанное антитело содержит:

(i) тяжелую цепь, содержащую VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, как указано в последовательности варибельной области тяжелой (VH) цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; и

(ii) легкую цепь, содержащую VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, как указано в последовательности варибельной области легкой (VL) цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32,

где VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 соответствуют схеме нумерации по Kabat.

2. Выделенное антитело по п.1, включающее две тяжелые цепи, каждая из которых включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; и две легкие цепи, каждая из которых включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

3. Выделенное антитело по п.2, отличающееся тем, что антитело включает тяжелые цепи человека класса IgG4 и легкие каппа-цепи человека.

4. Выделенное моноклональное антитело по п.1, отличающееся тем, что выделенное моноклональное антитело не вызывает агрегацию или истощение эритроцитов.

5. Выделенное моноклональное антитело по п.1, отличающееся тем, что выделенное моноклональное антитело предотвращает взаимодействие CD47 человека с сигнальным регуляторным белком SIRP α .

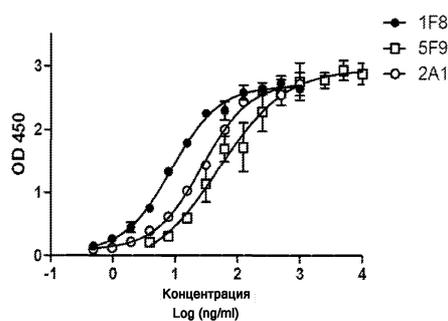
6. Выделенное моноклональное антитело по п.1, отличающееся тем, что выделенное моноклональное антитело стимулирует макрофаг-опосредованный фагоцитоз CD47-экспрессирующей клетки.

7. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый носитель.

8. Способ лечения заболевания у человеческого субъекта, который в этом нуждается, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп.1-6 или фармацевтической композиции по п.7, отличающийся тем, что заболевание представляет собой рак, фиброзное заболевание, заболевание, связанное с ингибированием фагоцитоза, или заболевание, связанное с агрегацией тромбоцитов.

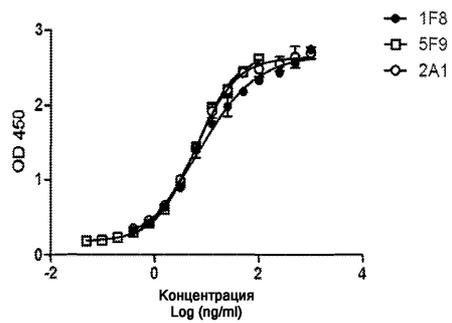
9. Способ по п.8, отличающийся тем, что рак выбирают из группы, состоящей из рака яичников, толстой кишки, груди, легких, головы и шеи, мочевого пузыря, колоректального рака, рака поджелудочной железы, неходжкинской лимфомы, острого лимфоцитарного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, лейкоза ворсистых клеток (HCL), Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза (Т-PLL), лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов, Т-клеточного лейкоза взрослых, множественной миеломы, меланомы, лейомиомы, лейомиосаркомы, глиомы, глиобластомы, миелом, моноцитарных лейкозов, лейкозов, происходящих из В-клеток, лейкозов, происходящих из Т-клеток, лимфом, происходящих из В-клеток, лимфом, происходящих из Т-клеток, рака эндометрия, почки, меланокарциномы, рака простаты, щитовидной железы, шейки матки, желудка, печени и твердых опухолей; фиброзное заболевание выбирают из группы, состоящей из инфаркта миокарда, ангины, остеоартрита, фиброза легких, астмы, муковисцидоза, бронхита и бронхиальной астмы; заболевание, связанное с ингибированием фагоцитоза, представляет собой заболевание сердечно-сосудистой системы; заболевание, связанное с агрегацией тромбоцитов, представляет собой тромбастению Гланцмана, длительное кровотечение, иммунную тромбоцитопению (ITP), болезнь фон Виллебранда (vWD).

10. Способ по п.8, отличающийся тем, что рак представляет собой солидную опухоль.

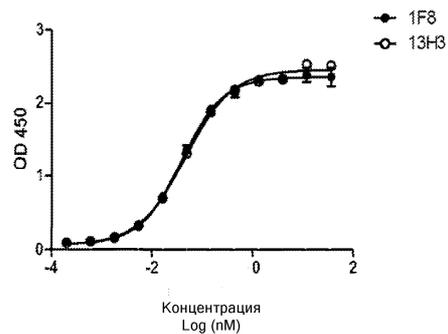


Фиг. 1

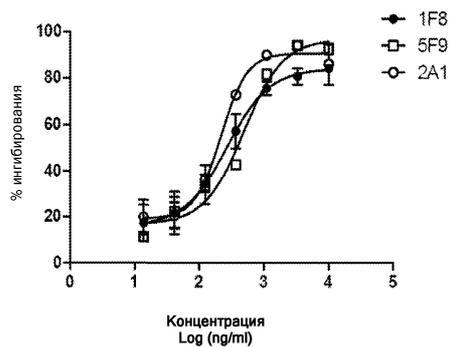
041310



Фиг. 2а

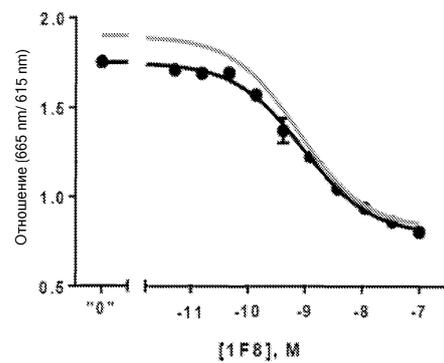


Фиг. 2b



Фиг. 3а

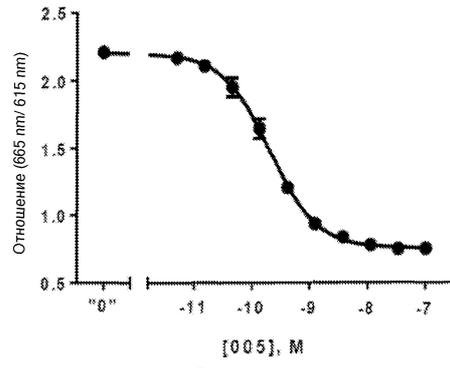
1F8 (IC₅₀ = 0.78 nM)



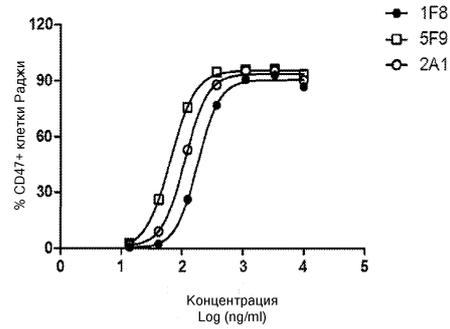
Фиг. 3b

041310

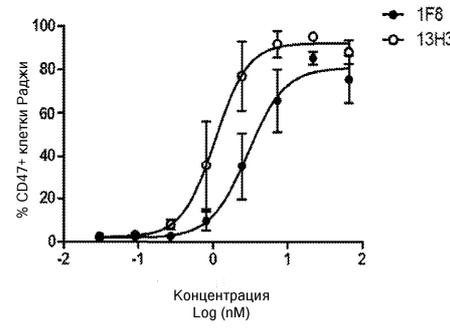
13H3 IC₅₀ = 0.20 nM



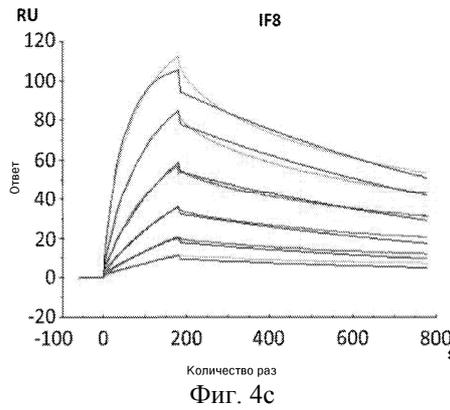
Фиг. 3с



Фиг. 4а



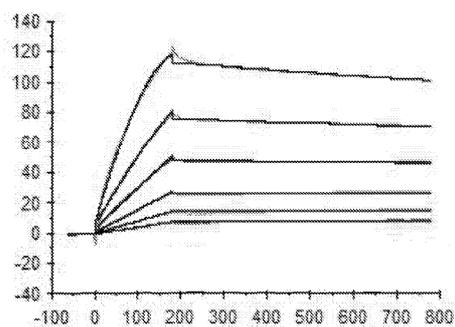
Фиг. 4б



Фиг. 4с

041310

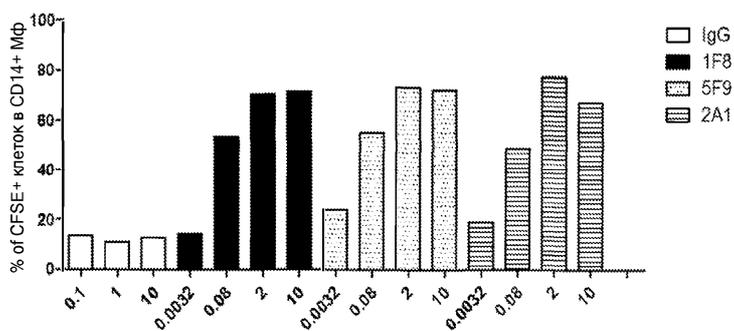
13H3



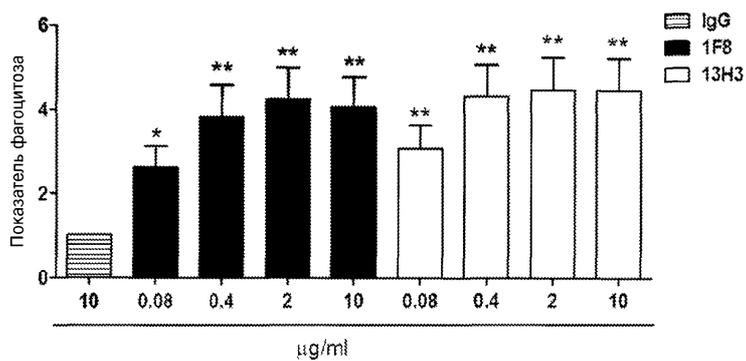
Фиг. 4d

Образец	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
1F8	3.75E+05	1.04E-03	2.8E-09
13H3	5.33E+05	2.47E-04	4.6E-10

Фиг. 4e

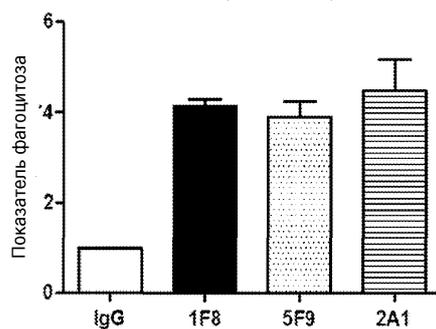


Фиг. 5a



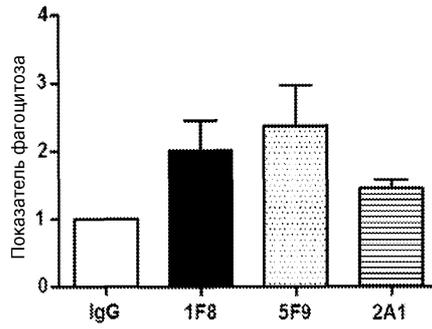
Фиг. 5b

Раджи (В Лимфома)



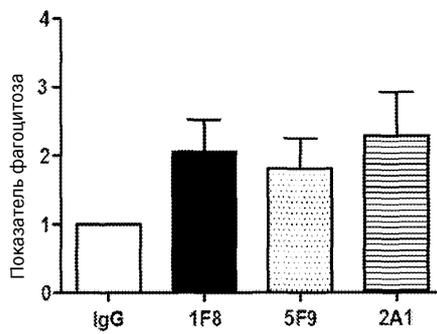
Фиг. 6a

THP-1 (AML)

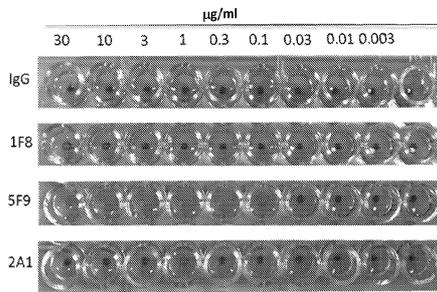


Фиг. 6b

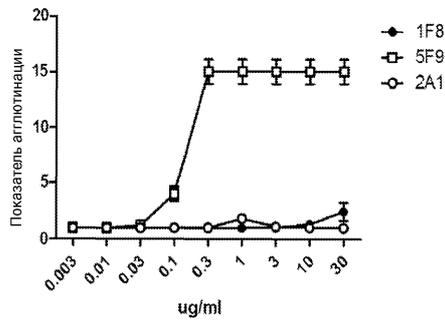
Jurkat (ALL)



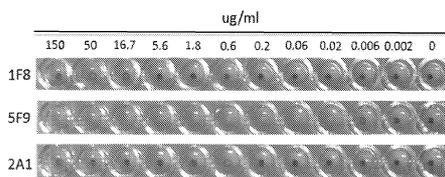
Фиг. 6с



Фиг. 7a

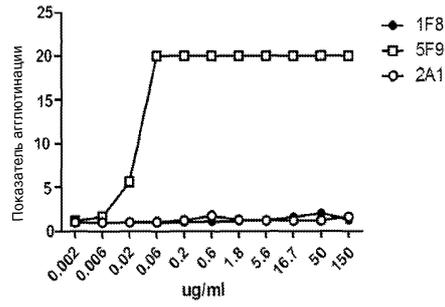


Фиг. 7b

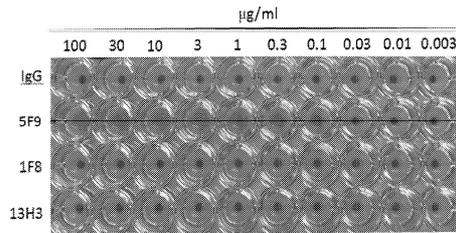


Фиг. 8a

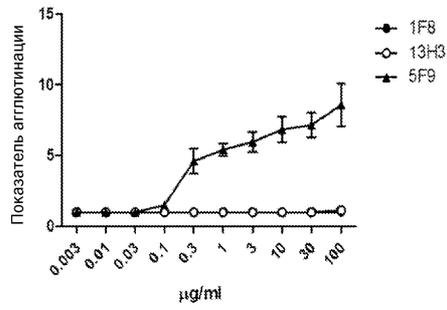
041310



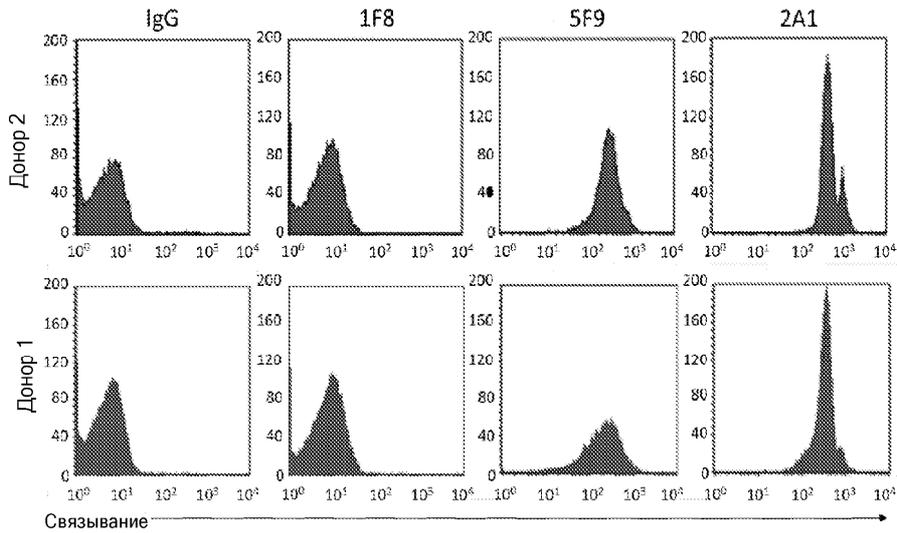
Фиг. 8b



Фиг. 8с

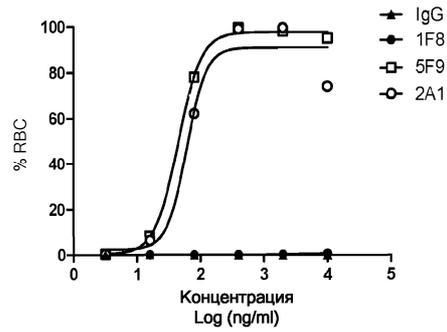


Фиг. 8d

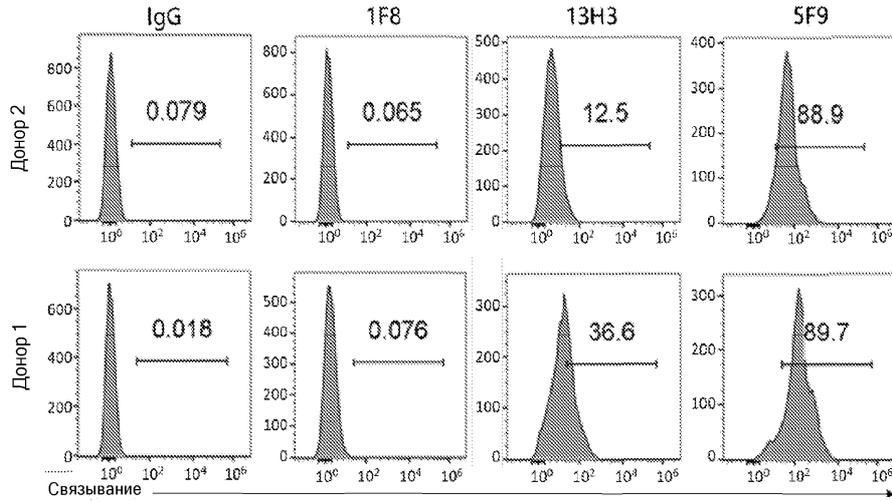


Фиг. 9a

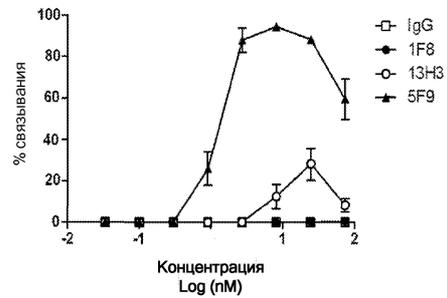
041310



Фиг. 9b

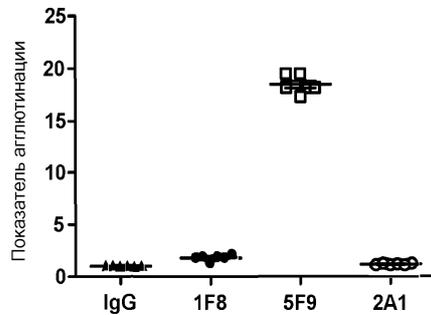


Фиг. 9c



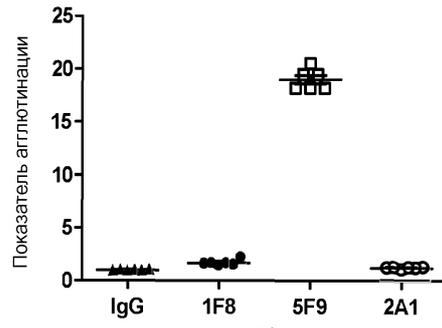
Фиг. 9d

Мужской пол (n=6)

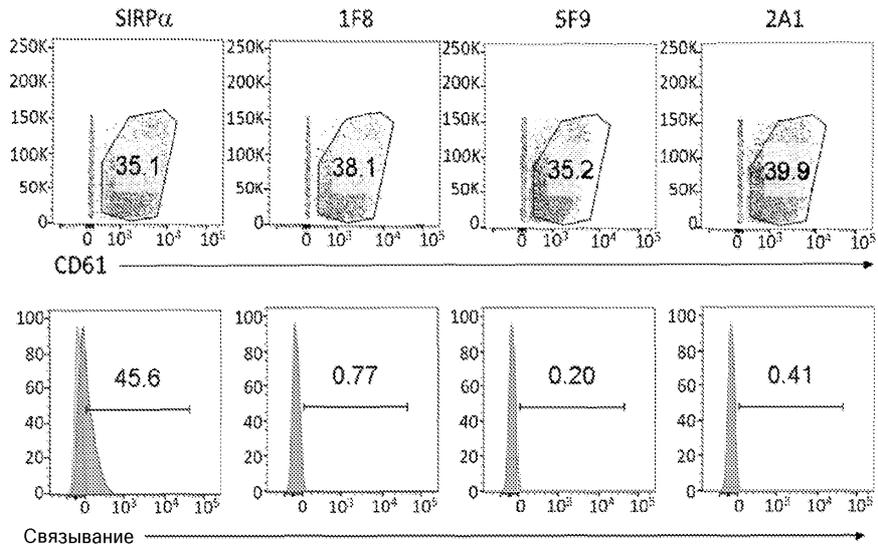


Фиг. 10a

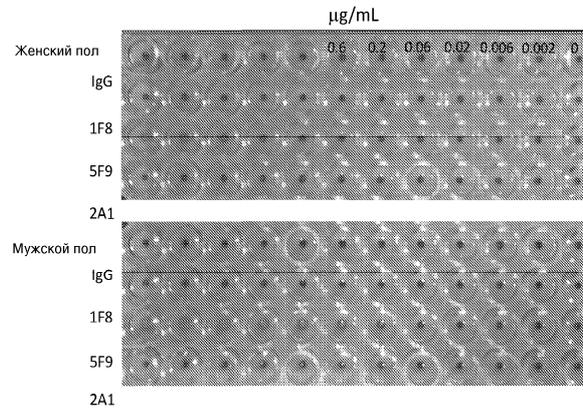
Женский пол (n=6)



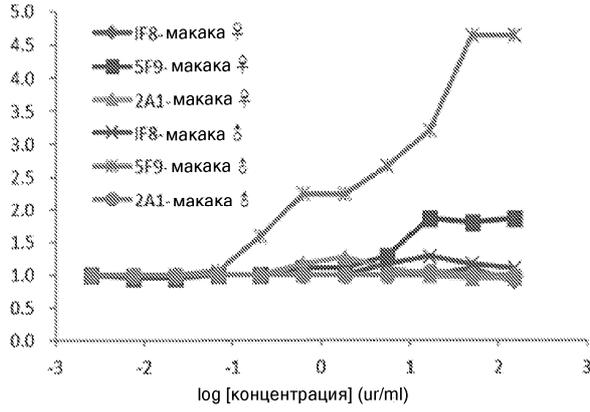
Фиг. 10b



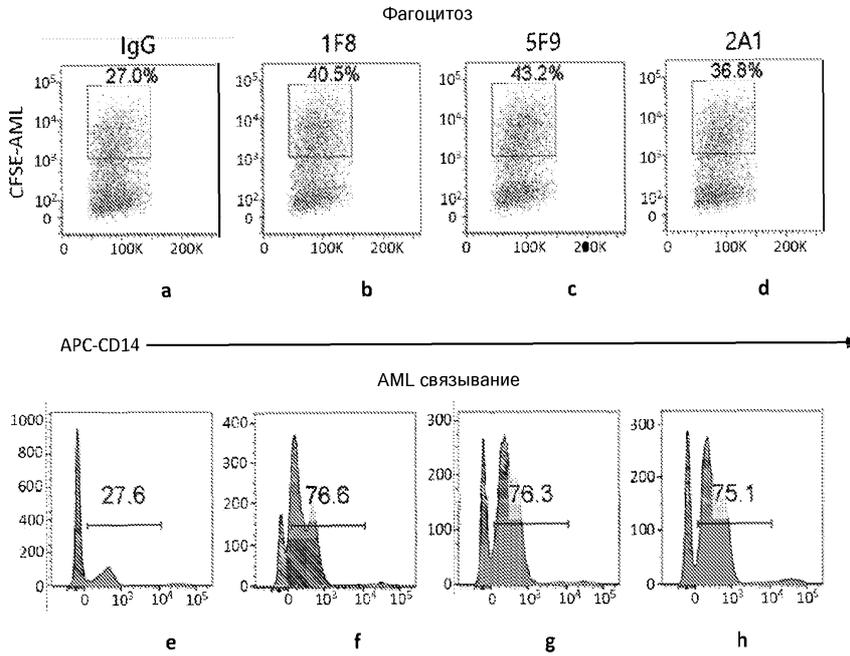
Фиг. 11



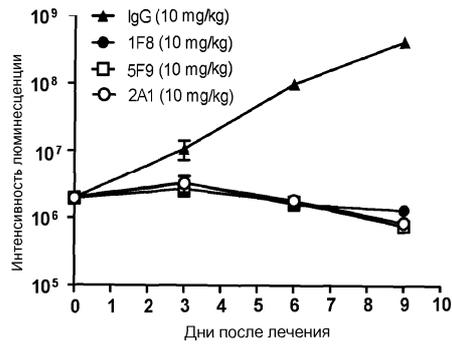
Фиг. 12a



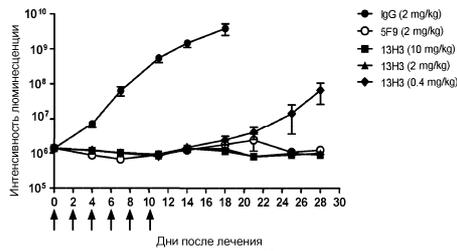
Фиг. 12b



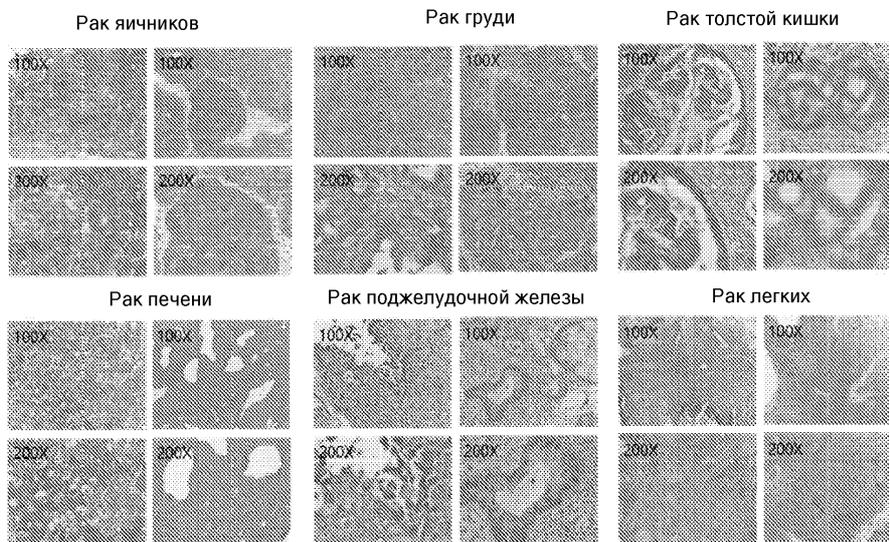
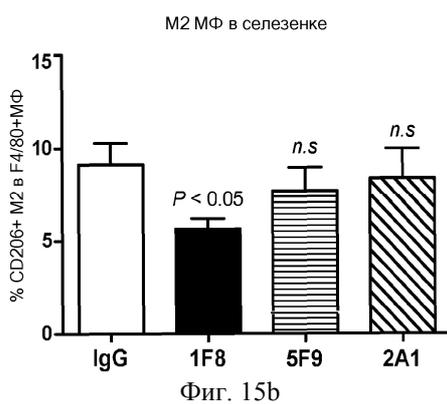
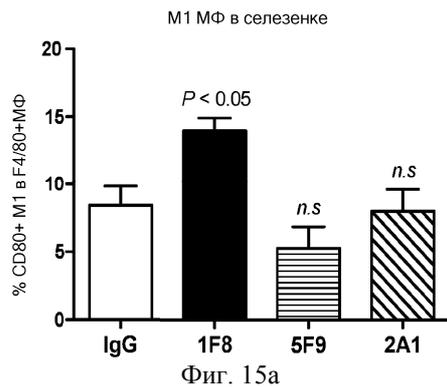
Фиг. 13



Фиг. 14a



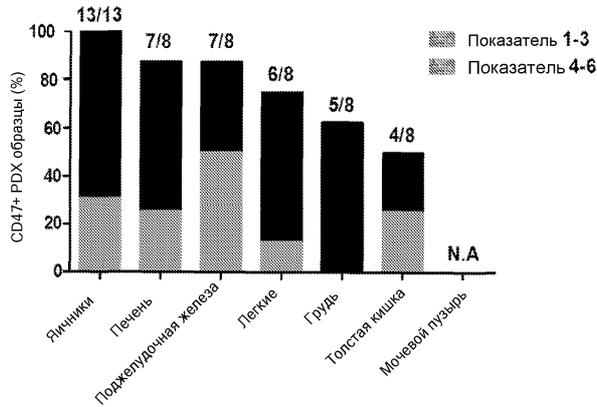
Фиг. 14b



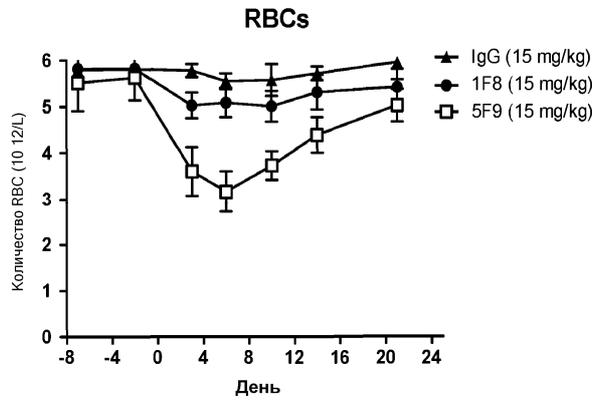
Фиг. 16а

Геометрия	Сильно окрашены	Слабо окрашены
Диффузная (все клетки)	6 	5 
Умеренная (много/ большинство клеток)	4 	3 
Фокальная (несколько клеток)	2 	1 
Отрицательная	0 	

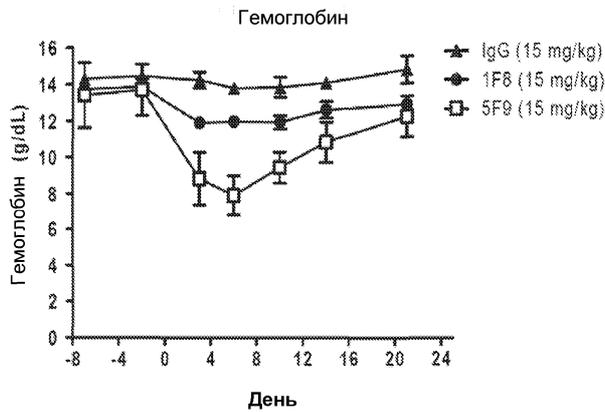
Фиг. 16b



Фиг. 16с

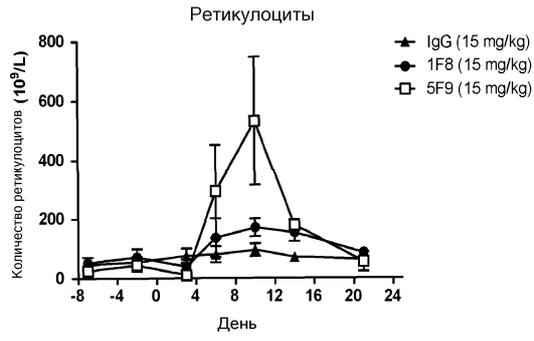


Фиг. 17а

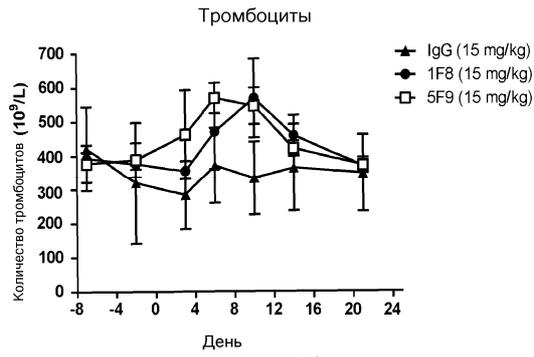


Фиг. 17b

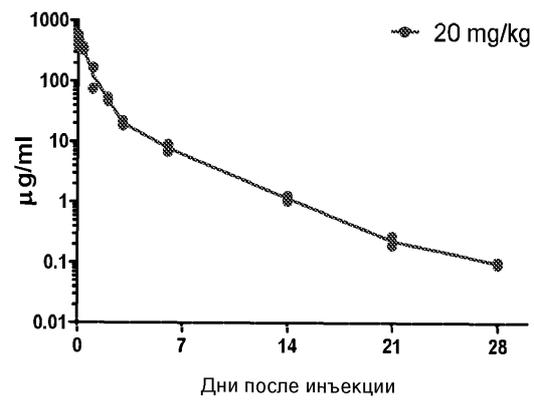
041310



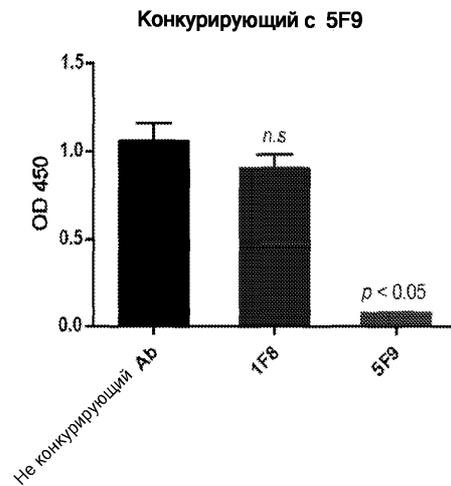
Фиг. 17с



Фиг. 17d

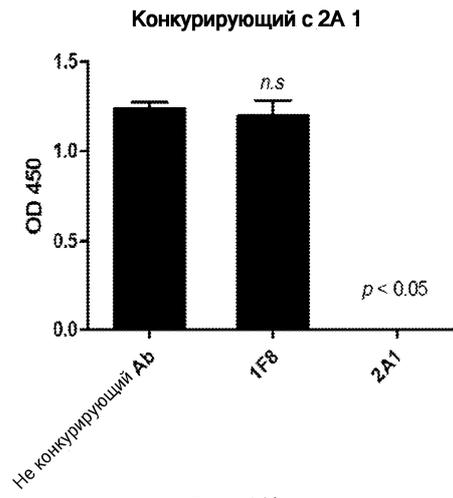


Фиг. 17е



Фиг. 18а

041310



Фиг. 18b

Структура комплекса 5F9/CD47



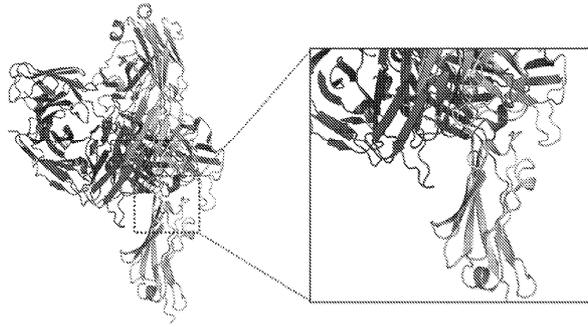
Фиг. 18c

Структура комплекса 1F8/CD47



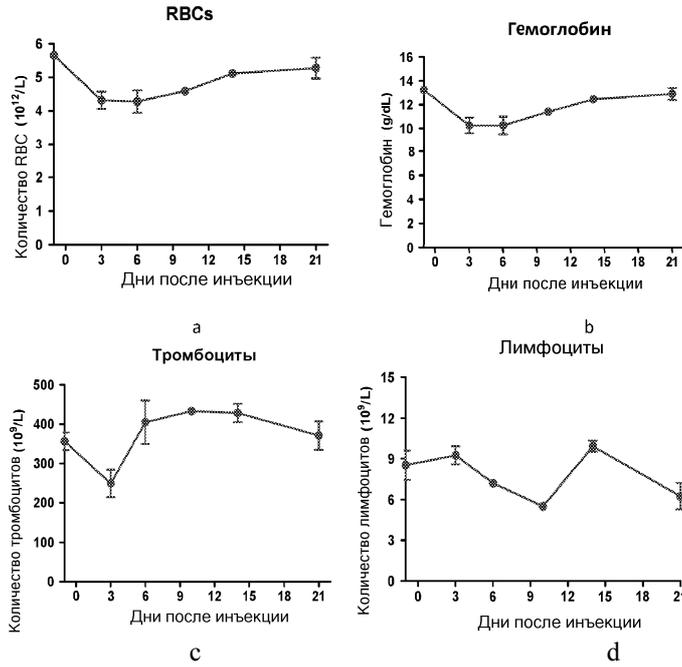
Фиг. 18d

Сравнение взаимодействия мотивов 5F9 и 1F8 с CD47

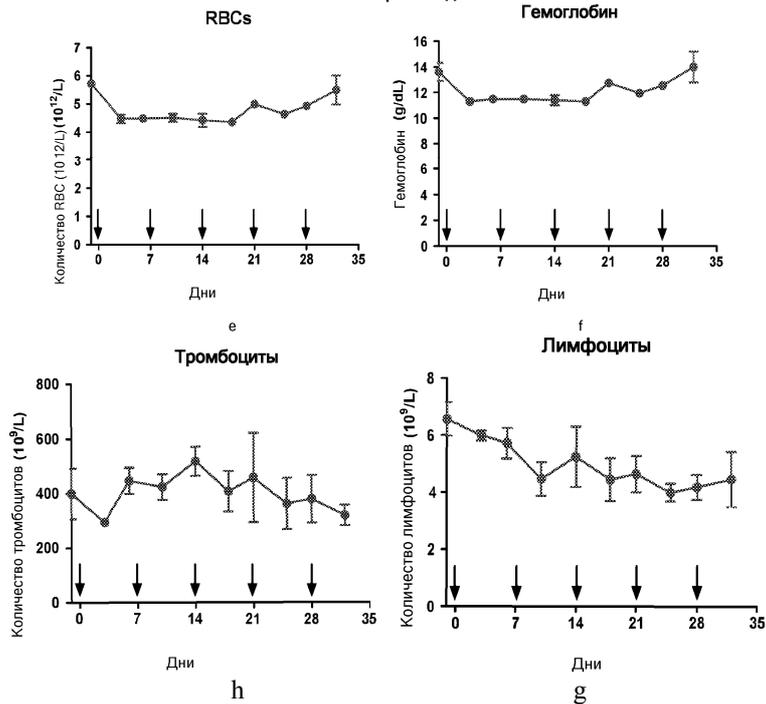


Фиг. 18е

Однократная доза

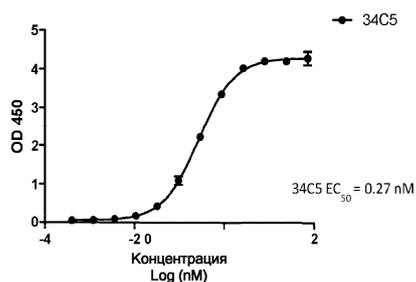


Множкратная доза



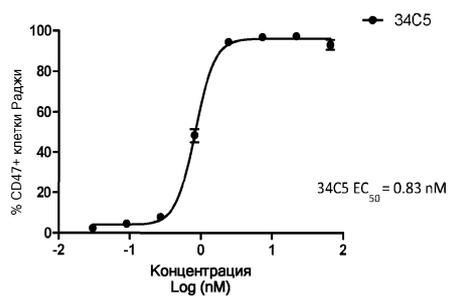
Фиг. 19

Связь с рекомбинантным CD47-ECD



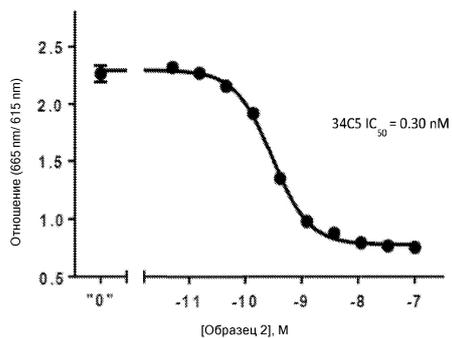
Фиг. 20

Связывание к CD47-несущим клетками Раджи



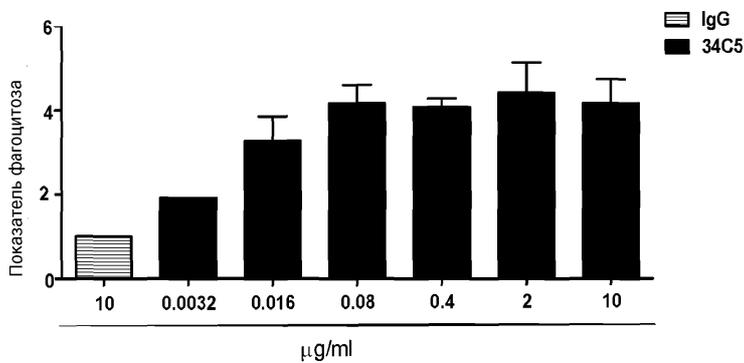
Фиг. 21

Блокирование связывания CD47 с SIRPα



Фиг. 22

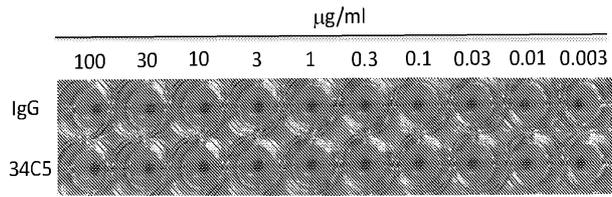
Фагоцитоз злокачественных клеток МФ человека



Фиг. 23

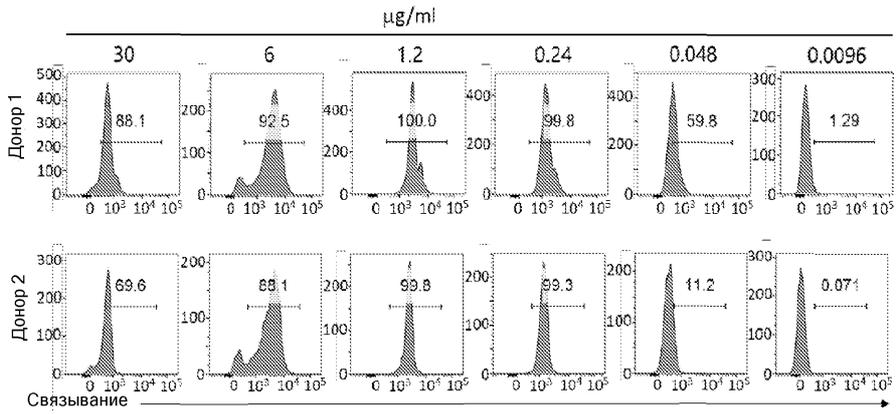
041310

In vitro RBC агглютинирующие свойства



Фиг. 24

In vitro RBC связывающие свойства



Фиг. 25

Аминокислотные последовательности:

>CD47-1A1

VH

SEQ ID NO.: 1

QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCARYSIRHTFDHWGQGTLVTVSA
VL

SEQ ID NO.: 2

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGGIASNFVQWYQQRPGSVPTTVIYRDNQRPSGVPDRFSGSVDS
LTIISGLKTDDEADYYCQSYDDHNVVFGGGTKLTVL

>CD47-1F8

VH

SEQ ID NO.: 3

KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWRQAPGKGLEWVGRIRKRTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGTMTVTVSA
VL

SEQ ID NO.: 4

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQKPGQPPKLLINQASTRASGVPDRFSGSGS
EFTLIISLHAEDVAIYYCQYYTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-2A11

VH

SEQ ID NO.: 5

QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMTWVRQAPGKGLEWVSAITSTGGRTYYADSVKGRFTISR
RNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESNRAFDIWGQGTMTVTVSA
VL

SEQ ID NO.: 6

EIVLTQSPSLPVTPEPASI SCRSSQSLHLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLNINRASGVPDRFSGSGS
FTLQISRVEAEDVGVYYCMQALQIPPTFGGGTKVDIK

>CD47-2C2

VH

SEQ ID NO.: 7

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFIDAWMTWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISR
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGARGHPGQDYWGQGTLVTVSA
VL

SEQ ID NO.: 8

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGTIASNFVQWYQQRPGSSPTPVI FENDRRPSGVPDRFSGSIDSS
LTISSLNTEDKADYYCQSYDSSTHGWVFGGGTQLTVL

>CD47-2D7

VH

SEQ ID NO.: 9

QVNLRESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGGGLEWVSYTSRFGSDTNYADSVKGRFTISRDNV
QNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCVRDVHNRDAYWGQGLVTVSA

VL

SEQ ID NO.: 10

SYVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSSSNIGGNSVSWYQQLPGTAPKLLIYRNHQRPSPDRFSGSKSGTSASLA
ISGLRSDEADYYCATWDFSLSGFVFGTGTKVTVL

>CD47-2G4

VH

SEQ ID NO.: 11

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTYADSVKGRFTISRDNV
KNTYYCANTDYDSSSHTPADYWGQGLVTVSA

VL

SEQ ID NO.: 12

ETTLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNDLDFWQQKPGEAPKRLISAASNLQSGVPSRFGSGSGSEFTLTI
HSLESEDFATYYCQQSYITPPWTFGQGTKLEIK

>CD47-2G11

VH

SEQ ID NO.: 13

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQAPGKGLEWVSTISGSGSSTNYADSVKGRFTISRDNV
KNTLFLQMNLSLRAEDTAVYFCAGRYYYDSLDAFDIWIWGQGMVTVSA

VL

SEQ ID NO.: 14

EIVLTQSPGTLVSLSPGERATLSCRASQEIIRYAYLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSRSGTDFLTI
ISRLEPEDFAVYSCQQYDTSPPTFGQGTREIK

>CD47-6F4

VH

SEQ ID NO.: 15

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGTGGSTYYADSVKGRFTISRDNV
KNTLYLQMNLSLRAEDTAAYYCAKDKWSSWPTYFYFDYWGQGLVTVSA

VL

SEQ ID NO.: 16

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPSSPTTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSNSAS
LTIISGLKTEADYYCQSYDSSNVI FGGGTKVTVL

041310

>CD47-5H1

VH

SEQ ID NO.: 17

QVQLQVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMAWVRQAPGKGLEWVAAVSNSGVETYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRTROLTPREFDYWGQGLVTVLA

VL

SEQ ID NO.: 18

ETTLTQSPSSVSASVGDRTVLTLCRASQDITRWLAWYQQKPKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQGSSVPFTFGGKVEIK

>CD47-5F6

VH

SEQ ID NO.: 19

QVNLRSEGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFTNYAMSWVRQAPGKGLEWVSSVSSAGGSTYYADSVKGRFTISRDN
KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVNRAFDLWGRGTLVTVSA

VL

SEQ ID NO.: 20

DVVMTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT
ISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPMYTFGQGTKLEIK

>CD47-1F3

VH

SEQ ID NO.: 21

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLVWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDKSYGYTFDYWGQGLVTVSA

VL

SEQ ID NO.: 22

SYVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSGSNIGSNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNQRPSPGVPDRFSGSKSGISASLA
ISGLQSEDEAVYYCATWDDRLSGPVFAAGTKLTVL

>CD47-2A4

VH

SEQ ID NO.: 23

QVNLRSEGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGAGTYYPDSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRLSFGFDIWGQGLVSVSG

VL

SEQ ID NO.: 24

NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIYSTYVQWYQQRPSPPTTVIYKDDQRPSPGVPDRFSGSIDGSSNSAS
LTISGLETEDEADYYCQSSDTSNLVFGGKVTVL

>CD47-2B12

VH

SEQ ID NO.: 25

QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCAAPGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKGDSQTYADSVKGRFTISRDNAMKTIVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKGAAYHINSWLDPWGQGLVTVSA
VL

SEQ ID NO.: 26

ETTLTQSPGTLVSPGERVTLSCRASQISGNYLAWYQQRPGQAPRLLIYGAFRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFATYYCQHYNNFPHTFGAGTKVDIK

>CD47-13A11

VH

SEQ ID NO.: 27

KVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGITFKHAWMNWVRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDDYAAPVKGRFSISRDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGMVTVSA
VL

SEQ. ID NO.: 28

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYQVNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVPRFSGSGSGTEFTLIISLQAEDVAIYYCQQYYTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-15E1

VH

SEQ ID NO.: 29

KVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFNNAWMNWRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDDYAAPVKGRFSISRDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGMVTVSA
VL

SEQ. ID NO.: 30

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYPLNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVPRFSGSGSGTEFTLIISLQAEDVAIYYCQQYYTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-13H3

VH

SEQ ID NO.: 31

KVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGLTFERAWMNWVRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDDYAAPVKGRFSISRDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGMVTVSA
VL

SEQ. ID NO.: 32

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYAGNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVPRFSGSGSGTEFTLIISLQAEDVAIYYCQQYYTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-14A8

VH

SEQ ID NO.: 33

KVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTTFNNAWMNWRQAPGKGLEWVGRIKRRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGGTMVTVSA
VL

SEQ. ID NO.: 34

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYPGNRRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVPDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEDVAIYYCQQYYTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-16H3

VH

SEQ ID NO.: 35

KVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGLTFGNAMNWRQAPGKGLEWVGRIKRRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGGTMVTVSA
VL

SEQ. ID NO.: 36

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYPGNRRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVPDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEDVAIYYCQQYYTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-1A1

VH

SEQ ID NO.: 37

KVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWRQAPGKGLEWVGRIKRRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGGNHSSDIWGGTMVTVSA
VL

SEQ. ID NO.: 38

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNRRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVPDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEDVAIYYCQQYYTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-1A1-A

VH

SEQ ID NO.: 39

KVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWRQAPGKGLEWVGRIKRRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGGAHSSDIWGGTMVTVSA
VL

SEQ. ID NO.: 40

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNRRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVPDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEDVAIYYCQQYYTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-1A1-Q

VH

SEQ ID NO.: 41

041310

KVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWVRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGGQHS SDIWGQGTMTVSA
VL

SEQ. ID NO.: 42

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEDVAIYYCQQYYTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-1A2

VH

SEQ ID NO.: 43

KVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWVRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGSAYAFDAWGQGTMTVSA
VL

SEQ. ID NO.: 44

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEDVAIYYCQQYYTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-1A8

VH

SEQ ID NO.: 45

KVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWVRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGSAYAFDSWGQGTMTVSA
VL

SEQ. ID NO.: 46

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEDVAIYYCQQYYTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-1B1

VH

SEQ ID NO.: 47

KVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWVRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGSDRASDKWGQGTMTVSA

SEQ. ID NO.: 48

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEDVAIYYCQQYYTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-1B2

VH

SEQ ID NO.: 49

KVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWVRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGSAYAFDTWGQGTMTVSA

VL

SEQ. ID NO.: 50

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVPDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEDVAIYYCQQYYTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-1H3

VH

SEQ ID NO.: 51

KVQLVESGGGLVLPKPGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGGNHSQDIWGQGMVTVSA

VL

SEQ. ID NO.: 52

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVPDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEDVAIYYCQQYYTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-1H3-Q

VH

SEQ ID NO.: 53

KVQLVESGGGLVLPKPGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGGQHSQDIWGQGMVTVSA

VL

SEQ. ID NO.: 54

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVPDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEDVAIYYCQQYYTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-1H3-A

VH

SEQ ID NO.: 55

KVQLVESGGGLVLPKPGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGGAHSQDIWGQGMVTVSA

VL

SEQ. ID NO.: 56

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVPDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEDVAIYYCQQYYTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-2A2

VH

SEQ ID NO.: 57

KVQLVESGGGLVLPKPGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGMVTVSA

VL

SEQ. ID NO.: 58

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVDPDRFSGSGSGT
EFTLI ISSLQAEDVAIYYCQQYLTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-2A3

VH

SEQ ID NO.: 59

KVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWVRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGTMTVSA

VL

SEQ. ID NO.: 60

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVDPDRFSGSGSGT
EFTLI ISSLQAEDVAIYYCQQYLRPPLNFGGGKLEIK

>CD47-2A6

VH

SEQ ID NO.: 61

KVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWVRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGTMTVSA

VL

SEQ. ID NO.: 62

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVDPDRFSGSGSGT
EFTLI ISSLQAEDVAIYYCQQYLTPPLNFGGGKLEIK

>CD47-2A10

VH

SEQ ID NO.: 63

KVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWVRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGTMTVSA

VL

SEQ. ID NO.: 64

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVDPDRFSGSGSGT
EFTLI ISSLQAEDVAIYYCQNYLTPPLSFGGGKLEIK

>CD47-2B1

VH

SEQ ID NO.: 65

KVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWVRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGTMTVSA

VL

SEQ. ID NO.: 66

041310

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEDVAIYYCQQYLKAPLAFGGGKLEIK

>CD47-2C6

VH

SEQ ID NO.: 67

KVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSNAWMNWRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNLSKTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGMVTVSA

VL

SEQ. ID NO.: 68

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEDVAIYYCQQYLNAPLHFGGGKLEIK

>CD47-2E7

VH

SEQ ID NO.: 69

KVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSNAWMNWRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNLSKTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGMVTVSA

VL

SEQ. ID NO.: 70

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEDVAIYYCQQYLEAPLVFGGGKLEIK

>CD47-2E9

VH

SEQ ID NO.: 71

KVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSNAWMNWRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNLSKTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGMVTVSA

VL

SEQ. ID NO.: 72

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEDVAIYYCQQYLKAPLHFGGGKLEIK

>CD47-2F1

VH

SEQ ID NO.: 73

KVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSNAWMNWRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNLSKTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGMVTVSA

VL

SEQ. ID NO.: 74

DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEVDVAIYYCQRLIAPPFTFGGGTKLEIK

>CD47-2F3

VH

SEQ ID NO.: 75

KVOLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNVROAPGKLEWVGRKRRKTDGETTDYAAPVKGRFSISR
DSKNTLYLQMNLSKTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGMVTVSA

VL

SEQ. ID NO.: 76

DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLINQASTRASGVDRFSGSGSGT
EFTLIISLQAEVDVAIYYCQNYLTPPLAFGGGKLEIK

>CD47-34C5

VH

SEQ. ID NO.: 77

CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGTCTTCAGTGAAGGTGTCCCTGCAAGGCTTCT
GGCTACACCTTCAGCAGCTACTATATGCACTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGACAAGCCTTGAGTGGATGGGAGAG
ATTAATCCCAACAATGCCCGTATTAACCTCAATGAAAAGTTCAAGACCAGGGTCACACTCACTGTGGACAAATCC
ACCAGCACAGCATACTGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCGGTCTATTACTGTACCAGAGGATA
TATAGGTACGGGGCTGGTTGGTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

>CD47-34C5

VL

SEQ. ID NO.: 78

GATATCCAGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAGGGCA
AGTCAGGACATTAGCGATTATTTGAACTGGTATCAACAGAAACCAGGCAAGGCTCCTAAACTCCTGATCTACTAC
ATATCAAGATTACTACTCAGGAGTCCCATCACGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTACTCTCACCATT
AGCTCCCTGCAGCCAGAAGATTTGCCACTTACTATTGCCAACAGGGTCATACACTTCCGTGGACCTTCGGTGGA
GGCACCAAGGTGGAATCAAA

Нуклеотидные последовательности VH:

>CD47-1A1_VH

SEQ ID NO.: 79

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTAAGACTCTCCTGTACAGCCTCT
GGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCA
ATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGATATAGT
ATTGGTAGACACCTTTGACCACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCGGCC

041310

>CD47-1F8_VH

SEQ ID NO.: 80

AAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGTTTCACTTTTCAGTAACGCCTGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGCCGT
ATTTAAAGGAAAATGATGGTGAACAACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTTCAGCATCTCAAGAGAT
GATTCAAAAACACCCGTATCTGCAAATGAACAGCTTGAACACCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGCGCTGGC
AGTAACCGAGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTGCC

>CD47-2A11_VH

SEQ ID NO.: 81

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAAGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTTAGCGGTATGCCATGACTTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCTCAGCT
ATTACTTCTACTGGTGGTCCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCCACCTCCAGAGACAATTCC
AGGAACACGCTTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGAGAGTCA
AACTTCAGGGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTGCC

>CD47-2C2_VH

SEQ ID NO.: 82

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTTTCATTGACGCCTGGATGACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCTCAGTT
ATTTATAGCGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCAGATTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGAGGGGCTAGG
GGCCATCCCGGGCAGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCGGCC

>CD47-2D7_VH

SEQ ID NO.: 83

CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGGGGGGCTGGAGTGGGTTTCATAC
ACTAGTCGTTTTGGTAGTGACACAACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTTCACCATCTCCAGAGACAACGTC
CAGAACTACTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTGTGAGAGATGTA
CATAACAGGGATGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCGGCC

>CD47-2G4_VH

SEQ ID NO.: 84

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCTCAGCT
ATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAACACAGAT
TACTATGATAGTAGTAGCCATACCCCGCTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCGGCC

>CD47-2G11_VH

SEQ ID NO. : 85

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTTAGTAGCTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACT
ATCAGTGGCAGTGGTAGTAGCACAACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTATTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTTCTGTGCGAAAGGCCGA
TATTACTATGATAGTCTTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTGCC

>CD47-6F4_VH

SEQ ID NO. : 86

CAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCT
ATTAGTGGTACTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCCATATTTACTGTGCGAAAGATAAA
TGGAGCAGCTGGCCACTTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCTGGCC

>CD47-5H1_VH

SEQ ID NO. : 87

CAGGTGCAGCTGCAGGTGTGGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTCAGTAGCTATAGCATGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCGCGCT
GTTAGTAATAGTGGTGTGAGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATTTACTGTGCGAAACGAACT
AGACAACCTGCTAACTCCGCGGAGTTTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCTGGCC

>CD47-5F6_VH

SEQ ID NO. : 88

CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGGGGGAGGCTTGATACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTTACCAATTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGT
GTTAGTAGTGTGGTGGTAGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAACGCC
AAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGACGAGTC
AATCGGGCCTTCGATCTCTGGGGCCGTGGAACCCCTGGTCACCGTCTCTGGCC

>CD47-1F3_VH

SEQ ID NO. : 89

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTTAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTGGCCGT
ATTAAGGCAAACTGATGGTGGGACAACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTACCATCTCAAGAGAT
GATTCAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCACA
GATAAGAGCTATGGTTACACATTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCTGGCC

>CD47-2A4_VH

SEQ ID NO. : 90

CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTAAAGCCGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
 GGATTCACCTTCAGTAGCTACTGGATGCACTGGGTCCGCCAAGCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCT
 ATCAGTGGTAGTGGTCCGGCACATACTACCCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTC
 AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCAGAGATCGG
 TCCTTATCTTTTGGTTTGGATTTTGGGGCCAAGGCACCCCTGGTCTCCGTCTCTGGC

>CD47-2B12_VH

SEQ ID NO. : 91

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAAGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGTCACTGAGACTCTCCTGTGCAGCCCCT
 GGATTCACCTTTAGTAGATATGGATGAGTTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGGTGGCCAAC
 AATAAGGGAGATGGAAGTCAGACATACTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAGCC
 ATGAAAACAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCATATATTACTGTGCAAAAGGGGCT
 GCTTATCACATTAACAGCTGGCTCGACCCCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTACCCGTCTCGGC

Нуклеотидные последовательности VL:

>CD47-1A1_VL

SEQ ID NO. : 92

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCCGAGTCTCCGGGAAGACGGTAACCATCTCCTGCACCCGCAGC
 AGTGGCGGCATTGCCAGTAACCTTTGTGCACTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAGTGTCCCCACCACTGTGATCTAT
 AGGGATAACCAAAGACCCTCTGGAGTCCCTGATCGGTTCTCTGGTCCCTCGACAGCTCCTCCAATTCTGCCTCC
 CTCACCATCTCTGGGCTGAAGACTGACGATGAGGCTGACTATTATGTGTCAGTCTATGATGACCACAATCATTGG
 GTGTTCCGGCGGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

>CD47-1F8_VL

SEQ ID NO. : 93

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCC
 AGCCAGAGTGTATATACAGCTCCAACAATAGGAACCTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCT
 AAGCTGCTCATTAACCAGGCATCTACCCGGGCATCCGGCGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTGGGACA
 GAGTTCACCTCTCATCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCGATTTATTACTGTGCAATATTATACTCCT
 CCCCTCGCTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

>CD47-2A11_VL

SEQ ID NO. : 94

GAAATTGTGTTGACGCACTCTCCACTCTCCCTGCCCGTACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCT
 AGTCAGAGCCTCCTGCACAGTAATGGATACAACATTTGGATTGGTACCTGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCACAG
 CTCTGATCTATTTGAATTCTAATCGGGCCTCCGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGTACAGAT
 TTTACACTGCAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTACTACTGTATGCAAGCTCTACAAATTCCT
 CCCACTTTCGGCGGAGGGACCAAAAGTGGATATCAAA

>CD47-2C2_VL

SEQ ID NO. : 95

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAAGACGGTAACCATCTCCTGCACCCGCAGC
AGTGGCACCATTGCCAGCAACTTTGTGCAGTGGTATCAACAGCGCCCGGGCAGTTCGCCACCCAGTGATCTTT
GAGAATGACCGAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAATTCTGCCTCC
CTCACCATTTCTGCTACTGAACACTGAGGACAAGGCTGACTACTACTGTCTCAGTCTTATGATAGCAGCACTCATGGG
TGGGTGTTTGGCGGAGGGACCCAGCTCACCCTTTTA

>CD47-2D7_VL

SEQ ID NO. : 96

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGC
AGCTCCAACATCGGCGGTAATTCTGTATCCTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCAAGCTCCTCATCTAT
AGGAATCATCAGCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCTCCTCGGCC
ATCAGTGGGCTCCGGTCCGACGACGAGGCTGATTATTATTGTGCAACATGGGATTTACAGCTGAGTGGTTTTGTC
TTCGGAACGGGACCAAGGTCACCGTCCTA

>CD47-2G4_VL

SEQ ID NO. : 97

GAAACTACACTCAGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCC
AGTCAGGACATCAGAAATGATTTAGACTGGTTTCAACAAAACCAGCGAAGCCCTAAACGCCTGATCTCTGCT
GCATCTAATTTGCAGAGTGGGGTCCCTCACGATTACAGCGCGGTGGCTCTGGCTCCGAATTCACCTCTCACAATC
CACAGCTGGAGTCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACATTACCCCTCCTGGACGTTTCGGC
CAAGGGACCAAGCTGGAGATCAA

>CD47-2G11_VL

SEQ ID NO. : 98

GAAATTGTGTTGACGAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC
AGTCAGGAAATAGGACCCCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
TATGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTACAGCGCAGTAGGCTGGGACAGACTTCACTCTCACC
ATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCACTGTATTCTGTCTCAGCAGTATGATACCTCACCTCCCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTA

>CD47-6F4_VL

SEQ ID NO. : 99

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAAGACGGTAACCATCTCCTGCACCCGCAGC
AGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATGTGCAGTGGTACCAACAGCGCCCGGGCAGTTCGCCACCCAGTGATCTAT
GAGGATAACCAAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACTCTGCCTCC
CTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGTCTCAGTCTTATGATAGCAGCAATGTGATA
TTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTA

>CD47-5H1_VL

SEQ ID NO. : 100

GAAACTACACTCACGCAGTCTCCATCTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCCTCACTTGTGGGGCG
 AGTCAGGATATCACAAGGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGAT
 GCATCCAGTTTGCAGAGTGGGTCCCATCAAGATTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
 AGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTACTACTGTCAACAGGGTTCAGTGTTCCTTTCACTTTTCGGCGGA
 GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

>CD47-5F6_VL

SEQ ID NO. : 101

GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGGCCACCCTCCTGCAGGGCC
 AGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
 GGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACC
 ATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCCTATGTACACT
 TTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

>CD47-1F3_VL

SEQ ID NO. : 102

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGT
 GGCTCCAACATCGGAAGTAATCTGTTCACCTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCATCTAT
 ACTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCATTTCAGCCTCCCTGGCT
 ATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGTTTATTACTGTGCAACGTGGGATGACAGACTGAGTGGTCCGGTG
 TTCGCCGACGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

>CD47-2A4_VL

SEQ ID NO. : 103

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTGGGGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCATCTCCTGCACCCGCAGC
 AGTGGCAGCATTGGCAGCACCTATGTGCAGTGGTACCAACAGCGCCCGGGCAGTCCCCCACCCTGTGATCTAT
 AAGGATGACCAAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACGGCTCCTCCAACCTCTGCCTCC
 CTCACCATCTCTGGACTGGAGACTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGTTCAGTCTTCTGATACCAGCAATCTGGTC
 TTCGGCGGAGGGACCAAGGTACCGTCCTA

>CD47-2B12_VL

SEQ ID NO. : 104

GAAACTACACTCACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTGTTTCTCCGGGGGAAAGAGTTACCCTCCTGCAGGGCC
 AGTCAGAGTATTAGCGTAATTACTTAGCCTGGTACCAAGCAGAGACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
 GGGGCATTCAGGAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACC
 ATCACCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGAACCTATTACTGCCAACACTATAATAATTTCCCCCACACTTTCCGGC
 GCAGGGACCAAAGTGGATATCAAA

>CD47-34C5_VH

SEQ ID NO. : 105

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSSYYMHWVRQAPGQGLEWMGEINPNNARINENEKFKTRVLTVDKSL
 TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRGYYRYGAWFGYWGQGLTLTVSS

>CD47-34C5_VL

SEQ ID NO. : 106

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDISDYLNWYQQKPKAPKLLIYYISRLHSGVPSRFRSGSGTDYTLTI
 SSLQPEDFATYYCQGHSLPWTFGGGTKVEIK

Фиг. 26

>CD47

SEQ ID NO. : 107

QLLFNKTKSVEF TFCNDTVVIP CFVTNMEAQN TTEVYVKWKF KGRDIYTFDG
 ALNKSTVPTD FSSAKIEVSQ LLKGDASLKM DKSDAVSHTG NYTCEVTELT
 REGETIIEELK YRVVSWFSPNE

Фиг. 27



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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