

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290747** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.07.19

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.09.03

(54) **АНТИ-CD47 МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 201910836601.9; 201910835819.2

(72) Изобретатель:

(32) 2019.09.03

**Чжан Пэн, Ли Байюн, Ся Юй, Ван
Чжунминь (CN)**

(33) CN

(86) PCT/CN2020/113287

(74) Представитель:

(87) WO 2021/043220 2021.03.11

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

АКЕСО БАЙОФАРМА, ИНК (CN)

(57) Изобретение относится к анти-CD47 моноклональному антителу и его применению, где антитело секретируется линией гибридомных клеток ССТСС NO: C2018135.

A1

202290747

202290747

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573405EA/23

АНТИ-CD47 МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

Область техники

Настоящее изобретение относится к области лечения аутоиммунных заболеваний и молекулярной иммунологии и, в частности, к анти-CD47-антителу, фармацевтической композиции, содержащей его, и его применению. Более конкретно, настоящее изобретение относится к анти-CD47-моноклональному антителу.

Уровень техники

CD47 также называют интегрин-связанным белком (IAP). CD47 представляет собой трансмембранный белок, пронизывающий мембрану пять раз, с молекулярной массой около 50 кДа и относится к суперсемейству иммуноглобулинов. Его внеклеточный N-конец представляет собой домен IgV и связан с интегринами $\alpha\beta3$ (CD51/CD61) и $\alpha\text{IIb}\beta3$ (CD41/CD61). CD47 участвует в различных физиологических функциях, таких как перенос клеток, активация Т-клеток и дендритных клеток (DC) и развитие аксонов.

CD47 экспрессируется на всех типах клеток, включая эритроциты, и в высокой степени экспрессируется на опухолевых клетках. CD47 имеет два лиганда, а именно сигнальный регуляторный белок- α (SIRP α) и тромбоспондин-1 (TSP1). SIRP α , трансмембранный гликопротеин рецептора, содержащий домен иммуноглобулина, принадлежит к семейству SIRP и в основном экспрессируется на макрофагах и нервных клетках. В пути CD47-SIRP α белок CD47 связывается с SIRP α и фосфорилирует его иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM), затем внутриклеточно рекрутирует белок SHP-1 для продуцирования серий каскадных реакций для ингибирования фагоцитоза макрофагов (Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, et al. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRP α signalling pathway. Trends in cell biology, 2009, 19(2): 72-80.). Однако нормальные эритроциты не фагоцитируются вследствие ингибирующего сигнала, генерируемого связыванием CD47 на поверхности клеточной мембраны с SIRP α макрофагов. (Oldenborg P A, Zheleznyak A, Fang Y F, et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. Science, 2000, 288(5473): 2051-2054.). TSP1, гомотример, состоящий из 3 пептидных цепей, участвует в клеточной пролиферации, апоптозе, адгезии, миграции, ангиогенезе и других процессах посредством взаимодействия с другими рецепторами клеточной поверхности, компонентами матрикса и факторами роста (Jiang P, Lagenaur CF, Narayanan V. Integrin-associated Protein Is a Ligand for the P84 Neural Adhesion Molecule. Journal of Biological Chemistry 1999. 274:559-62).

Макрофаги происходят из моноцитов, которые, в свою очередь, происходят из клеток-предшественников костного мозга. Их основные функции заключаются в фагоцитозе клеточного дебриса и патогенов в виде фиксированных клеток или свободных клеток и в активации лимфоцитов или других иммунных клеток для ответа на патогены. На настоящий момент исследования показывают, что опухолевые клетки имеют механизм

избегания фагоцитоза макрофагов. Во время роста опухолевых клеток на поверхности образуются специфические белки, такие как кальретикулин, экспонирующие идентичность опухолевых клеток, так что опухолевые клетки фагоцитируются привлеченными макрофагами. Однако опухолевые клетки с высоким уровнем экспрессии CD47 ошибочно распознаются макрофагами с SIRP α как нормальные клетки и, таким образом, избегают фагоцитоза макрофагов, поскольку сигнальный путь CD47-SIRP α активирует ингибирование фагоцитоза макрофагов (CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. Jaiswal S, Jamieson C H M, Pang W W, et al. Cell, 2009, 138(3) 271-285).

В настоящее время исследования показывают, что анти-CD47-антитела убивают опухолевые клетки главным образом посредством двух механизмов. 1. Связывание анти-CD47-антител с CD47 блокирует путь CD47-SIRP α , позволяя макрофагам осуществлять фагоцитоз. 2. Анти-CD47-антитела оказывают эффект уничтожения опухоли через DC-клетки и CD8+ Т-клетки. DC-клетки фагоцитируют опухолевые клетки посредством механизма взаимодействия между анти-CD47-антителами и профагоцитарными молекулами, такими как кальретикулин, и представляют опухолеассоциированный антиген CD8+ Т-клеткам, тем самым оказывая специфический уничтожающий эффект CD8+ Т-клеток на опухоли (CD47 blockade as another immune checkpoint therapy for cancer. Vonderheide R H. Nature Medicine, 2015, 21(10):1122). С этими двумя механизмами можно предположить, что анти-CD47-антитела, скорее всего, обладают способностью активировать как неспецифический иммунитет, так и специфический иммунитет.

В настоящее время лекарственные средства на основе анти-CD47 моноклональных антител имеют многообещающее применение в различных областях и эффективны при лечении опухолей. Они могут быть использованы для лечения различных опухолей. Лекарственное средство на основе анти-CD47 моноклонального антитела Hu5F9-G4 может эффективно ингибировать рост и метастазирование гематологических злокачественных новообразований и солидных опухолей в доклинических экспериментах (Abstract PR13: The anti-CD47 antibody Hu5F9-G4 is a novel immune checkpoint inhibitor with synergistic efficacy in combination with clinically active cancer targeting antibodies[J] Chao M P, McKenna K M, Cha A, et al., 2016).

Таким образом, разработка препаратов на основе антител с высокой аффинностью к CD47, более высокой эффективностью и меньшим количеством побочных токсических эффектов для лечения опухолей имеет большое значение.

Сущность изобретения

Авторы изобретения использовали системы экспрессии клеток млекопитающих для экспрессии рекомбинантного CD47 человека в качестве антигена для иммунизации мышей и получили клетки гибридомы путем слияния клеток селезенки мыши и клеток миеломы. Следующие линии гибридомных клеток получали путем скрининга большого количества образцов.

Авторы изобретения обнаружили, что:

Линия гибридных клеток LT012 может секретировать моноклональное антитело (названное 6F7), способное специфически связываться с CD47, и моноклональное антитело может конкурировать с рецептором SIRP α ECD-hFc-биотин за связывание с CD47, эффективно блокируя связывание SIRP α с CD47 и дополнительно способствуя фагоцитозу опухолевых клеток макрофагами.

Кроме того, авторы изобретения получили гуманизированные моноклональные антитела 6F7 (названные 6F7H1L1, 6F7H2L2 и 6F7H3L3).

Настоящее изобретение подробно описано ниже.

Один аспект настоящего изобретения относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где

антитело включает последовательности CDR, выбранные из следующих последовательностей CDR, содержащихся в переменных областях тяжелой цепи и переменных областях легкой цепи:

(1) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 2, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 4; или

(2) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 12, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 14; или

(3) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 16, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 18; или

(4) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 20, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 22;

предпочтительно, антитело включает:

HCDR1, включающую или состоящую из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью;

HCDR2, включающую или состоящую из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью;

и

HCDR3, включающую или состоящую из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью.

Антитело дополнительно содержит:

LCDR1, включающую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью;

LCDR2, включающую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью;

и

LCDR3, включающую или состоящую из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело включает:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, включающую или состоящую из:
аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, или
последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более

идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, или

аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, и

вариабельную область легкой цепи, включающую или состоящую из:

аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, или

последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4, или

аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4;

(2) вариабельную область тяжелой цепи, включающую или состоящую из:

аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12, или

последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 12, или

аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 12; и

вариабельную область легкой цепи, включающую или состоящую из:

аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14, или

последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14, или

аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14;

(3) вариабельную область тяжелой цепи, включающую или состоящую из: аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16, или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16, или

аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16; и

вариабельную область легкой цепи, включающую или состоящую из: аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18, или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 18, или

аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 18; и

(4) вариабельную область тяжелой цепи, включающую или состоящую из: аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20, или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 20, или

аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 20; и

вариабельную область легкой цепи, включающую или состоящую из: аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22, или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 22, или

аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько

(предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 22.

Аминокислотные последовательности областей CDR антител в (1)-(12) выше анализируют с помощью технических средств, хорошо известных специалистам в данной области, например, с помощью базы данных VBASE2.

Антитела 6F7, 6F7 H1L1, 6F7 H2L2 и 6F7 H3L3, описанные в настоящем документе, имеют одинаковые HCDR1-3 и LCDR1-3.

Аминокислотные последовательности 3 CDR областей переменной области тяжелой цепи являются следующими:

HCDR1: GYTFTSYW (SEQ ID NO: 5),

HCDR2: IDPSDSET (SEQ ID NO: 6), и

HCDR3: ARLYRWYFDV (SEQ ID NO: 7);

аминокислотные последовательности 3 CDR областей переменной области легкой цепи являются следующими:

LCDR1: EIVGTY (SEQ ID NO: 8),

LCDR2: GAS (SEQ ID NO: 9), и

LCDR3: GQSYNFPYT (SEQ ID NO: 10).

В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, выбраны из группы, состоящей из:

аминокислотной последовательности тяжелой цепи 6F7 H1L1 (G1M) (SEQ ID NO: 59)

аминокислотной последовательности легкой цепи 6F7 H1L1 (G1M) (SEQ ID NO: 60)

аминокислотной последовательности тяжелой цепи 6F7 H2L2 (G1M) (SEQ ID NO: 61)

аминокислотной последовательности легкой цепи 6F7 H2L2 (G1M) (SEQ ID NO: 62)

аминокислотной последовательности тяжелой цепи 6F7 H3L3 (G1M) (SEQ ID NO: 63)

аминокислотной последовательности легкой цепи 6F7 H3L3 (G1M) (SEQ ID NO: 64)

аминокислотной последовательности тяжелой цепи 6F7 H1L1 (hG4) (SEQ ID NO: 65)

аминокислотной последовательности легкой цепи 6F7 H1L1 (hG4) (SEQ ID NO: 66)

аминокислотной последовательности тяжелой цепи 6F7 H2L2 (hG4) (SEQ ID NO: 67)

аминокислотной последовательности легкой цепи 6F7 H2L2 (hG4) (SEQ ID NO: 68)

аминокислотной последовательности тяжелой цепи 6F7 H3L3 (hG4) (SEQ ID NO: 69)

69)

аминокислотной последовательности легкой цепи 6F7 H3L3 (hG4) (SEQ ID NO: 70)

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело (предпочтительно антитело 6F7) дополнительно включает FR в вариабельной области тяжелой цепи, предпочтительно FR, включающие FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4, где FR-H1 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 23, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 23; FR-H2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24; FR-H3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25; и FR-H4 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 26, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 26.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело (предпочтительно антитело 6F7) дополнительно включает FR в вариабельной области легкой цепи, предпочтительно FR, включающие FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, где FR-L1

включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 27, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 27, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 27; FR-L2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 28, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 28, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 28; FR-L3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 29, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 29; и FR-L4 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 30, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 30, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 30.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело (предпочтительно антитело 6F7 H1L1) дополнительно включает FR в вариабельной области тяжелой цепи, предпочтительно FR, включающие FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4, где FR-H1 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 31, или аминокислотной последовательности, имеющей

одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 31; FR-H2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 32, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 32, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 32; FR-H3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 33, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 33, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 33; и FR-H4 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 34, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 34, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 34.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело (предпочтительно антитело 6F7 H1L1) дополнительно включает FR в вариабельной области легкой цепи, предпочтительно FR, включающие FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, где FR-L1 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 35, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 35, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 35; FR-L2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%

или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 36, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 36; FR-L3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 37, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 37; и FR-L4 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 38, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 38, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 38.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело (предпочтительно антитело 6F7 H2L2) дополнительно включает FR в вариабельной области тяжелой цепи, предпочтительно FR, включающие FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4, где FR-H1 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 39, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 39, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 39; FR-H2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 40, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 40, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 40; FR-H3 включает или состоит из

аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 41, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 41, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 41; и FR-H4 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 42, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 42, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 42.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело (предпочтительно антитело 6F7 H2L2) дополнительно включает FR в вариабельной области легкой цепи, предпочтительно FR, включающие FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, где FR-L1 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 43, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 43, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 43; FR-L2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 44, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 44, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 44; FR-L3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 45, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной

последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 45; и FR-L4 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 46, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 46, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 46.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело (предпочтительно антитело 6F7 H3L3) дополнительно включает FR в вариабельной области тяжелой цепи, предпочтительно FR, включающие FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4, где FR-H1 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 47, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 47, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 47; FR-H2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 48, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 48, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 48; FR-H3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 49, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 49, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 49; и FR-H4 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 50, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в

SEQ ID NO: 50, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 50.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело (предпочтительно антитело 6F7 H3L3) дополнительно включает FR в вариабельной области легкой цепи, предпочтительно FR, включающие FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, где FR-L1 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 51, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 51, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 51; FR-L2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 52, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 52, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 52; FR-L3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 53, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 53; и FR-L4 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 54, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 54.

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полипептиду,

включающему последовательности, представленные в SEQ ID NO: 5, 6 и 7, где полипептид, как часть антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело, дополнительно включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8, 9 и 10.

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полипептиду, включающему последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8, 9 и 10, где полипептид, как часть антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело, дополнительно включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 5, 6 и 7.

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полипептиду, включающему последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2, 12, 16 и 20, последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, где полипептид, как часть антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело дополнительно включает последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4, 14, 18 и 22, последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью; или

один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полипептиду, включающему последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4, 14, 18 и 22, последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, где полипептид, как часть антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем моноклональное антитело дополнительно включает последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2, 12, 16 и 20, последовательность,

имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, антигенсвязывающий фрагмент выбран из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, Fab/c, фрагмента определяющей комплементарность области (CDR), одноцепочечного антитела (например, scFv), бивалентного антитела и доменного антитела.

В варианте осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело связывается с белком CD47 человека с KD менее примерно 10^{-5} М, например, менее примерно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или менее. Предпочтительно, KD измеряют с помощью анализатора молекулярного взаимодействия ForteBio.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело связывается с белком CD47 человека с EC50 менее примерно 100 нМ, например, менее примерно 10 нМ, 1 нМ, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ или 0,1 нМ или менее. В частности, EC50 измеряют непрямым ELISA.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело включает константные области, и константные области происходят из видов, отличных от мышинных, например, из человеческого антитела, предпочтительно из IgG человека, более предпочтительно из IgG1 или IgG4.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения константная область антитела является гуманизированной, например, константные области тяжелой цепи представляют собой С-области цепи гамма-1 Ig, более предпочтительно С-область цепи гамма-1 Ig под номером в GenBank ACCESSION No. P01857 (SEQ ID NO:58), или представляют собой С-области цепи гамма-4 Ig, более предпочтительно С-область цепи гамма-4 Ig под номером в GenBank ACCESSION No. P01861.1 (SEQ ID NO: 56); константные области легкой цепи представляют собой С-области каппа-цепи Ig, более предпочтительно С-область каппа-цепи Ig под номером GenBank ACCESSION No. P01834 (SEQ ID NO: 57). Антитела, раскрытые в настоящем документе, используют следующие константные области на основе переменных областей 6F7 H1L1, 6F7 H2L2 и 6F7 H3L3: константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig под номером ACCESSION No. P01857 (SEQ ID NO: 58) или константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-4 Ig под номером ACCESSION No. P01861.1 (SEQ ID NO: 56); константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig под номером ACCESSION No. P01834 (SEQ ID NO: 57). Другой аспект настоящего

изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, включающий последовательности, указанные в SEQ ID NO: 5, 6 и 7, где полипептид, как часть антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело, дополнительно включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8, 9 и 10.

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, включающий последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8, 9 и 10, где полипептид, как часть антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело, дополнительно включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 5, 6 и 7.

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, включающий последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2, 12, 16 и 20, последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, где полипептид, как часть антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело дополнительно включает последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4, 14, 18 и 22, последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью; или

один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, включающий последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4, 14, 18 и 22, последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, где полипептид, как часть антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело дополнительно включает последовательность,

выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2, 12, 16 и 20, последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью.

В частности, полинуклеотидная молекула включает или состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 19, или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью.

В частности, полинуклеотидная молекула включает или состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 21, или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к вектору, включающему любую одну из полинуклеотидных молекул, раскрытых в настоящем документе, как описано выше.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к клетке-хозяину, включающей любую одну из полинуклеотидных молекул, раскрытых в настоящем документе, или вектор, раскрытый в настоящем документе, как описано выше.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу получения любого из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в настоящем документе, как описано выше, включающему культивирование клетки-хозяина, раскрытой в настоящем документе, в подходящих условиях и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из культур клеток.

Один из аспектов настоящего изобретения дополнительно предоставляет конъюгат антитела, включающий антитело против CD47 человека или его антигенсвязывающий фрагмент, и конъюгированный фрагмент, связанный с ним, где конъюгированный фрагмент представляет собой метку очистки (например, His-метку), цитотоксический агент или детектируемую метку. Предпочтительно, конъюгированный фрагмент представляет собой радиоизотоп, люминесцентное вещество, окрашенное вещество, фермент или полиэтиленгликоль.

Один аспект настоящего изобретения дополнительно предоставляет мультиспецифическое антитело, предпочтительно биспецифическое антитело, включающее антитело против CD47 человека или его антигенсвязывающий фрагмент, и антитело или антигенсвязывающий фрагмент против другого антигена и/или другого

антигенного эпитопа.

Один аспект настоящего изобретения дополнительно предоставляет слитый белок, включающий любое из антител против CD47 человека или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в настоящем документе, как описано выше.

Один аспект настоящего изобретения дополнительно предоставляет набор, включающий любое из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в настоящем документе, или включающий конъюгат антитела, мультиспецифическое антитело или слитый белок, раскрытые в настоящем документе, как описано выше.

Предпочтительно набор дополнительно включает вторичное антитело, которое специфически распознает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; необязательно, вторичное антитело дополнительно включает детектируемую метку, такую как радиоизотоп, люминесцентное вещество, окрашенное вещество, фермент или полиэтиленгликоль.

Один аспект настоящего изобретения дополнительно предоставляет линию гибридных клеток, выбранную из линии гибридных клеток LT012 под номером ССТСС NO. 2018135, и моноклональное антитело, продуцируемое линией гибридных клеток.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению любого из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, или конъюгата антитела, мультиспецифического антитела или слитого белка, раскрытых в настоящем документе, как описано выше, для обнаружения присутствия или уровня CD47 человека в образце, или для получения набора для обнаружения присутствия или уровня CD47 человека в образце.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, включающей любое из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в настоящем документе, как описано выше, или конъюгата антитела, мультиспецифического антитела или слитого белка, раскрытых в настоящем документе, и, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению любого из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в настоящем документе, как описано выше, или конъюгата антитела, мультиспецифического антитела или слитого белка, раскрытых в настоящем документе, при получении:

лекарственного средства для блокирования связывания CD47 человека с SIRP α человека,

лекарственного средства для блокирования активности CD47 человека или снижения уровня CD47 человека, или

лекарственного средства для блокирования клеточного ответа, опосредованного связыванием SIRP α человека с CD47.

Один аспект настоящего изобретения относится к применению любого из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных выше, или конъюгата антитела,

мультиспецифического антитела или слитого белка, раскрытых в настоящем документе, при лечении опухоли или при получении лекарства для лечения опухоли.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу *in vivo* или *in vitro*, включающему введение клетки, включающей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в настоящем документе, конъюгата антитела, мультиспецифического антитела или слитого белка, раскрытого в настоящем документе, или введение субъекту, нуждающемуся в эффективном количестве любого из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано выше, или конъюгата антитела, мультиспецифического антитела или слитого белка, описанных в настоящем документе. Способ выбран из:

способа блокирования связывания CD47 с SIRP α человека,

способа блокирования активности CD47 человека или снижения уровня CD47 человека, и

способа блокирования клеточного ответа, опосредованного связыванием SIRP α человека с CD47.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ *in vitro* предназначен для нетерапевтических и/или недиагностических целей.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению любого из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в настоящем документе, или конъюгата антитела, мультиспецифического антитела или слитого белка, раскрытых в настоящем документе, как описано выше, для профилактики и/или лечения, и/или адъювантного лечения, и/или диагностики соответствующей опухоли или для получения лекарственного средства для профилактики, и/или лечения, и/или адъювантного лечения, и/или диагностики соответствующей опухоли.

В одном аспекте настоящего изобретения опухоль предпочтительно представляет собой опухоль, экспрессирующую CD47, предпочтительно рак, например, гематологическое злокачественное новообразование или солидную опухоль, более предпочтительно лимфому, рак толстой кишки или рак молочной железы, более предпочтительно неходжкинскую лимфому и еще более предпочтительно клетки В-клеточной лимфомы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное средство находится в форме, подходящей для инъекции, предпочтительно в форме, подходящей для введения путем подкожной инъекции, внутрикожной инъекции, внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции или внутриочаговой инъекции.

В настоящем изобретении, если не указано иное, научные и технические термины, используемые в настоящем документе, имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области. Кроме того, лабораторные операции по культивированию клеток, молекулярной генетике, химии нуклеиновых кислот и иммунологии, используемые в настоящем изобретении, являются рутинными операциями, широко используемыми в соответствующих областях. Между тем, чтобы лучше понять настоящее изобретение,

ниже приведены определения и пояснения соответствующих терминов.

Используемый в настоящем документе термин «антиген-связывающая область» означает белок или часть белка, которая специфически связывается с данным антигеном. Например, часть антитела, включающая аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с антигеном и придают антителу специфичность и аффинность к антигену, называется «антиген-связывающей областью». Антиген-связывающая область обычно включает одну или несколько определяющих комплементарность областей (CDR). Некоторые антиген-связывающие области дополнительно включают одну или несколько «каркасных» областей (FR). CDR представляют собой аминокислотные последовательности, которые способствуют специфичности и аффинности связывания антигена.

Используемый в настоящем описании термин «антитело» относится к интактному иммуноглобулину любого изотипа или к его антигенсвязывающему фрагменту, который может конкурировать с интактным антителом за специфичное связывание с антигеном-мишенью, и включает, например, химерные, гуманизированные, полностью гуманизированные и биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Такие «антитела» представляют собой антигенсвязывающие белки. Интактное антитело, как правило, включает по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, но в некоторых случаях может включать меньшее количество цепей, как, например, антитело, встречающееся в природе у верблюдовых, которое может включать только тяжелую цепь. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть получены только из одного источника или могут быть «химерными», то есть различные участки антитела могут быть получены из двух различных источников, как дополнительно описано ниже. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть получен в гибридомах, с помощью технологии рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. Если не указано иное, термин «антитело», помимо антител, включающих две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, также включает их производные, варианты и фрагменты.

Используемый в настоящем описании термин «антигенсвязывающий фрагмент» (или сокращенно «фрагмент») «антитела» или «цепи иммуноглобулина» (тяжелой или легкой цепи) включает часть антитела (полученного или синтезированного), в котором отсутствуют по меньшей мере, некоторые из аминокислот, присутствующих в полноразмерной цепи, но способная к специфическому связыванию с антигеном. Такие фрагменты являются биологически активными, поскольку они специфически связываются с антигеном-мишенью и могут конкурировать с другими антителами или их антигенсвязывающими фрагментами за специфическое связывание с данным эпитопом. В одном аспекте такие фрагменты будут сохранять по меньшей мере одну CDR, присутствующую в полноразмерной легкой или тяжелой цепи антитела, и в некоторых вариантах осуществления будут содержать одну тяжелую и/или легкую цепь или ее часть.

Такие биологически активные фрагменты могут быть получены с помощью технологии рекомбинантной ДНК или, например, путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. Иммунологически функциональные фрагменты иммуноглобулина включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab', F(ab')₂, Fab/c, dAb, Fv, доменные антитела и одноцепочечные антитела, и могут быть получены из любого источника млекопитающего, включая, но не ограничиваясь ими, человека, мышь, крысу, верблюдовых и кролика. Кроме того, предполагается, что функциональная часть антитела, раскрытого в настоящем документе, такая как одна или несколько CDR, может быть ковалентно связана со вторым белком или малой молекулой для создания терапевтического средства, направленного на конкретную мишень в организме, тем самым обладающего бифункциональными терапевтическими свойствами или обладающего увеличенным периодом полужизни в сыворотке, такого как, слитый белок.

Используемые в настоящем описании термины «полноразмерная цепь антитела», «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «целое антитело» используются в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, по существу аналогичную структуре природного антитела, или имеющего тяжелую цепь в области Fc, как определено в настоящем документе.

Термин «легкая цепь» включает полноразмерные легкие цепи и их фрагменты с последовательностями варибельной области, достаточными для обеспечения специфичности связывания. Полноразмерная легкая цепь включает домен варибельной области, V_L, и домен константной области, C_L. Домен варибельной области легкой цепи находится на аминоконце полипептида. Легкие цепи включают каппа(κ)-цепи и лямбда(λ)-цепи.

Термин «тяжелая цепь» включает полноразмерные тяжелые цепи и их фрагменты с последовательностями варибельной области, достаточными для обеспечения специфичности связывания. Полноразмерная тяжелая цепь включает домен варибельной области V_H и 3 домена константной области C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}. Домен V_H находится на аминоконце полипептида и домены C_H находятся на карбоксиконце, при этом C_{H3} находится ближе всех к карбоксиконцу полипептида. Тяжелые цепи могут быть любого изотипа, включая IgG (включая подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая подклассы IgA1 и IgA2), IgM и IgE.

Используемый в настоящем описании термин «Fab-фрагмент» состоит из одной легкой цепи, C_{H1} и варибельной области одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидные связи с другой молекулой тяжелой цепи.

Используемый в настоящем описании термин «Fc»-область содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены C_{H1} и C_{H2} антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе посредством двух или более дисульфидных связей и посредством гидрофобных взаимодействий доменов C_{H3}.

Используемый в настоящем описании термин "Fab'-фрагмент" содержит одну легкую цепь и часть одной тяжелой цепи (содержащую домен V_H, домен C_{H1} и часть

области между доменами C_{H1} и C_{H2}), так что межцепную дисульфидную связь можно сформировать между двумя тяжелыми цепями двух фрагментов Fab' с образованием молекулы $F(ab')_2$.

Используемый в настоящем описании термин " $F(ab')_2$ -фрагмент" содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие части константной области между доменами C_{H1} и C_{H2} , так что межцепная дисульфидная связь образуется между двумя тяжелыми цепями. Таким образом, фрагмент $F(ab')_2$ состоит из двух фрагментов Fab', которые удерживаются вместе посредством дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями.

Используемый в настоящем описании термин "Fv-область" содержит переменные области тяжелой и легкой цепей, но не имеет константных областей.

Используемый в настоящем описании термин фрагмент «Fd» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_H и C_{H1} (Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989)).

Используемый в настоящем описании термин фрагмент "dAb" состоит из доменов V_H (Ward et al., Nature 341:544-546 (1989)).

Используемый в настоящем описании термин "Fab'-SH" представляет собой обозначение в настоящем документе для Fab', где один или несколько остатков цистеина константного домена несут свободную тиольную группу.

Используемый в настоящем описании термин фрагмент "Fab/c" представляет собой промежуточное соединение, образованное перевариванием иммуноглобулина пепсином, и сочетает в себе преимущества областей Fab и Fc, т.е. сильную диффузию и низкий метаболический клиренс *in vivo*, при сохранении высокой аффинности (Liu Jianjun, Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 1989(4):29-29).

Используемый в настоящем описании термин «одноцепочечное антитело» представляет собой молекулу Fv, в которой переменные области тяжелой и легкой цепи соединены гибким линкером с образованием единой полипептидной цепи (которая образует антигенсвязывающую область) (см., например, Bird et al., Science, 242:423-426 (1988), and Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:5879-5883 (1988)). Одноцепочечные антитела подробно описаны в международной патентной публикации No. WO 88/01649 и патенте США No. 4946778 и 5260203, описания которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

Используемый в настоящем описании термин "доменное антитело" представляет собой иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, который включает только переменную область тяжелой цепи или легкой цепи, включая мультивалентные доменные антитела или бивалентные доменные антитела. В некоторых случаях две или более области V_H ковалентно связаны пептидным линкером с образованием мультивалентного доменного антитела (в частности, бивалентного доменного антитела). Две области V_H бивалентного доменного антитела могут нацеливаться на одинаковые или различные антигены.

Используемый в настоящем описании термин "бивалентный антигенсвязывающий

белок" или "бивалентное антитело" содержит два антигенсвязывающих сайта. В некоторых случаях два сайта связывания имеют одинаковую специфичность к антигену. Бивалентное антитело может быть биспецифическим.

Используемый в настоящем описании термин "мультиспецифический антигенсвязывающий белок" или "мультиспецифическое антитело" представляет собой антигенсвязывающий белок или антитело, которое нацелено на более чем один антиген или эпитоп.

Используемый в настоящем описании термин «биспецифический», «двойной специфичности» или «бифункциональный» антигенсвязывающий белок или антитело представляет собой слитый антигенсвязывающий белок или антитело, имеющее два разных антигенсвязывающих сайта, соответственно. Биспецифическое антитело представляет собой мультиспецифический антигенсвязывающий белок или мультиспецифическое антитело, и может быть получено различными способами, включая, но не ограничиваясь ими, слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai and Lachmann, 1990, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321; Kostelny et al., 1992, *J. Immunol.*, 148:1547-1553. Два сайта связывания биспецифического антигенсвязывающего белка или антитела будут связываться с двумя различными эпитопами, присутствующими в одинаковых или различных белках-мишенях.

Используемые в настоящем описании термины «mAb» и «моноклональное антитело» относятся к антителу или фрагменту антитела, которое происходит из группы высокомолекулярных антител, то есть из группы идентичных молекул антител, за исключением естественных мутаций, которые могут возникать спонтанно. Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью к одному эпитопу на антигене. Поликлональное антитело по сравнению с моноклональным антителом обычно включает по меньшей мере два или несколько различных антител, которые обычно распознают различные эпитопы на антигене. Моноклональные антитела обычно можно получить с использованием гибридомного метода, впервые описанного Kohler et al. (*Nature*, 256:495, 1975), но также может быть получено с использованием технологии рекомбинантной ДНК (см., например, патент США No. 4816567).

Используемый в настоящем описании термин "гуманизованное антитело" относится к антителу или фрагменту антитела, полученному, когда все или часть областей CDR человеческого иммуноглобулина (антитела к рецептору) заменены областями CDR антитела нечеловеческого происхождения (донорское антитело), где донорское антитело может быть антителом нечеловеческого происхождения (например, мышинное, крысиное или кроличье), имеющим ожидаемую специфичность, аффинность или реактивность. Кроме того, некоторые аминокислотные остатки в каркасных областях (FR) антитела к рецептору также могут быть заменены аминокислотными остатками соответствующих антител нечеловеческого происхождения или аминокислотными остатками других антител для дополнительного улучшения или оптимизации свойств антитела. Подробнее о гуманизованных антителах см., например, Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986);

Reichmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992); and Clark, *Immunol. Today*, 21:397-402 (2000).

Используемый в настоящем описании термин «эпитоп» относится к участку на антигене, с которым иммуноглобулин или антитело специфически связываются. «Эпитоп» также называют «антигенной детерминантой». Эпитоп или антигенная детерминанта обычно состоит из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты, углеводы или боковые цепи сахаров, и обычно имеет специфические трехмерные структурные характеристики и специфические характеристики заряда. Например, эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 последовательных или непоследовательных аминокислот в уникальной пространственной конформации, который может быть «линейным» или «конформационным». См. например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996). В линейном эпитопе все сайты взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (например, антителом) расположены линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе сайты взаимодействия расположены поперек аминокислотных остатков белка, которые отделены друг от друга.

Термины «полипептид» или «белок» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимера аминокислотных остатков. Этот термин также используется для обозначения аминокислотного полимера, в котором один или несколько аминокислотных остатков являются аналогами или миметиками существующих в природе аминокислот, а также для существующих в природе аминокислотных полимеров. Термин может также включать, например, аминокислотные полимеры, которые были модифицированы добавлением сахаридных остатков с образованием гликопротеинов или были фосфорилированы. Полипептиды и белки могут быть продуцированы существующими в природе клетками и рекомбинантными клетками; или они могут быть получены с помощью генной инженерии или рекомбинантных клеток и содержать молекулу, имеющую аминокислотную последовательность нативного белка, или молекулу, имеющую делеции, вставки и/или замены в одной или нескольких аминокислотах нативной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления термины «полипептид» и «белок», в частности, включают антитела, такие как антитела против CD47 человека (также называемые антителами против CD47), CD47-связывающие белки или их варианты, например, антитела или последовательности, имеющие делеции, вставки и/или замены одной или нескольких аминокислот.

Термин «полипептидный фрагмент» относится к полипептиду, имеющему аминоконцевую делецию, карбокси-концевую делецию и/или внутреннюю делецию по сравнению с полноразмерным белком. Такие фрагменты могут также содержать модифицированные аминокислоты по сравнению с полноразмерным белком. В некоторых вариантах осуществления такие фрагменты имеют длину примерно от 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50,

70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот. Полезные полипептидные фрагменты включают иммунологически функциональные фрагменты антител, включая связывающие домены. В случае антител к CD47 человека полезные фрагменты включают, но не ограничиваются ими, области CDR, вариабельные домены тяжелых или легких цепей, участки цепей антител, вариабельные домены, включающие только 2 CDR, и тому подобное.

«Производное» полипептида представляет собой полипептид (например, антигенсвязывающий белок или антитело), который химически модифицирован другими способами, кроме вставки, делеции или замены, например, путем конъюгирования с другим химическим фрагментом, например, PEG-конъюгированный полипептид.

Используемый в настоящем описании термин «выделенный» относится к полученному искусственным путем из естественного состояния. Если в природе появляется определенное «выделенное» вещество или компонент, это может означать, что в его естественной среде происходят изменения, или то, что оно выделено из естественной среды, или и то, и другое. Например, определенный невыделенный полинуклеотид или полипептид встречается в природе у определенного живого животного, и тот же полинуклеотид или полипептид с высокой чистотой, выделенный в таком естественном состоянии, называется выделенным полинуклеотидом или полипептидом. Термин «выделенный» не исключает наличия искусственных или синтетических веществ или других примесей, не влияющих на активность вещества.

Используемый в настоящем описании термин «вектор» относится к носителю нуклеиновой кислоты, в который может быть вставлен полинуклеотид. Когда вектор допускает экспрессию белка, кодируемого вставленным полинуклеотидом, вектор называется вектором экспрессии. Вектор может быть введен в клетку-хозяин путем трансформации, трансдукции или трансфекции, так что элементы генетического вещества, переносимые вектором, могут быть экспрессированы в клетке-хозяине. Векторы хорошо известны специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь ими: плазмиды; фагмиды; космиды; искусственные хромосомы, такие как искусственная хромосома дрожжей (YAC), искусственная бактериальная хромосома (BAC) или искусственная хромосома на основе P1 (PAC); фаги, такие как лямбда-фаги или фаги M13; и вирусы животных. Вирусы животных, которые могут использоваться в качестве векторов, включают, но не ограничиваются ими, ретровирусы (включая лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса (такие как вирус простого герпеса), поксвирусы, бакуловирусы, вирусы папилломы и паповавирусы (такие как SV40). Вектор может содержать множество элементов, которые контролируют экспрессию, включая, но не ограничиваясь ими, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, элементы отбора и репортерные гены. Кроме того, вектор может дополнительно содержать сайт инициации репликации.

Используемый в настоящем описании термин «клетка-хозяин» относится к клеткам, в которые могут быть введены векторы, включая, но не ограничиваясь ими,

прокариотические клетки, такие как *E. coli* или *B. subtilis*, клетки грибов, такие как дрожжевые клетки или *aspergillus*, клетки насекомых, такие как клетки дрозофилы S2 или Sf9, или клетки животных, такие как фибробласты, клетки CHO, клетки COS, клетки NSO, клетки HeLa, клетки ВНК, клетки НЕК 293 или клетки человека.

Используемый в настоящем описании термин «специфически связывает» относится к неслучайной реакции связывания между двумя молекулами, например, реакции между антителом и антигеном, на который оно нацелено. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с антигеном (или антитело, которое специфично для антигена), относится к антителу, которое связывается с антигеном с аффинностью (K_D) менее примерно 10^{-5} М, например, менее чем примерно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или менее.

Используемый в настоящем описании термин « K_D » относится к константе равновесия диссоциации для специфического взаимодействия антитело-антиген, которая используется для описания аффинности связывания между антителом и антигеном. Среди нескольких параметров, измеряемых кинетикой связывания молекул, значение K_D представляет собой константу равновесия диссоциации. В исследованиях лекарственных средств на основе антител это параметр, характеризующий уровень аффинности между интересующим антителом и молекулой антигена-мишени, и рассчитывается как $K_D = k_{dis}/k_{on}$. Меньшая константа равновесной диссоциации указывает на более тесное связывание антитело-антиген и более высокое сродство между антителом и антигеном. k_{on} (константа скорости ассоциации) представляет собой скорость образования комплекса антиген-антитело, и меньшее значение k_{on} предполагает более быстрое связывание антитела с антигеном. k_{dis} (константа скорости диссоциации) представляет собой скорость, с которой антитело диссоциирует от комплекса антиген-антитело, и меньшее значение k_{dis} предполагает более медленную скорость диссоциации антитела от антигена и более прочное связывание между антителом и антигеном. Обычно антитело связывается с антигеном (например, белком L1) с константой равновесия диссоциации (K_D) менее примерно 10^{-5} М, например, менее примерно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или менее, например, как определено на приборе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) BIACORE или приборе молекулярного взаимодействия ForteBio.

Используемые в настоящем описании термины «моноклональное антитело» и «McAb» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо; термины «поликлональное антитело» и «PcAb» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо; термины «полипептид» и «белок» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо. Кроме того, в настоящем документе аминокислоты обычно представлены однобуквенными и трехбуквенными сокращениями, известными в данной области. Например, аланин может быть представлен как A или Ala.

Используемые в настоящем описании термины «гибридома» и «линия гибридных клеток» могут использоваться взаимозаменяемо, и при упоминании терминов «гибридома» и «линия гибридных клеток» также включают субклоны и

клетки потомства гибридомы.

Используемый в настоящем описании термин «процент идентичности последовательностей» и «процент гомологии последовательностей» используются взаимозаменяемо.

Используемые в настоящем описании термины «сходство», «сходство последовательностей» и «идентичность» относятся к корреляции между последовательностями двух или более молекул белка или полипептида, как определено путем выравнивания и сравнения последовательностей. «Процент идентичности» относится к проценту идентичных аминокислотных остатков в сравниваемых молекулах и может быть рассчитан на основе размера наименьшей сравниваемой молекулы. Для таких расчетов гэпы в выравнивании (если таковые имеются) должны быть устранены с помощью конкретной математической модели или компьютерной программы (то есть «алгоритма»). Термин «существенная идентичность», когда он используется для полипептидов, означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с использованием программ GAP или BESTFIT, с использованием массы гэпов по умолчанию, предоставляемых программами, обладают по меньшей мере 70%, 75% или 80% идентичностью последовательности, по меньшей мере 90% или 95% идентичностью последовательности или по меньшей мере 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности. В некоторых случаях положения остатков, которые являются неидентичными, различаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком, имеющим R-группу боковой цепи, которая обладает сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофильностью). Обычно консервативные аминокислотные замены по существу сохраняют функции и свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательностей может быть повышен для корректировки консервативного характера замены. Способы выполнения этой регулировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 243:307-31 (1994). Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают: 1) алифатическую гидроксильную боковую цепь: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин, 2) алифатическую гидроксильную боковую цепь: серин и треонин, 3) боковую цепь, содержащую амид: аспарагин и глутамин, 4) ароматическую боковую цепь: фенилаланин, тирозин и триптофан, 5) основную боковую цепь: лизин, аргинин и гистидин, 6) кислотную боковую цепь: аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота, и 7) серосодержащую боковую цепь: цистеин и метионин. Например, группы консервативных аминокислотных замен представляют собой валин-лейцин-изолейцин-глицин-аланин, фенилаланин-тирозин, треонин-серин, лизин-аргинин, глутаминовая кислота-аспарагиновая кислота и аспарагин-глутамин.

Необязательно, консервативная замена представляет собой любое изменение с

положительным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al., *Science*, 256:1443-45 (1992), которая включена в настоящий документ посредством ссылки. «Умеренно консервативная» замена представляет собой любое изменение с неотрицательным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Идентичность последовательностей полипептидов обычно измеряется с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет последовательности с использованием меры сходства, приписываемой различным заменам, делециям и другим модификациям (включая консервативные аминокислотные замены). Например, GCG, включая программы, такие как «Gap» и «Bestfit», которые (с использованием параметров по умолчанию, заданных программой) могут использоваться для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами (например, гомологичные полипептиды из разных биологических видов) или между белком дикого типа и его мутантным белком. См., например, GCG Version 6.1 (University of Wisconsin, WI). Последовательности полипептидов также можно сравнивать с помощью FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными. См. GCG Version 6.10 FASTA (например, FASTA2 и FASTA3), который обеспечивает выравнивание областей оптимального перекрытия между проверяющей и запрашиваемой последовательностями и процент идентичностей последовательностей (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 132:185-219 (2000)). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательностей с базой данных, содержащей последовательности массивов от различных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности, blastp или tblastn (с использованием параметров по умолчанию, предоставляемых программой). См., например, Altschul et al., *Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-402 (1997).

По сравнению с предшествующим уровнем техники настоящее изобретение имеет следующие преимущества:

Анти-CD47 моноклональное антитело, рассматриваемое в настоящем документе, может эффективно блокировать связывание SIRP α с CD47 за счет специфического связывания с CD47, способствуя тем самым фагоцитозу опухолевых клеток макрофагами. Аффинность антитела (такого как 6F7 H1L1), описанного в настоящем документе, к CD47 опухолевых клеток сравнима с аффинностью контрольного антитела Hu5F9-G4, в то время как аффинность к нормальным эритроцитам человека ниже, чем аффинность контрольного антитела Hu5F9-G4. Таким образом, антитело, раскрытое в настоящем документе, обладает лучшим потенциалом для лечения опухолей за счет максимально возможного предотвращения воздействия на нормальные эритроциты человека.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На фиг. 1 показаны результаты анализа активности связывания 6F7 H1L1(hG4) с человеческим CD47 IgV TEV-His.

На фиг. 2 показаны результаты анализа активности связывания 6F7 H1L1(G1M) с человеческим CD47 IgV TEV-His, где 6F7 H1L1(hG1DM) представляет собой 6F7 H1L1(G1M).

На фиг. 3 показаны результаты анализа активности конкурентного связывания 6F7 H1L1(hG4) против человеческого SIRP α ECD-hFc-Биотин в отношении человеческого CD47 IgV TEV-His.

На фиг. 4 показаны результаты анализа активности конкурентного связывания 6F7 H1L1(G1M) против человеческого SIRP α ECD-hFc-Биотин в отношении человеческого CD47 IgV TEV-His, где 6F7 H1L1(hG1DM) представляет собой 6F7 H1L1(G1M).

На фиг. 5 показаны результаты определения константы аффинности мышинового антитела 6F7 в отношении человеческого CD47.

На фиг. 6 показаны результаты определения константы аффинности 6F7 H1L1(hG4) в отношении человеческого CD47.

На фиг. 7 показаны результаты определения константы аффинности Hu5F9-G4 в отношении человеческого CD47.

На фиг. 7 представлена кривая связывания 6F7 H1L1(G1M) с эритроцитами человека (FACS).

На фиг. 9 представлена активность связывания 6F7 H1L1(G1M) с опухолевыми клетками Raji (FACS).

На фиг. 10 показан анализ активности конкурентного связывания 6F7 H1L1(G1M) против SIRP в отношении LOVO (FACS).

На фиг. 11 показана агглютинация эритроцитов человека антителом 6F7 H1L1(G1M).

На фиг. 12 представлена кривая связывания 6F7 H1L1(hG4) с эритроцитами человека (FACS).

На фиг. 13 показана активность связывания 6F7 H1L1(hG4) с опухолевыми клетками Raji (FACS).

На фиг. 14 показана активность конкурентного связывания 6F7 H1L1(hG4) против SIRP в отношении опухолевых клеток Raji (FACS).

На фиг. 15 представлена кривая связывания 6F7 H1L1(hG4) с опухолевыми клетками LOVO (FACS).

На фиг. 16 показан анализ активности конкурентного связывания 6F7 H1L1(hG4) против SIRP в отношении LOVO (FACS).

На фиг. 17 показана агглютинация эритроцитов человека анти-CD47 антителом.

На фиг. 18 показан терапевтический эффект 6F7 H1L1(hG4) на подкожно трансплантированные опухоли MDA-MB-231.

На фиг. 19 показаны изменения концентрации гемоглобина после однократного введения 6F7 6F7 H1L1(hG4) и Hu5F9-G4 яванским макакам.

На фиг. 20 показаны изменения гематокрита после однократного введения 6F7 H1L1(hG4) и Hu5F9-G4 яванским макакам.

Примечания по депонированию биологических материалов:

Линия гибридных клеток LT012 была депонирована в China Center for Type Culture Collection (CCTCC) 21 июня 2018 г., с номером доступа CCTCC NO. C2018135, адрес депозитария Wuhan University, Wuhan, China, почтовый индекс: 430072.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Варианты осуществления настоящего изобретения будут подробно описаны ниже со ссылкой на примеры. Специалистам в данной области понятно, что следующие примеры предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения. В случаях, когда методы или условия не указаны, примеры выполняли в соответствии с методами или условиями, описанными в литературе в данной области (например, см., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, authored by J. Sambrook et al., and translated by Huang Peitang et al., Third Edition, Science Press) или в соответствии с руководством по обращению с продуктом. Используемые реагенты или инструменты являются коммерчески доступными обычными продуктами, если их производители не указаны.

В следующих примерах настоящего изобретения мышей BALB/C приобретали в Guangdong Medical Laboratory Animal Center.

Контрольный лекарственный препарат на основе антитела представлял собой Hu5F9-G4 (синтезированный Zhongshan Akeso Biopharma Ltd., с использованием последовательности CD47 антитела Hu5F9-G4 от Forty Seven, Inc., т.е., с использованием SEQ ID NO:37 из US20150183874 в качестве варибельной области тяжелой цепи, SEQ ID NO:42 в качестве варибельной области легкой цепи, и константной области цепи гамма-4 Ig (GenbankID: P01861.1)).

Пример 1: Получение антитела против CD47 человека 6F7

1. Получение линии гибридных клеток 6F7

Антигены, использованные для получения анти-CD47-антитела линии гибридных клеток 6F7, представляли собой CD47 IgV TEV-His (включая зрелый пептид CD47 человека в положениях 19-141 GenbankID: NP 942088.1 и TEV (аминокислотная последовательность: ENLYFQG, SEQ ID NO: 74)-his-tag слитый белок, синтезированный Zhongshan Akeso Biopharma Ltd.) и клетки 3T3-CD47 (NIH/3T3, производитель: ATCC, Cat. No: CRL-1658; зрелый пептид CD47 человека трансфицировали в клетки на основе NIH/3T3 для конструирования стабильной линии экспрессии). Клетки селезенки иммунизированных мышей сливали с клетками миеломы мышей для получения гибридных клеток. С CD47 IgV TEV-His и 3T3-CD47 клетками, взятыми отдельно в качестве антигенов, гибридные клетки подвергали скринингу с помощью непрямого ELISA для получения гибридных клеток, способных секретировать антитела, способные специфически связываться с CD47. Гибридные клетки, полученные с помощью скрининга ELISA, подвергали скринингу с помощью конкурентного ELISA для получения линии гибридных клеток, способной секретировать моноклональное антитело, способное конкурировать за связывание CD47 IgV TEV-His с рецептором

человеческого SIRP α ECD-hFc-биотин (SIRP α ECD относится к внеклеточному участку SIRP α , положения 31-373 белка GenBank Accession No. NP_542970.1; hFc относится к Fc метке очистки человеческого IgG, в частности к C-области цепи гамма-1 Ig, положения 114-330 GenbankID: P01857), которую затем подвергали предельному разведению для получения стабильной линии гибридных клеток. Линию гибридных клеток обозначали как линия гибридных клеток LT012, и секретируемое ею моноклональное антитело обозначали как 6F7.

Линия гибридных клеток LT012 (CD47-6F7) была депонирована в China Center for Type Culture Collection (CCTCC) 21 июня 2018 г., с номером доступа CCTCC NO. C2018135, адрес депозитария Wuhan University, Wuhan, China, почтовый индекс: 430072.

2. Получение анти-CD47-антитела 6F7

Линии клеток LT011, LT012 и LT015, полученные выше, культивировали отдельно в среде с определенным химическим составом (среда CD, содержащая 1% стрептомицина) в инкубаторе с 5% CO₂, 37°C. Через 7 дней супернатанты собирали и очищали с помощью высокоскоростного центрифугирования и вакуумного фильтрования через микрофильтрационную мембрану и через колонку HiTrap protein A HP для получения антитела 6F7.

Пример 2: Анализ последовательности анти-CD47-антитела 6F7

мРНК экстрагировали из клеточной линии LT012, культивированной в примере 1, в соответствии со способом, описанным в руководстве к набору RNAPrep pure Cell/Bacteria (Tiangen, Cat. No. DP430).

кДНК синтезировали в соответствии с руководством Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System для ОТ-ПЦР и амплифицировали с помощью ПЦР.

ПЦР-амплифицированные продукты подвергали непосредственному клонированию TA в соответствии с инструкцией к набору для клонирования pEASY-T1 (Transgen CT101).

TA-клонированные продукты непосредственно секвенировали, и результаты секвенирования следующие:

Последовательность нуклеиновой кислоты варибельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 1 с длиной 351 п.о.

Кодированная аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 2 с длиной 117 аминокислот, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты варибельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 3 с длиной 321 п.о.

Кодированная аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 4 с длиной 107 аминокислот, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи представлены в SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно.

Пример 3: Конструирование и получение легких и тяжелых цепей гуманизированных антител против CD47 человека 6F7 H1L1(hG4), 6F7 H2L2(hG4) и 6F7

H3L3(hG4)

1. Конструирование легкой и тяжелой цепей гуманизированных антител против CD47 человека 6F7 H1L1(hG4), 6F7 H2L2(hG4) и 6F7 H3L3(hG4)

На основе трехмерной кристаллической структуры белка CD47 человека (Hage T, Reinemer P, Sebald W., Crystals of a 1:1 Complex Between Human Interleukin-4 and the Extracellular Domain of Its Receptor Alpha Chain, Eur. J. Biochem., 1998; 258(2):831-6.) и последовательности антитела 6F7, полученной в примере 2, получали последовательности переменной области антител 6F7H1L1, 6F7 H2L2 и 6F7 H3L3 с помощью компьютерного моделирования и конструирования мутации (последовательности константной области антитела из базы данных NCBI: константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-4 Ig, ACCESSION No. P01861.1; константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, ACCESSION No. P01834).

Сконструированные последовательности переменной области следующие:

(1) Последовательности переменной области тяжелой и легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 6F7 H1L1

Последовательность нуклеиновой кислоты переменной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 11 с длиной 351 п.о.

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 12 с длиной 117 аминокислот, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты переменной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 13 с длиной 321 п.о.

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 14 с длиной 107 аминокислот, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи представлены в SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно.

(2) Последовательности переменной области тяжелой и легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 6F7 H2L2

Последовательность нуклеиновой кислоты переменной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 15 с длиной 351 п.о.

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 16 с длиной 117 аминокислот, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты переменной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 17 с длиной 321 п.о.

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 18 с длиной 107 аминокислот, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи представлены в SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно.

(3) Последовательности переменной области тяжелой и легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 6F7 H3L3

Последовательность нуклеиновой кислоты варибельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 19 с длиной 351 п.о.

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 20 с длиной 117 аминокислот, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты варибельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 21 с длиной 321 п.о.

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 22 с длиной 107 аминокислот, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи представлены в SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно.

2. Получение гуманизированных антител 6F7 H1L1(hG4), 6F7 H2L2(hG4) и 6F7 H3L3(hG4)

Константные области тяжелой цепи представляют собой С-область цепи гамма-4 Ig, ACCESSION: P01861.1; константные области легкой цепи представляют собой С-область каппа-цепи Ig, ACCESSION: P01834.

кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 6F7 H1L1(hG4), кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 6F7 H2L2(hG4) и кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 6F7 H3L3(hG4) отдельно клонировали в векторы pUC57simple (предоставленные Genscript) для получения pUC57simple-6F7H1, pUC57simple-6F7L1; pUC57simple-6F7H2, pUC57simple-6F7L2; и pUC57simple-6F7H3, pUC57simple-6F7L3, соответственно. Со ссылкой на стандартные методики, описанные в Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition), полноразмерные гены тяжелой и легкой цепи, синтезированные расщеплением EcoRI&HindIII генов, субклонировали в вектор экспрессии pcDNA3.1 путем рестрикции EcoRI&HindIII расщепления с получением экспрессионных плазмид pcDNA3.1-6F7H1, pcDNA3.1-6F7L1, pcDNA3.1-6F7H2, pcDNA3.1-6F7L2, pcDNA3.1-6F7H3 и pcDNA3.1-6F7L3, и далее секвенировали гены тяжелой и легкой цепей рекомбинантных экспрессионных плазмид. Затем сконструированные комбинации генов, включающие соответствующие рекомбинантные плазмиды с легкой и тяжелой цепями (pcDNA3.1-6F7H1/pcDNA3.1-6F7L1, pcDNA3.1-6F7H2/pcDNA3.1-6F7L2 и pcDNA3.1-6F7H3/pcDNA3.1-6F7L3) отдельно котрансфицированы в клетки 293F, и культуральные растворы собирали и очищали. Затем последовательности верифицировали, получали свободные от эндотоксина экспрессионные плазмиды, и временно трансфицировали в клетки HEK293 для экспрессии антител. Культуральные растворы собирали через 7 дней и подвергали аффинной очистке на колонке с белком А (MabSelect SURE (GE)) для получения гуманизированных антител.

Пример 4: Конструирование и получение легких и тяжелых цепей гуманизированных антител против CD47 человека 6F7 H1L1(G1M), 6F7 H2L2(G1M) и 6F7 H3L3(G1M)

1. Конструирование легкой и тяжелой цепей гуманизированных антител против CD47 человека 6F7 H1L1(G1), 6F7 H2L2(G1) и 6F7 H3L3(G1)

На основе трехмерной кристаллической структуры белка CD47 человека (Hage T, Reinemer P, Sebald W., Crystals of a 1:1 Complex Between Human Interleukin-4 and the Extracellular Domain of Its Receptor Alpha Chain, *Eur. J. Biochem.*, 1998; 258(2):831-6.) и последовательности антитела 6F7, полученной в примере 2, получали последовательности переменной области антител 6F7H1L1, 6F7 H2L2 и 6F7 H3L3 с помощью компьютерного моделирования и конструирования мутации (последовательности константной области антитела из базы данных NCBI: константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig, ACCESSION No. P01857; константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, ACCESSION No. P01834). Для отличия от гуманизированных антител в примере 3, гуманизированные антитела, указанные выше, были обозначены как 6F7 H1L1(G1), 6F7 H2L2(G1) и 6F7 H3L3(G1).

Последовательности переменной области гуманизированных антител 6F7 H1L1(G1), 6F7 H2L2(G1) и 6F7 H3L3(G1), сконструированных в этом примере, были идентичны последовательностям 6F7 H1L1(hG4), 6F7 H2L2(hG4) и 6F7 H3L3(hG4) в примере 3.

2. Получение гуманизированных антител 6F7 H1L1(G1), 6F7 H2L2(G1) и 6F7 H3L3(G1)

Все константные области тяжелой цепи представляют собой С-область цепи гамма-1 Ig, ACCESSION: P01857; все константные области легкой цепи представляют собой С-область каппа-цепи Ig, ACCESSION: P01834.

кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 6F7 H1L1, кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 6F7 H2L2, и кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 6F7 H3L3 отдельно клонировали в векторы pUC57simple (предоставленные Genscript) для получения pUC57simple-6F7H1, pUC57simple-6F7L1; pUC57simple-6F7H2, pUC57simple-6F7L2; и pUC57simple-6F7H3, pUC57simple-6F7L3, соответственно. Со ссылкой на стандартные методики, описанные в *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition)*, полноразмерные гены тяжелой и легкой цепи, синтезированные расщеплением EcoRI&HindIII генов, субклонировали в вектор экспрессии pcDNA3.1 путем рестрикции EcoRI&HindIII расщепления с получением экспрессионных плазмид pcDNA3.1-6F7H1, pcDNA3.1-6F7L1, pcDNA3.1-6F7H2, pcDNA3.1-6F7L2, pcDNA3.1-6F7H3 и pcDNA3.1-6F7L3, и далее секвенировали гены тяжелой и легкой цепей рекомбинантных экспрессионных плазмид. Затем сконструированные комбинации генов, включающие соответствующие рекомбинантные плазмиды с легкой и тяжелой цепями (pcDNA3.1-6F7H1/pcDNA3.1-6F7L1, pcDNA3.1-6F7H2/pcDNA3.1-6F7L2, и pcDNA3.1-6F7H3/pcDNA3.1-6F7L3) отдельно котрансфицированы в клетки 293F, и культуральные растворы собирали и очищали. Затем последовательности верифицировали, получали свободные от эндотоксина экспрессионные плазмиды, и временно трансфицировали в клетки HEK293 для экспрессии антител. Культуральные растворы собирали через 7 дней и подвергали аффинной очистке на колонке с белком А (MabSelect SURE (GE)) для

получения гуманизированных антител.

3. Конструирование аминокислотных мутаций невариабельной области на основе гуманизированных антител 6F7 H1L1(G1), 6F7 H2L2(G1) и 6F7 H3L3(G1)

На основе 6F7 H1L1(G1), 6F7 H2L2(G1) и 6F7 H3L3(G1), получали новые гуманизированные антитела путем введения точечной мутации лейцин на аланин по положению 234 (L234A) и точечной мутации лейцин на аланин по положению 235 (L235A) в шарнирной области тяжелой цепи и были обозначены 6F7 H1L1(G1M), 6F7 H2L2(G1M) и 6F7 H3L3(G1M), соответственно.

Пример 5: Анализ связывающей активности антител с антигенами с помощью ELISA

1. Анализ связывающей активности антитела 6F7 H1L1(hG4) с антигеном человеческого CD47 IgV TEV-His с помощью ELISA

Экспериментальные процедуры: Микропланшет покрывали 2 мкг/мл человеческого CD47 IgV TEV-His и инкубировали при 4°C в течение 12 ч. Покрытый антигеном микропланшет промывали 3 раза PBS, и затем блокировали 1% BSA в PBS в течение 2 ч. Микропланшет промывали 3 раза PBS. В лунки микропланшета добавляли антитело, серийно разведенное раствором PBST, градиенты разведения для антител приведены в таблице 2. Микропланшет, содержащий тестируемое антитело, инкубировали при 37°C в течение 30 мин и затем промывали 3 раза PBST. Добавляли HRP-меченный рабочий раствор вторичного антитела козы против человеческого IgG (H+L) (приобретенный у Jackson ImmunoResearch Inc., Cat. No.: 109-035-088), разведенный в соотношении 1:5000, и микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Микропланшет промывали 3 раза PBST. TMB (Neogen, 308177) добавляли для проявления цвета в течение 5 мин в темноте, и затем проявление цвета останавливали добавлением стоп-раствора. Затем микропланшет немедленно помещали в устройство для считывания микропланшетов и значение оптической плотности (OD) каждой лунки в микропланшете считывали при 450 нм. Данные анализировали с помощью SoftMax Pro 6.2.1.

Результаты определения связывания антитела 6F7 H1L1(hG4) с антигеном CD47 IgV TEV-His человека показаны на фиг. 1. Значения OD для всех дозировок показаны в таблице 1. EC₅₀ связывания антитела рассчитывали путем подбора кривой, используя концентрацию антитела по оси абсцисс и значение поглощения по оси ординат, и результаты представлены в таблице 1 ниже, и результаты представлены в таблице 1, ниже.

Результаты показывают, что EC₅₀ связывания 6F7 H1L1(hG4) с человеческим CD47 IgV TEV-His составляет 0,078 нМ, что сравнимо с Hu5F9-G4.

Таблица 1. Результаты анализа связывающей активности 6F7 H1L1(hG4) с человеческим CD47 IgV TEV-His

Разведение антител (мкг/мл)	Покрывающий антиген: человеческий CD47 IgV TEV-His (2 мкг/мл)	
	6F7 H1L1(hG4)	Hu5F9-G4

0,333	2,639	2,723	2,929	3,056
1:3	2,566	2,608	2,623	2,955
1:9	2,159	2,217	2,394	2,513
1:27	1,425	1,522	1,652	1,838
1:81	0,749	0,765	0,866	0,938
1:243	0,329	0,333	0,396	0,431
1:729	0,133	0,143	0,160	0,173
0	0,052	0,050	0,049	0,047
вторичное антитело	козье антитело к человеческому IgG Fc, HRP			
EC50 (нМ)	0,078		0,068	

2. Анализ связывающей активности антитела 6F7 H1L1(G1M) с антигеном CD47 IgV TEV-His человека с помощью ELISA

Экспериментальные процедуры: Микропланшет покрывали 2 мкг/мл человеческого CD47 IgV TEV-His и инкубировали при 4°C в течение 12 ч. Покрытый антигеном микропланшет промывали 3 раза PBS и затем блокировали 1% BSA в PBS в течение 2 ч. Микропланшет промывали 3 раза PBS. В лунки микропланшета добавляли антитело, серийно разведенное раствором PBST, градиенты разведения для антител приведены в таблице 2. Микропланшет, содержащий тестируемое антитело, инкубировали при 37°C в течение 30 мин и затем промывали 3 раза PBST. Добавляли HRP-меченный рабочий раствор вторичного антитела козы против человеческого IgG (H+L) (приобретенный у Jackson ImmunoResearch Inc., Cat. No.: 109-035-088), разведенный в соотношении 1:5000, и микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Микропланшет промывали 3 раза PBST. TMB (Neogen, 308177) добавляли для проявления цвета в течение 5 мин в темноте, и затем проявление цвета останавливали добавлением стоп-раствора. Затем микропланшет немедленно помещали в устройство для считывания микропланшетов и значение оптической плотности (OD) каждой лунки в микропланшете считывали при 450 нм. Данные анализировали с помощью SoftMax Pro 6.2.1.

Результаты определения связывания антитела 6F7 H1L1(G1M) с антигеном CD47 IgV TEV-His человека показаны на фиг. 2. Значения OD для всех дозировок показаны в таблице 2. EC₅₀ связывания антитела рассчитывали путем подбора кривой, используя концентрацию антитела по оси абсцисс и значение поглощения по оси ординат, и результаты представлены в таблице 2, ниже.

Таблица 2. Результаты анализа связывающей активности 6F7 H1L1(G1M) с человеческим CD47 IgV TEV-His

Разведение антител (мкг/мл)	Покрывающий антиген: человеческий CD47 IgV TEV-His (2 мкг/мл)	
	6F7 H1L1(G1M)	Hu5F9-G4

1,000	2,298	2,307	2,390	2,428
0,333	2,410	2,438	2,505	2,566
0,111	2,482	2,352	2,275	2,305
0,037	2,301	2,182	1,847	1,854
0,012	1,697	1,737	1,270	1,264
0,004	1,141	0,987	0,599	0,580
0,001	0,476	0,492	0,282	0,275
0	0,047	0,046	0,047	0,046
вторичное антитело	козье антитело к человеческому IgG (H+L), HRP			
EC50 (нМ)	0,037		0,093	

Результаты показывают, что EC50 связывания 6F7 H1L1(G1M) с человеческим CD47 IgV TEV-His составляет 0,037 нМ, что немного выше, чем у Hu5F9-G4.

3. Анализ активности конкурентного связывания антитела 6F7 H1L1(hG4) против человеческого SIRP α ECD-hFc-биотин в отношении человеческого CD47 IgV TEV-His с помощью конкурентного ELISA

Экспериментальные процедуры: Микропланшет покрывали 2 мкг/мл человеческого CD47 IgV TEV-His по 50 мкл на лунку и инкубировали при 4°C в течение 16 ч. Микропланшет промывали один раз и осушали постукиванием, блокировали 1% BSA (в PBS) по 300 мкл на лунку, инкубировали при 37°C в течение 2 ч и промывали три раза, и осушали постукиванием. Антитело разбавляли до 3 мкг/мл (конечная концентрация: 1,5 мкг/мл) в качестве исходной концентрации, и проводили серийное разведение 1:3 для получения в общей сложности 7 концентраций, в дополнение к холостому контролю. Для указанных выше концентраций устанавливали две дублирующие лунки с конечным объемом 50 мкл на лунку, и планшет инкубировали в течение 10 мин. 0,2 мкг/мл (конечная концентрация: 0,1 мкг/мл) человеческого SIRP α ECD-hFc-биотин (синтезированный Zhongshan Akeso Biopharma Ltd.) добавляли в микропланшет по 50 мкл на лунку и осторожно смешивали с антителом в объемном соотношении 1:1, и микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Микропланшет промывали три раза и осушали постукиванием. В каждую лунку добавляли по 50 мкл рабочего раствора SA-HRP и микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Микропланшет промывали четыре раза и осушали постукиванием. В каждую лунку добавляли по 50 мкл хромогенного раствора ТМВ для проявления цвета в течение 5 мин при комнатной температуре в темноте, и затем проявление цвета останавливали добавлением в каждую лунку по 50 мкл стоп-раствора. Затем микропланшет немедленно помещали в устройство для считывания микропланшетов и значение OD каждой лунки в микропланшете считывали при 450 нм. Данные анализировали и обрабатывали с помощью SoftMax Pro 6.2.1.

Результаты представлены на фиг. 3. Значения OD для всех дозировок показаны в таблице 3. Путем количественного анализа интенсивности поглощения связанного антитела моделировали кривую для получения связывающей эффективности EC50 антитела (таблица 3).

Результаты показывают, что 6F7 H1L1(hG4) может эффективно блокировать связывание антигена CD47 IgV TEV-His человека с его рецептором SIRP α ECD-hFc-биотин человека, при этом эффективность блокирования зависит от дозы; блокирующая EC50 6F7 H1L1(hG4) составляет 0,194 нМ, которое является таким же, как у Hu5F9-G4.

Таблица 3. Результаты анализа активности конкурентного связывания 6F7 H1L1(hG4) против человеческого SIRP α ECD-hFc-биотин в отношении человеческого CD47 IgV TEV-His

Разведение антител (мкг/мл)	Покрывающий антиген: человеческий CD47 IgV TEV-His (2 мкг/мл)			
	6F7 H1L1(hG4)		Hu5F9-G4	
1,5	0,077	0,080	0,072	0,081
1:3	0,073	0,071	0,069	0,082
1:9	0,092	0,088	0,062	0,074
1:27	0,320	0,289	0,290	0,349
1:81	0,654	0,679	0,793	0,776
1:243	0,970	0,944	1,102	1,030
1:729	1,035	1,016	1,142	1,038
0	0,859	0,904	1,124	0,928
	человеческий SIRP α ECD-hFc-биотин, 0,1 мкг/мл			
вторичное антитело	SA-HRP			
EC50 (нМ)	0,194		0,205	

4. Анализ активности конкурентного связывания антитела 6F7 H1L1(G1M) против человеческого SIRP α ECD-hFc-биотин в отношении человеческого CD47 IgV TEV-His с помощью конкурентного ELISA

Экспериментальные процедуры: Микропланшет покрывали 2 мкг/мл человеческого CD47 IgV TEV-His по 50 мкл на лунку и инкубировали при 4°C в течение 16 ч. Микропланшет промывали один раз и осушали постукиванием, блокировали 1% BSA (в PBS) по 300 мкл на лунку, инкубировали при 37 C в течение 2 ч и промывали три раза, и осушали постукиванием. Антитело разбавляли до 3 мкг/мл (конечная концентрация: 0,5 мкг/мл) в качестве исходной концентрации, и проводили серийное разведение 1:3 для получения в общей сложности 7 концентраций, в дополнение к холостому контролю. Для указанных выше концентраций устанавливали две

дублирующие лунки с конечным объемом 50 мкл на лунку, и планшет инкубировали в течение 10 мин. 0,2 мкг/мл (конечная концентрация: 0,1 мкг/мл) человеческого SIRP α ECD-hFc-биотин добавляли в микропланшет по 50 мкл на лунку и осторожно смешивали с антителом в объемном соотношении 1:1, и микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Микропланшет трижды промывали и осушали постукиванием. В каждую лунку добавляли по 50 мкл рабочего раствора SA-HRP (KPL, 14-30-00) и микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Микропланшет промывали четыре раза и осушали постукиванием. В каждую лунку добавляли по 50 мкл хромогенного раствора ТМВ для проявления цвета в течение 5 мин при комнатной температуре в темноте, и затем проявление цвета останавливали добавлением в каждую лунку по 50 мкл стоп-раствора. Затем микропланшет немедленно помещали в устройство для считывания микропланшетов и значение OD каждой лунки в микропланшете считывали при 450 нм. Данные анализировали и обрабатывали с помощью SoftMax Pro 6.2.1.

Результаты представлены на фиг. 4. Значения OD для всех дозировок показаны в таблице 4. Путем количественного анализа интенсивности поглощения связанного антитела моделировали кривую для получения связывающей эффективности EC50 антитела (таблица 4).

Таблица 4. Результаты анализа активности конкурентного связывания 6F7 H1L1(G1M) против человеческого SIRP α ECD-hFc-биотин в отношении человеческого CD47 IgV TEV-His

Разведение антител (мкг/мл)	Покрывающий антиген: человеческий CD47 IgV TEV-His (2 мкг/мл)			
	6F7 H1L1(G1M)		Hu5F9-G4	
0,5	0,076	0,070	0,056	0,057
1:3	0,104	0,096	0,075	0,066
1:9	0,420	0,435	0,530	0,408
1:27	1,017	1,119	0,932	0,968
1:81	1,196	1,304	1,075	1,104
1:243	1,265	1,394	1,221	1,151
1:729	1,225	1,312	1,173	1,056
0	1,045	1,191	1,070	1,132
	человеческий SIRP α ECD-hFc-биотин, 0,1 мкг/мл			
вторичное антитело	SA-HRP (1:4000)			
EC50 (нМ)	0,274		0,310	

Результаты показывают, что 6F7 H1L1(G1M) может эффективно блокировать связывание антигена CD47 IgV TEV-His человека с его рецептором SIRP α ECD-hFc-биотин человека, при этом эффективность блокирования зависит от дозы; блокирующая

EC50 6F7 H1L1(G1M) составляет 0,274 нМ, что сравнимо с Hu5F9-G4.

Пример 6: Определение константы аффинности мышинового антитела 6F7 в отношении CD47 человека

Кинетические параметры связывания мышинового антитела 6F7 с антигеном CD47 IgV TEV-His человека определяли с использованием системы ForteBio (Forteio, модель: QKe).

Сенсор AR2G (Forteio, Cat. No: 18-5092) активировали с использованием EDC/NHS, и антитело иммобилизовали путем связывания амина с активированным сенсором AR2G. Сенсор уравнивали в PBST в течение 300 с. Антиген, иммобилизованный на сенсоре, связывался с антителом в течение 420 с, при концентрации антигена 3,125-100 нМ (серийное двукратное разведение). Антиген и антитело подвергали диссоциации в PBST в течение 600 с.

Результаты определения констант аффинности мышинового антитела 6F7 и Hu5F9-G4 (в качестве контрольного антитела) в отношении человеческого CD47 IgV TEV-His показаны в таблице 5 и на фиг. 5.

Таблица 5. Результаты определения константы аффинности мышинового антитела 6F7 в отношении CD47 человека

Антитело	KD (M)	kon(1/Mc)	kon Ошибка	kdis(1/c)	kdis Ошибка	Диапазон Rmax (нм)
6F7	6,52E-10	3,93E+05	7,41E+03	2,56E-04	9,48E-06	0,1684- 0,2614
Hu5F9-G4	6,38E-10	5,26E+05	9,79E+03	3,36E-04	9,38E-06	0,1400- 0,3609

KD относится к константе аффинности; $KD = kdis / kon$.

Результаты показывают, что: как показано в таблице 5 и на фиг. 5, константы аффинности мышинового антитела 6F7 и Hu5F9-G4 в отношении человеческого CD47 IgV TEV-His составляли сравнительно 6,52E-10 М и 6,38E-10 М, соответственно. Это указывает на то, что области CDR 6F7 обладают сравнимой высокой способностью связываться с CD47 с областями Hu5F9-G4.

Пример 7: Определение константы аффинности антитела 6F7 H1L1(hG4) в отношении человеческого CD47

Константу аффинности антитела 6F7 H1L1(hG4) в отношении человеческого CD47 IgV TEV-His определяли с использованием системы Biacore (Forteio, модель: QKe) в соответствии с инструкцией. Буферный раствор представлял собой PBST. Человеческий CD47 IgV-TEV-His иммобилизовали на поверхности чипа CM5 путем связывания с амином со значением сигнала иммобилизации 171,6 RU. Антителу давали возможность связываться с человеческим CD47 в течение 120 с при скорости потока 30 мкл/мин с антителом в концентрации 0,78-12,5 нМ (двукратное разведение). Антитело и CD47 человека подвергали диссоциации в течение 300 с. Чип регенерировали 3 М MgCl₂ в

течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин. Данные анализировали путем подбора модели 1:1 для получения констант аффинности. Данные получали с использованием программного обеспечения Biacore Control 2.0 и анализировали с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation 2.0. Результаты определения констант аффинности 6F7 H1L1(hG4) и Hu5F9-G4 (в качестве контрольного антитела) в отношении человеческого CD47 IgV TEV-His показаны в таблице 6 и на фиг. 6 и 7.

Результаты показывают, что: как показано на фигурах, константы аффинности 6F7 H1L1(hG4) и Hu5F9-G4 в отношении человеческого CD47 IgV TEV-His составляют $1,52E-10$ М и $4,42E-11$ М, соответственно, что свидетельствует о большей способности 6F7 H1L1(hG4) для связывания с человеческим CD47.

Таблица 6. Результаты определения константы аффинности 6F7 H1L1(hG4) в отношении человеческого CD47 IgV TEV-His

Название антитела	KD (М)	ka(1/Мс)	SE(ka)	kd(1/с)	SE(kd)	Rmax (RU)
6F7H1L1 (hG4)	1,52E-10	2,54E+06	1,48E+04	3,88E-04	1,14E-06	253,21-272,60
Hu5F9-G4	4,42E-11	3,00E+06	8,49E+03	1,32E-04	5,69E-07	238,81-327,23

KD относится к константе аффинности; $KD = k_{dis}/k_{on}$.

Пример 8: Анализ клеточной биоактивности 6F7 H1L1(G1M)

1. Обнаружение связывания 6F7 H1L1(G1M) с нормальными эритроцитами человека с помощью FACS

Нормальные эритроциты человека выделяли в боксе биологической безопасности: буферные растворы для крови А и В хорошо смешивали в соотношении 1:9 для получения буферного раствора для крови; 20 мл свежей крови хорошо смешивали с 60 мл буферного раствора для крови; в центрифужные пробирки 50 мл добавляли 15 мл реагента Ficoll Paque, и затем на поверхность реагента медленно добавляли разведенную свежую кровь в соотношении 3:4, т.е. в каждую пробирку добавляли по 20 мл разведенной крови; центрифугирование осуществляли при 1550 об/мин в течение 30 мин; эритроциты на дне центрифужных пробирок медленно пипетировали, промывали 3 раза PBS и центрифугировали; клеточные осадки ресуспендировали в 500 мкл 1% PBSA и подсчитывали; концентрацию эритроцитов регулировали и клетки переносили в центрифужные пробирки 1,5 мл по 0,3 млн клеток на пробирку; центрифугирование осуществляли при 5600 об/мин в течение 5 мин, и супернатант отбрасывали; 100 мкл антитела соответствующей концентрации (конечные концентрации: 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 нМ) добавляли в соответствии со схемой эксперимента в каждую пробирку, получали холостую группу (PBSA+клетки) и группа изотипического контроля (hIgG), затем инкубировали на льду в течение 1 ч; добавляли 500 мкл 1% PBSA, затем центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин и супернатант отбрасывали; в каждую

пробирку добавляли 100 мкл FITC антитела козы к IgG человека (1:500), полученные смеси хорошо перемешивали и инкубировали на льду в течение 30 мин в темноте; добавляли 500 мкл 1% PBSA, затем центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин и супернатант отбрасывали; в каждую пробирку добавляли 200 мкл 1% промывочного буфера для ресуспендирования клеток, и сигналы флуоресценции регистрировали с помощью FITC-канала на проточном цитометре.

Результаты анализировали с использованием программного обеспечения Flowing software, подборки кривой осуществляли отдельно с использованием MFI и концентрации образца на GraphPad prism 5 для расчета EC50.

Результаты связывания 6F7 H1L1(G1M) с CD47 на поверхности клеточной мембраны нормальных эритроцитов человека показаны на фиг.8. Результаты показывают, что как 6F7 H1L1(G1M), так и зарегистрированный препарат Hu5F9-G4 в отношении одной и той же мишени могут специфически связываться с CD47 на поверхности клеточной мембраны нормальных эритроцитов человека, при этом сопоставимые значения связывания EC50 составляют 0,077 нМ и 0,057 нМ, соответственно.

2. Анализ связывающей активности 6F7 H1L1(G1M) с Raji с помощью FACS

Клетки Raji в log-фазе собирали, центрифугировали и промывали. Клеточные осадки ресуспендировали в 1% PBSA и подсчитывали, и определяли жизнеспособность. Клетки переносили в пробирки 1,5 мл из расчета $3,0 \times 10^5$ клеток/500 мкл/пробирку и центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин, и супернатант отбрасывали. В каждую пробирку добавляли 100 мкл серийно разведенного соответствующего антитела в соответствии со схемой эксперимента и получали холостую группу (PBSA+клетки) и группу изотипического контроля (hIgG), затем инкубировали на льду в течение 1 ч. Затем добавляли 1% PBSA, после чего центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин и супернатант отбрасывали. В каждую пробирку добавляли 100 мкл FITC антитела козы к IgG человека (1:500), и смеси хорошо перемешивали и инкубировали на льду в течение 30 мин в темноте. Добавляли 500 мкл 1% PBSA, затем центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин и супернатант отбрасывали. В каждую пробирку добавляли 1% PBSA для ресуспендирования клеток, и сигналы флуоресценции регистрировали с помощью FITC-канала на проточном цитометре. Подборки кривой осуществляли отдельно с использованием MFI и концентрации образца для расчета EC50.

Результаты связывающей активности 6F7 H1L1(G1M) с Raji показаны на фиг.9. Как показано на фигуре, результаты показывают, что как 6F7 H1L1(G1M), так и Hu5F9-G4 могут специфически связываться с CD47 на поверхности клеточной мембраны клеток Raji, при этом сопоставимая EC50 связывания составляет 0,013 нМ и 0,012 нМ, соответственно.

3. Анализ биоактивности конкурентного связывания 6F7 H1L1(G1M) против SIRP в отношении LOVO с помощью FACS

Клетки LOVO в log-фазе (Chinese Academy of Sciences Cell Bank, Accession No. bio-73085) собирали обычным способом, центрифугировали и промывали. Клеточные осадки

ресуспендировали в 1% PBSA и подсчитывали, и определяли жизнеспособность. Концентрацию клеток доводили с помощью 1% PBSA до подходящего диапазона и клетки переносили группами в пробирки 1,5 мл по 500 мкл на пробирку, всего 0,3 миллиона клеток. Клетки центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин, и супернатант отбрасывали. Добавляли серийно разведенное антитело (конечные концентрации в порядке убывания: 300, 100, 10, 1, 0,3, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 нМ), и получали холостой контроль (100 мкл 1% PBSA+клетки) и группу изотипического контроля (человеческий hIgG), затем инкубировали на льду в течение 30 мин. В каждую пробирку добавляли 100 мкл SIRP α -mFc, и смеси хорошо перемешивали в конечной концентрации 20 нМ, и инкубировали на льду в течение 1 ч. Добавляли 1% PBSA, затем центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин, и супернатант отбрасывали. В каждую пробирку добавляли 100 мкл FITC антитела козы к IgG мыши (разведение 1:500), затем инкубировали на льду в течение 40 мин в темноте. Добавляли 1% PBSA, затем центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин и супернатант отбрасывали. Добавляли 200 мкл 1% PBSA для ресуспендирования осадка клеток, и суспензии переносили в пробирки для проточной цитометрии. Сигналы флуоресценции регистрировали с помощью FITC-канала на проточном цитометре. Подборки кривой осуществляли отдельно с использованием MFI и концентрации образца для расчета EC50.

Анализировали активность конкурентного связывания 6F7 H1L1(G1M) против SIRP в отношении LOVO. Результаты представлены на фиг.10. Как показано на фигуре, как 6F7 H1L1(G1M), так и Hu5F9-G4 могут конкурировать с SIRP за связывание с CD47 на поверхности мембраны LOVO, тем самым блокируя связывание SIRP с CD47, при этом их сопоставимое EC50 конкурентного связывания составляет 0,16 нМ и 0,24 нМ, соответственно.

4. Эффект 6F7 H1L1(G1M) на агглютинацию нормальных эритроцитов человека

Получение нормальных эритроцитов человека: РВМС крови человека выделяли в соответствии с инструкцией к реагенту Ficoll-Paque Plus, и для этого эксперимента использовали осажденные на дно эритроциты. Эритроциты разводили PBS до концентрации 1×10^7 /мл для получения суспензии эритроцитов, которую затем добавляли в круглодонный 96-луночный планшет. Добавляли положительное антитело в соответствующей концентрации, в контроль добавляли 0,1 мкг/мл декстрана T500, в отрицательный контроль добавляли соответствующий hIgG или PBS, с последующим культивированием при 37°C в течение 4 ч. Агглютинацию эритроцитов исследовали и фотографировали.

Эффект 6F7 H1L1(G1M) на агглютинацию нормальных эритроцитов человека показан на фиг.11. Как показано на фигуре, 6F7 H1L1(G1M) и контрольное антитело Hu5F9-G4 не влияют на агглютинацию эритроцитов при концентрации антитела ниже 20 мкг/мл; однако при концентрации антитела выше 20 мкг/мл можно наблюдать заметную облегченную агглютинацию эритроцитов Hu5F9-G4, в то время как 6F7 H1L1(G1M) все еще не оказывает влияния на агглютинацию эритроцитов.

Пример 9: Анализ клеточной биоактивности 6F7 H1L1(hG4)

1. Обнаружение связывания 6F7 H1L1(hG4) с нормальными эритроцитами человека с помощью FACS

Экспериментальные процедуры: Буферные растворы для крови А (D-(+)-глюкоза: 1 г; CaCl₂: 0,0056 г; MgCl₂·6H₂O: 0,1992 г; KCl: 0,4026 г; Tris: 17,5650 г; растворенные в 1 л сверхчистой воды) и В (NaCl: 8,19 г, растворенный в 1 л сверхчистой воды) смешивали в соотношении 1:9 для получения буферного раствора для крови. Свежую кровь хорошо смешивали с буферным раствором для крови (соотношение разбавления крови 1:3 после концентрирования). 15 мл реагента Ficoll Paque plus (GE, Cat. No. 17-1440-02) добавляли в центрифужные пробирки 50 мл и медленно добавляли разбавленную свежую кровь на поверхность реагента в объемном соотношении 3:4, т.е. в каждую пробирку добавляли 20 мл разбавленной крови. Каждую пробирку центрифугировали при 1550 об/мин в течение 30 мин после уравнивания. РВМС в среднем слое лейкоцитарной пленки отбирали пипеткой. Буферный раствор для крови добавляли в объемном отношении клеток к буферу для крови 1:4. Полученную смесь хорошо перемешивали и центрифугировали при 950 об/мин в течение 15 мин, и супернатант отбрасывали. 20 мл буферного раствора для крови добавляли для ресуспендирования РВМС. Полученную суспензию центрифугировали и супернатант отбрасывали. Осуществляли центрифугирование с последующими двумя промывками. Клетки однократно промывали 10 мл RPMI-1640 (без FBS). Осуществляли центрифугирование и супернатант отбрасывали. Клетки ресуспендировали в 5 мл RPMI-1640 (содержащего 10% FBS) и подсчитывали, по 3×10^5 клеток на образец. В каждую пробирку добавляли 500 мкл 1% PBSA, затем центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин. Супернатант отбрасывали. Добавляли 100 мкл антитела соответствующей концентрации (конечные концентрации: 300, 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 нМ) в каждую пробирку, и получали холостой контроль (PBSA+клетки) и изотипический контроль, затем инкубировали на льду в течение 1 ч. Добавляли 1% PBSA, затем центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин, и супернатант отбрасывали. Добавляли 100 мкл FITC антитела козы к IgG человека (Jacson, Cat. No. 109-095-098, разведение 1:500) или FITC антитела козы к IgG мыши (BD bioscience, Cat. No. 555988) (1:500), полученные смеси хорошо перемешивали и инкубировали на льду в течение 30 мин в темноте. Добавляли 1% PBSA, затем центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин, и супернатант отбрасывали. В каждую пробирку добавляли 200 мкл 1% промывочного буфера для ресуспендирования клеток, и сигналы флуоресценции регистрировали с помощью FITC-канала на проточном цитометре. Результаты анализировали с использованием программного обеспечения Flowing software, подборки кривой осуществляли отдельно с использованием MFI и концентрации образца на GraphPad prism 5 для расчета EC50.

Результаты связывания 6F7 H1L1(hG4) с CD47 на поверхности клеточной мембраны нормальных эритроцитов человека показаны на фиг. 12 и в таблице 7. Результаты показывают, что как 6F7 H1L1(hG4), так и зарегистрированный препарат

Hu5F9-G4 в отношении одной и той же мишени могут специфически связываться с CD47 на поверхности клеточной мембраны нормальных эритроцитов человека, при этом EC₅₀ связывания составляет 0,60 нМ и 0,06 нМ, соответственно, и аффинность Hu5F9-G4 в отношении эритроцитов в 10 раз выше, чем у 6F7 H1L1(hG4).

Таблица 7. Результаты определения связывания анти-CD47-антитела с эритроцитами человека с помощью FACS

Концентрация (нМ)/MFI	0,00123	0,0123	0,123	1,23	3,7	11,1	33,3	EC50
Hu5F9-G4	19,48	59,35	132,68	212,25	207,52	219,34	219,02	0,06
6F7 H1L1(hG4)	10,25	19,55	47,29	134,58	152,50	185,31	190,18	0,60

2. Анализ связывающей активности 6F7 H1L1(hG4) с Raji с помощью FACS

Биоактивность связывания CD47 антитела с опухолевой клеткой Raji (Chinese Academy of Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences Cell Center, Cat. No. TCHu 44) анализировали с помощью проточной цитометрии.

Клетки Raji подсчитывали, и определяли жизнеспособность, с 3×10^5 клеток на образец. В каждую пробирку добавляли 500 мкл 1% PBSA, затем центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин, и супернатант отбрасывали. Добавляли серийно разведенное антитело в соответствии со схемой эксперимента, и получали холостую группу (PBSA+клетки) и группу изотипического контроля (человеческий IgG), затем инкубировали на льду в течение 1 ч. Добавляли 1% PBSA, затем центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин и супернатант отбрасывали. Добавляли 100 мкл FITC антитела козы к IgG человека (1:500) или FITC антитела козы к IgG мыши (1:500), полученные смеси хорошо перемешивали и инкубировали на льду в течение 30 мин в темноте. Добавляли 500 мкл 1% PBSA, затем центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин, и супернатант отбрасывали. В каждую пробирку добавляли 200 мкл промывочного буфера для ресуспендирования клеток, и сигналы флуоресценции регистрировали с помощью FITC-канала на проточном цитометре.

Результаты активности связывания 6F7 H1L1(hG4) с Raji показаны на фиг. 13 и в таблице 8. Как показано на фигуре и в таблице, результаты показывают, что как 6F7 H1L1(hG4), так и Hu5F9-G4 могут специфически связываться с CD47 на поверхности клеточной мембраны клеток Raji, при этом сопоставимая EC₅₀ связывания составляет 0,32 нМ и 0,22 нМ, соответственно.

Таблица 8. Результаты определения связывания анти-CD47-антитела с опухолевой клеткой Raji с помощью FACS

Концентрация (нМ)/MFI	0,00123	0,0123	0,123	1,23	3,7	11,1	33,3	EC50
Hu5F9-G4	10,83	13,67	47,74	176,60	177,11	183,49	185,86	0,22
6F7 H1L1 (hG4)	11,05	16,40	44,71	155,29	163,61	173,42	161,61	0,32

3. Анализ активности конкурентного связывания 6F7 H1L1(hG4) против SIRP в отношении Raji с помощью FACS

Клетки Raji в log-фазе собирали обычным способом, центрифугировали и промывали. Клеточные осадки ресуспендировали в 1% PBSA и подсчитывали, и определяли жизнеспособность. Концентрацию клеток доводили с помощью 1% PBSA до подходящего диапазона и клетки переносили группами в пробирки 1,5 мл по 500 мкл на пробирку, всего 0,3 миллиона клеток. Клетки центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин, и супернатант отбрасывали. Добавляли серийно разведенное антитело (конечные концентрации в порядке убывания: 1, 0,3, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 нМ), и получали холостой контроль (100 мкл 1% PBSA+клетки) и изотипический контроль (человеческий hIgG), затем инкубировали на льду в течение 30 мин. В каждую пробирку добавляли 100 мкл SIRP α -ECD-mFc (последовательность mFc представлена в SEQ ID NO: 71), и смеси хорошо перемешивали при конечной концентрации 20 нМ, и инкубировали на льду в течение 1 ч. Добавляли 1% PBSA, затем центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин, и супернатант отбрасывали. В каждую пробирку добавляли 100 мкл FITC антитела козы к IgG мыши (разведение 1:500), затем инкубировали на льду в течение 40 мин в темноте. Добавляли 500 мкл 1% PBSA, затем центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин, и супернатант отбрасывали. Добавляли 200 мкл 1% PBSA для ресуспендирования осадков клеток. Сигналы флуоресценции регистрировали с помощью FITC-канала на проточном цитометре.

Результаты конкурентного связывания 6F7 H1L1(hG4) против SIRP в отношении опухолевых клеток Raji показаны на фиг. 14 и таблица 9. Как показано на фигуре и в таблице, как 6F7 H1L1(hG4), и Hu5F9-G4 могут конкурировать с SIRP за связывание с CD47 на поверхности мембраны Raji, тем самым блокируя связывание SIRP с CD47, при этом их сопоставимое EC₅₀ конкурентного связывания составляет 0,017 нМ и 0,014 нМ, соответственно.

Таблица 9. Результаты определения конкурентного связывания анти-CD47-антитела против SIRP в отношении клеток Raji с помощью FACS

Концентрация (нМ)/MFI	0,0001	0,001	0,01	0,1	0,3	1	EC50
Hu5F9-G4	54,83	49,37	37,16	10,77	10,34	11,4	0,014
6F7 H1L1(hG4)	50,27	54,37	42,64	16,80	15,66	14,83	0,017

4. Анализ связывающей активности 6F7 H1L1(hG4) с LOVO с помощью FACS

Собирали клетки LOVO в log-фазе (Chinese Academy of Sciences Cell Bank, Accession No. bio-73085), центрифугировали, и промывали. Клеточные осадки ресуспендировали в 500 мкл 1% PBSA и подсчитывали, и определяли жизнеспособность. Клетки переносили в пробирки 1,5 мл из расчета $3,0 \times 10^5$ клеток/500 мкл/пробирку и центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин, и супернатант отбрасывали. В каждую пробирку добавляли 100 мкл серийно разведенного соответствующего антитела в

соответствии со схемой эксперимента и получали холостую группу (PBSA+клетки) и группу изотипического контроля (человеческий hIgG с последовательностью тяжелой цепи, имеющей SEQ ID NO: 72, и последовательностью легкой цепи, имеющей SEQ ID NO: 73), затем инкубировали на льду в течение 1 ч. Затем добавляли 500 мкл 1% PBSA, после чего центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин и супернатант отбрасывали. В каждую пробирку добавляли 100 мкл FITC антитела козы к IgG человека (1:500), и смеси хорошо перемешивали и инкубировали на льду в течение 30 мин в темноте. Добавляли 500 мкл 1% PBSA, затем центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин и супернатант отбрасывали. В каждую пробирку добавляли 200 мкл 1% PBSA для ресуспендирования клеток, суспензии переносили в пробирки для проточной цитометрии и детектировали с помощью проточного цитометра BD FACSCalibur. Результаты анализировали с использованием программного обеспечения Flowing software, подборки кривой осуществляли отдельно с использованием MFI и концентрации образца на GraphPad prism 5 для расчета EC50.

Результаты связывания 6F7 H1L1(hG4) с LOVO представлены на фиг. 15 и в таблице 10. Как показано на фигуре и в таблице, как 6F7 H1L1(hG4), так и Hu5F9-G4 могут специфически связываться с CD47 на поверхности клеточной мембраны клеток LOVO, при этом их EC50 связывания составляет 0,02 нМ и 0,06 нМ, соответственно. Связывающая активность 6F7 H1L1(hG4) несколько выше, чем у Hu5F9-G4.

Таблица 10. Результаты определения связывания анти-CD47-антитела с LOVO с помощью FACS

Концентрация (нМ)/MFI	0,0001	0,001	0,01	0,1	0,3	1	EC50
Hu5F9-G4	11,35	13,04	30,44	102,94	145,13	150,57	0,06
6F7 H1L1 (hG4)	15,26	25,41	48,15	135,95	146,67	149,81	0,02

5. Анализ биоактивности конкурентного связывания 6F7 H1L1(hG4) против SIRP в отношении LOVO с помощью FACS

Экспериментальные процедуры такие же, как в примере 3, за исключением того, что клетки Raji заменяли на клетки LOVO.

Результаты анализа активности конкурентного связывания 6F7 H1L1(hG4) против SIRP в отношении LOVO показаны на фиг. 16 и в таблице 11. Как показано на фигуре и в таблице, как 6F7 H1L1(hG4), так и Hu5F9-G4 могут конкурировать с SIRP за связывание с CD47 на поверхности мембраны LOVO, тем самым блокируя связывание SIRP с CD47, при этом их EC50 конкурентного связывания составляет 0,10 нМ и 0,24 нМ, соответственно. Активность конкурентного связывания 6F7 H1L1(hG4) несколько выше, чем у Hu5F9-G4.

Таблица 11. Результаты определения конкурентного связывания анти-CD47-антитела против SIRP в отношении клеток LOVO с помощью FACS

Концентрация	0,0001	0,001	0,01	0,1	0,3	1	10	100	300	EC50
--------------	--------	-------	------	-----	-----	---	----	-----	-----	------

(нМ)/MFI										
Hu5F9-G4	69,81	62,47	64,45	47,30	38,98	11,63	10,51	9,59	9,93	0,24
6F7 H1L1(hG4)	56,79	59,59	64,52	34,21	23,76	26,52	17,46	11,35	9,44	0,10

6. Эффект анти-CD47 антитела на агглютинацию нормальных эритроцитов человека

Получение нормальных эритроцитов человека: РВМС крови человека выделяли в соответствии с инструкцией к реагенту Ficoll-Paque Plus (GE, Cat. No. 17-1440-02), и для этого эксперимента использовали осажденные на дно эритроциты. Эритроциты разводили PBS до концентрации 1×10^7 /мл для получения суспензии эритроцитов, которую затем добавляли в круглодонный 96-луночный планшет. Добавляли положительное антитело в соответствующей концентрации, в контроль добавляли 0,1 мкг/мл декстрана Т500, в отрицательный контроль добавляли соответствующий человеческий IgG (Akeso Biopharma) или PBS, с последующим культивированием при 37°C в течение 4 ч. Агглютинацию эритроцитов исследовали и фотографировали.

Эффект 6F7 H1L1(hG4) на агглютинацию нормальных эритроцитов человека показан на фиг.17. Как показано на фигуре, 6F7 H1L1(hG4) не вызывал агглютинацию эритроцитов при всех протестированных концентрациях, и контрольное антитело Hu5F9-G4 не вызывало агглютинацию эритроцитов при концентрациях, равных менее 3,3 мкг/мл. При концентрации более или равной 10 мкг/мл можно наблюдать заметную облегченную агглютинацию эритроцитов Hu5F9-G4.

Пример 10: Терапевтический эффект 6F7 H1L1(hG4) на подкожно трансплантированные опухоли MDA-MB-231

Активность *in vivo* 6F7 H1L1(hG4) изучали путем измерения объема опухолей клеток рака молочной железы человека MDA-MB-231, трансплантированных подкожно мышам SCID/beige после введения 6F7 H1L1(hG4). Собранные клетки MDA-MB-231 (ATCC, Cat. No. HTB-26) подкожно трансплантировали мышам SCID/beige, всего 40 мышей, в количестве 5×10^6 клеток/мышь в правый бок. Когда объем опухоли достигал примерно 100-120 мм³, мышей равномерно разделяли на 5 групп по 7 мышей в соответствии со средним объемом опухоли: эталонная группа, группа с высокой дозой Hu5F9-G4, группа с низкой дозой Hu5F9-G4, группа с высокой дозой 6F7 H1L1(hG4) и группа с низкой дозой 6F7 H1L1(hG4), где группы с высокой дозой получали дозу 0,2 мг/кг, а группы с низкой дозой получали дозу 0,02 мг/кг. День распределения по группам обозначали как D0, и введение проводили в D0, D3, D7, D10, D14 и D17.

Размер опухоли измеряли два раза в неделю после распределения по группам с помощью штангенциркуля, а объем опухоли рассчитывали по формуле $TV = 0,5 \times ab^2$, где *a* представляет собой размер опухоли по длинной оси, *b* представляет собой размер опухоли по короткой оси, TV представляет собой объем опухоли. TGI (%) (индекс ингибирования роста опухоли) рассчитывали от объема опухоли по формуле $\%TGI = (1 - (T_i - T_0) / (C_i - C_0)) \times 100\%$, где *T_i* и *C_i* представляют собой средние объемы опухоли в день *i* в группах лечения

и эталонной, соответственно, и T0 и C0 представляют собой средние объемы опухоли в день 0 в группах лечения и эталонной, соответственно. Результаты оценивали однофакторным дисперсионным анализом после межгруппового сравнения, обработанного программой GraphPad software.

Результаты представлены на фиг.18. На день 24 после распределения по группам как в группе с высокой дозой контрольного антитела Hu5F9-G4, так и в группе с высокой дозой 6F7 H1L1(hG4) рост опухолей MDA-MB-231 эффективно ингибировался ($P < 0,01$), и ингибирование роста опухоли MDA-MB-231 с помощью Hu5F9-G4 и 6F7 H1L1(hG4) представляет собой зависимость доза-реакция. Значения TGI (%) для группы с высокой дозой контрольного антитела Hu5F9-G4, группы с высокой дозой 6F7 H1L1(hG4) и группы с низкой дозой 6F7 H1L1(hG4) составляли 67%, 63% и 25%, соответственно. По сравнению с группой, получавшей контрольное антитело, группа с низкой дозой 6F7 H1L1(hG4) демонстрирует значительно более высокую эффективность, чем группа с низкой дозой Hu5F9-G4, а группа с высокой дозой 6F7 H1L1(hG4) и группа с высокой дозой контрольного антитела демонстрируют сопоставимую эффективность ($P > 0,05$).

Пример 11: Эффект однократного введения 6F7 H1L1(hG4) и Hu5F9-G4 яванским макакам на гемоглобин и гематокрит

4 яванских макакак рандомизировали на 2 группы по 2 обезьяны в зависимости от массы и пола, половина самцов и половина самок. Получали группу 6F7 H1L1(hG4) и группу Hu5F9-G4, которым внутривенно вводили дозу 10 мг/кг. Значения гемоглобина и гематокрита определяли с помощью гематологического анализатора.

Результаты представлены на фиг.19 и 20, и в таблице 12.

Результаты показывают, что значения гемоглобина и гематокрита снижались в разной степени после однократного введения яванским макакам H1L1(hG4) и Hu5F9-G4 в дозе 10 мг/кг, а самые низкие точки анемии достигались через 2-7 дней, при анемии уровень в группе Hu5F9-G4 выше, чем в группе 6F7 H1L1(hG4); обезьяны могли самостоятельно восстановиться от анемии, вызванной двумя антителами, до исходного уровня примерно через 20 дней после введения.

Таблица 12. Индивидуальные данные по гемоглобину и гематокриту у яванских макакак после однократного введения 6F7 H1L1(hG4) и Hu5F9-G4

Индексы	HGB г/дл				HCT %			
	6F7 H1L1(hG4) самец	6F7 H1L1(hG4) самка	Hu5F9-G4 самец	Hu5F9-G4 самка	6F7 H1L1(hG4) самец	6F7 H1L1(hG4) самка	Hu5F9-G4 самец	Hu5F9-G4 самка
Группа	6F7 H1L1(hG4) самец	6F7 H1L1(hG4) самка	Hu5F9-G4 самец	Hu5F9-G4 самка	6F7 H1L1(hG4) самец	6F7 H1L1(hG4) самка	Hu5F9-G4 самец	Hu5F9-G4 самка
Даты детектирования	6F7 H1L1(hG4) самец	6F7 H1L1(hG4) самка	Hu5F9-G4 самец	Hu5F9-G4 самка	6F7 H1L1(hG4) самец	6F7 H1L1(hG4) самка	Hu5F9-G4 самец	Hu5F9-G4 самка
7 дней до введения	12,9	12,6	12,4	13,3	42,5	42,1	41,4	44,5
3 дня до	13	12,3	12,5	12,6	41,9	41,4	41,7	42,3

введения								
0 дней после введения	13,1	11,6	11,5	12,5	42,1	37,7	37,9	40,8
1 день после введения	11,6	9,6	9,2	9,9	37,1	31,8	27,1	31,7
2 дня после введения	10,8	9,3	7,7	8,8	33,3	29,4	21,6	27,5
4 дня после введения	10,5	9,4	6,4	8,3	31,9	30,2	18,2	25,1
7 дней после введения	10,6	9,9	5,9	9,6	33,1	32,1	18,3	30,6
10 дней после введения	10,5	10,8	7,7	10,2	33	36,5	26,5	34,4
13 дней после введения	11,9	11,3	9	10,8	36,9	36,7	31,5	36,9
20 дней после введения	12,3	12,3	10,6	11,9	38,1	39,7	36,2	39,5

Варианты осуществления настоящего изобретения подробно описаны выше, но настоящее изобретение не ограничивается этими вариантами осуществления. Специалисты в данной области могут сделать различные эквивалентные модификации или замены без нарушения сущности настоящего изобретения. Эти эквивалентные модификации или замены входят в объем, определяемый формулой изобретения настоящей заявки.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Вариабельная область тяжелой цепи 6F7:

CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCAGGAGCAGAGCTGGTGAGGCCAGGAGCATCC
GTGAAGCTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACATCCTATTGGATGAACTGG
GTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGCATGATCGACCCAAGCG
ATTCCGAGACCCACAACAATCAGATGTTTAAGGACAAGGCCACCCTGACAGTGGAT
AAGAGCTCCAATACCGCCTACATGCACCTGTCTAGCCTGACATCTGAGGACAGCGCC
GTGTATCACTGCGCCCGGCTGTACAGATGGTATTTTGACGTGTGGGGAGCAGGAACC
ACAGTGACCGTGTCTCT (SEQ ID NO: 1)

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPQGQLEWIGMIDP
SDSETHNNQMFKDKATLTVDKSSNTAYMHLSSLTSEDSAVYHRCARLYRWYFDVWGAG
TTVTVSS (SEQ ID NO: 2)

Вариабельная область легкой цепи 6F7:

AACATCGTGATGACCCAGTCCCCCAAGTCTATGAGCATGTCCCTGGGCGAGA
GGGTGACCCTGTCCTGTAAGGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACGTGTCTTGGTTTC
AGCAGAAGCCACACCAGAGCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCAATCGGTAT
ACAGGCGTGCCTGACAGATTCACCGGCTCTGGCAGCGCCACAGACTTCACCCTGAC
AATCTCTAACGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGATTATCACTGCGGCCAGAGCTACA
ATTTCCCTTATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 3)

NIVMTQSPKSMMSLGERVTLCKASEIVGTYVSWFQQKPHQSPKLLIYGASNRY
TGVPDRFTGSGSATDFTLTISNVQAEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGKLEIK (SEQ ID
NO: 4)

6F7CDR

HCDR1: GYTFTSYW (SEQ ID NO: 5)

HCDR2: IDPSDSET (SEQ ID NO: 6)

HCDR3: ARLYRWYFDV (SEQ ID NO: 7)

LCDR1: EIVGTY (SEQ ID NO: 8)

LCDR2: GAS (SEQ ID NO: 9)

LCDR3: GQSYNFPYT (SEQ ID NO: 10)

6F7H1:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCT
GTGAAGCTGAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACAAGCTATTGGATGAACTGG
GTGCGGCAGAGACCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGAATGATCGACCCTTCCGA
TTCTGAGACCCACAATGCCCAGAAGTTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGACA
AGAGCACCTCCACAGCCTACATGCACCTGAGCTCCCTGCGGTCCGAGGACACAGCC
GTGTACTATTGCGCCAGGCTGTACCGCTGGTATTTTGACGTGTGGGGAGCAGGAACC
ACAGTGACCGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 11)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVVRQRPQGQLEWIGMID
PSDSETHNAQKFQKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDVAVYYRCARLYRWYFDVWGA
GTTVTVSS (SEQ ID NO: 12)

6F7L1:

AACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGCCACAATGTCTATGAGCCCAGGAGAGA
GGGTGACCCTGTCCTGTAGAGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACGTGTCTTGGTTTC
AGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTAGGCTGCTGATCTACGGAGCAAGCAACAGGTAT
ACCGGAGTGCCAGCACGCTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACAGACTTTACCCTGACA
ATCAGCTCCGTGCAGCCTGAGGACCTGGCCGATTATCACTGCGGCCAGTCTTACAAT
TTCCCATATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 13)

NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSCRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNR
 YTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGKLEIK (SEQ ID
 NO: 14)

6F7H2:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCT
 GTGAAGGTGAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACATCCTATTGGATGAACTGG
 GTGCGGCAGAGACCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGAATCATCGACCCTTCCGA
 TTCTGAGACCTCTAATGCCCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCCTGACAGTGGACA
 AGAGCACCTCCACAGCCTACATGCACCTGAGCTCCCTGAGGAGCGAGGACACAGCC
 GTGTACTATTGCGCCAGGCTGTACCGCTGGTATTTTGACGTGTGGGGAGCAGGAACC
 ACAGTGACCGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 15)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGLEWIGIIDP
 SDSETSNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDVAVYYCARLYRWYFDVWGAG
 TTVTSS (SEQ ID NO: 16)

6F7L2:

AACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGCCACACTGTCTCTGAGCCCAGGAGAGA
 GGGTGACCCTGTCCTGTAGAGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACGTGTCTTGGTTTC
 AGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTAGGCTGCTGATCTATGGCGCCAGCAACAGGGCA
 ACCGGCATCCCCGCACGCTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACAGACTTTACCCTGACA
 ATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACCTGGCCGATTACTATTGCGGCCAGTCTTACAAT
 TTCCCATATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 17)

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRA
 TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLADYYCGQSYNFPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:
 18)

6F7H3:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCT
 GTGAAGGTGAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACATCCTATTGGATGAACTGG
 GTGCGGCAGGCACCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGCATCATCGACCCTTCCGA
 TTCTGAGACCTCTTACGCCAGAAGTTTCAGGGCAGGGTACCCTGACAGTGGACA
 AGAGCACCTCCACAGCCTATATGGAGCTGAGCTCCCTGCGCAGCGAGGACACAGCC
 GTGTACTATTGCGCCCGGCTGTACAGATGGTATTTTGACGTGTGGGGAGCAGGAACC
 ACAGTGACCGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 19)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQAPQGLEWIGIIDP
 SDSETSNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLYRWYFDVWGAG
 TTVTSS (SEQ ID NO: 20)

6F7L3:

AACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGCCACACTGTCTCTGAGCCCAGGAGAGA
 GGGTGACCCTGTCCTGTAGAGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACCTGTCTTGGTATC
 AGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTAGGCTGCTGATCTACGGAGCCAGCACCAGGGCA
 ACAGGCATCCCCGCACGCTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTTACCCTGACA

ATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCCGTGTACTATTGCGGCCAGTCTTACAAT
TTCCCATATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 21)

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRASEIVGTYLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCGQSYNFPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:
22)

Каркасная область тяжелой цепи 6F7

FR-H1: QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKAS (SEQ ID NO: 23)

FR-H2: MNWVKQRPGQGLEWIGM (SEQ ID NO: 24)

FR-H3: HNNQMFKDKATLTVDKSSNTAYMHLSSLTSEDSAVYHC (SEQ ID NO:
25)

FR-H4: WGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 26)

Каркасная область легкой цепи 6F7

FR-L1: NIVMTQSPKSMMSLGERVTLSCCKAS (SEQ ID NO: 27)

FR-L2: VSWFQQKPHQSPKLLIY (SEQ ID NO: 28)

FR-L3: NRYTGVDPDRFTGSGSATDFTLTISNVQAEDLADYHC (SEQ ID NO: 29)

FR-L4: FGGGKLEIK (SEQ ID NO: 30)

Каркасная область 6F7H1

FR-H1: QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKAS (SEQ ID NO: 31)

FR-H2: MNWVRQRPGQGLEWIGM (SEQ ID NO: 32)

FR-H3: HNAQKFQGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDVAVYYC (SEQ ID NO:
33)

FR-H4: WGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 34)

Каркасная область 6F7L1

FR-L1: NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSCRAS (SEQ ID NO: 35)

FR-L2: VSWFQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO: 36)

FR-L3: NRYTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDLADYHC (SEQ ID NO: 37)

FR-L4: FGGGKLEIK (SEQ ID NO: 38)

Каркасная область 6F7H2

FR-H1: QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCCKAS (SEQ ID NO: 39)

FR-H2: MNWVRQRPGQGLEWIGI (SEQ ID NO: 40)

FR-H3: SNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDVAVYYC (SEQ ID NO: 41)

FR-H4: WGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 42)

Каркасная область 6F7L2

FR-L1: NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRAS (SEQ ID NO: 43)

FR-L2: VSWFQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO: 44)

FR-L3: NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLADYHC (SEQ ID NO: 45)

FR-L4: FGGGKLEIK (SEQ ID NO: 46)

Каркасная область 6F7H3

FR-H1: QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCCKAS (SEQ ID NO: 47)

FR-H2: MNWVRQAPGQGLEWIGI (SEQ ID NO: 48)

FR-H3: SYAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYC (SEQ ID NO: 49)

FR-H4: WGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 50)

Каркасная область 6F7L3

FR-L1: NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSKRAS (SEQ ID NO: 51)

FR-L2: LSWYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO: 52)

FR-L3: TRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 53)

FR-L4: FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 54)

Константная область тяжелой цепи IgG1M

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:55)

Константная область тяжелой цепи C-область цепи гамма-4 Ig

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:56)

Константная область легкой цепи C-область каппа-цепи Ig

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:57)

Константная область тяжелой цепи C-область цепи гамма-1 Ig

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:58)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 6F7H1L1(G1M)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGQGLEWIGMID
PSDSETHNAQKFKGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDVAVYYCARLYRWYFDVWGA
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP

QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:59)

Аминокислотная последовательность легкой цепи 6F7H1L1(G1M)

NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNR
YTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:60)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 6F7H2L2(G1M)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGQGLEWIGIIDP
SDSETSNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDVAVYYCARLYRWYFDVWGAG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:61)

Аминокислотная последовательность легкой цепи 6F7H2L2(G1M)

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLADYYCGQSYNFPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:62)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 6F7H3L3(G1M)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQAPQGQGLEWIGIIDP
SDSETSNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLYRWYFDVWGAG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:63)

Аминокислотная последовательность легкой цепи 6F7H3L3(G1M)

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSRASEIVGTYLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCGQSYNFPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:64)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 6F7H1L1(hG4)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGQGLEWIGIMID
PSDSETHNAQKFQGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDVAVYYCARLYRWYFDVWGA
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVNHDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAP

EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:65)

Аминокислотная последовательность легкой цепи 6F7H1L1(hG4)

NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNR
YTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:66)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 6F7H2L2(hG4)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGQGLEWIGIIDP
SDSETSNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDVAVYYCARLYRWYFDVWGAG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPE
FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT
VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:67)

Аминокислотная последовательность легкой цепи 6F7H2L2(hG4)

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLADYYCGQSYNFPYTFGGGKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:68)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 6F7H3L3(hG4)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQAPQGQGLEWIGIIDP
SDSETSNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLYRWYFDVWGAG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPE
FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT
VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:69)

Аминокислотная последовательность легкой цепи 6F7H3L3(hG4)

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSRASEIVGTYLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCGQSYNFPYTFGGGKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:70)

Последовательность mFc tag: (SEQ ID NO: 71)

PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLSLSPIVTCVVVDVSEDDPD
VQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPL

APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTE
 LNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG
 К

Последовательность тяжелой цепи hIgG (SEQ ID NO: 72)

EVQLEQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFTTYWIEWIKQRPGHSLEWIGEILPGS
 DSTYYNEKVKGKVTFTADASSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGFYVYWGQGTTL
 TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVD
 KSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

Последовательность легкой цепи hIgG (SEQ ID NO: 73)

DIELTQSPATLSVTPGDSVLSLSCRASQSSISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYTSQSMS
 GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGVYFCQQSGSWPRTFGGGTKLDIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSL
 TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Аминокислотная последовательность TEV представляет собой ENLYFQG (SEQ ID
 NO: 74)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с CD47, где

антитело включает последовательности CDR, выбранные из следующих последовательностей CDR, содержащихся в переменных областях тяжелой цепи и переменных областях легкой цепи:

(1) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 2, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 4; или

(2) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 12, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 14; или

(3) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 16, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 18; или

(4) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 20, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 22;

предпочтительно, антитело включает:

HCDR1, включающую или состоящую из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью;

HCDR2, включающую или состоящую из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью;

и

HCDR3, включающую или состоящую из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно

81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью;

LCDR1, включающую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью;

LCDR2, включающую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью;

и

LCDR3, включающую или состоящую из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело дополнительно включает комбинацию FR в варибельной области тяжелой цепи и FR в варибельной области легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из следующих:

(1) FR в варибельной области тяжелой цепи включают FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4, где FR-H1 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 23, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 23; FR-H2 включает или состоит из аминокислотной последовательности,

представленной в SEQ ID NO: 24, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24; FR-H3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25; и FR-H4 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 26, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 26;

FR в вариабельной области легкой цепи включают FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, где FR-L1 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 27, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 27, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 27; FR-L2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 28, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 28, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной

последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 28; FR-L3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 29, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 29; и FR-L4 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 30, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 30, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 30;

(2) FR в вариабельной области тяжелой цепи включают FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4, где FR-H1 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 31, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 31; FR-H2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 32, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 32, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 32; FR-H3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 33, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 33, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 33; и FR-H4 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 34, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 34, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 34;

FR в вариабельной области легкой цепи включают FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, где FR-L1 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 35, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 35, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 35; FR-L2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 36, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 36; FR-L3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 37, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 37; и FR-L4 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 38, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в

SEQ ID NO: 38, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 38;

(3) FR в вариабельной области тяжелой цепи включают FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4, где FR-H1 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 39, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 39, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 39; FR-H2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 40, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 40, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 40; FR-H3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 41, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 41, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 41; и FR-H4 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 42, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 42, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 42;

FR в вариабельной области легкой цепи включают FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, где FR-L1 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной

в SEQ ID NO: 43, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 43, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 43; FR-L2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 44, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 44, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 44; FR-L3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 45, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 45; и FR-L4 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 46, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 46, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 46; и

(4) FR в вариабельной области тяжелой цепи включают FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4, где FR-H1 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 47, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 47, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ

ID NO: 47; FR-H2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 48, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 48, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 48; FR-H3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 49, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 49, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 49; и FR-H4 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 50, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 50, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 50;

FR в вариабельной области легкой цепи включают FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, где FR-L1 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 51, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 51, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 51; FR-L2 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 52, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 52, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций

(предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 52; FR-L3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 53, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 53; и FR-L4 включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 54, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 54.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, где антитело включает:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, включающую или состоящую из: аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, или

аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, и

вариабельную область легкой цепи, включающую или состоящую из: аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4, или

аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно

замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4;

(2) вариабельную область тяжелой цепи, включающую или состоящую из: аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12, или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 12, или

аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 12; и

вариабельную область легкой цепи, включающую или состоящую из: аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14, или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14, или

аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14;

(3) вариабельную область тяжелой цепи, включающую или состоящую из: аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16, или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16, или

аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16; и

вариабельную область легкой цепи, включающую или состоящую из: аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18, или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:

18, или

аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 18; и

(4) вариабельную область тяжелой цепи, включающую или состоящую из:

аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20, или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 20, или

аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 20; и

вариабельную область легкой цепи, включающую или состоящую из:

аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22, или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 22, или

аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 22.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-3, включающее HCDR1-3 и LCDR1-3, как показано ниже, где

аминокислотные последовательности 3 CDR-областей вариабельной области тяжелой цепи являются следующими:

HCDR1: GYTFTSYW (SEQ ID NO: 5),

HCDR2: IDPSDSET (SEQ ID NO: 6), и

HCDR3: ARLYRWYFDV (SEQ ID NO: 7); и

аминокислотные последовательности 3 CDR-областей вариабельной области легкой цепи являются следующими:

LCDR1: EIVGTY (SEQ ID NO: 8),

LCDR2: GAS (SEQ ID NO: 9), и

LCDR3: GQSYNFPYT (SEQ ID NO: 10).

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-4, где антитело дополнительно включает константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, и константные области происходят из видов, отличных от мышинных, например, из человеческого антитела, предпочтительно из человеческого IgG или IgM, более предпочтительно из IgG1; предпочтительно, константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig, ACCESSION No. P01857 (SEQ ID NO: 58) или С-область цепи гамма-4 Ig, ACCESSION No. P01861.1 (SEQ ID NO: 56); константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, ACCESSION No. P01834 (SEQ ID NO: 57).

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-5, где антитело включает комбинацию тяжелой цепи и легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из следующих:

(1) тяжелая цепь, представленная в SEQ ID NO: 59, и легкая цепь, представленная в SEQ ID NO: 60;

(2) тяжелая цепь, представленная в SEQ ID NO: 61, и легкая цепь, представленная в SEQ ID NO: 62;

(3) тяжелая цепь, представленная в SEQ ID NO: 63, и легкая цепь, представленная в SEQ ID NO: 64;

(4) тяжелая цепь, представленная в SEQ ID NO: 65, и легкая цепь, представленная в SEQ ID NO: 66;

(5) тяжелая цепь, представленная в SEQ ID NO: 67, и легкая цепь, представленная в SEQ ID NO: 68; и

(6) тяжелая цепь, представленная в SEQ ID NO: 69, и легкая цепь, представленная в SEQ ID NO: 70.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-6, где антитело дополнительно включает аминокислотную мутацию, введенную в положение 234 и/или 235 в соответствии с системой нумерации EU.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-7, где антитело включает мутацию L234A и/или L235A в соответствии с системой нумерации EU.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, где антитело включает комбинацию тяжелой цепи и легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из следующих:

(1) тяжелая цепь, представленная в SEQ ID NO: 59, и легкая цепь, представленная в SEQ ID NO: 60;

(2) тяжелая цепь, представленная в SEQ ID NO: 61, и легкая цепь, представленная в SEQ ID NO: 62; и

(3) тяжелая цепь, представленная в SEQ ID NO: 63, и легкая цепь, представленная в SEQ ID NO: 64.

10. Выделенный полипептид, включающий:

(1) последовательности, представленные в SEQ ID NO: 5, 6 и 7, где полипептид, как часть антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело, дополнительно включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8, 9 и 10;

(2) последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8, 9 и 10, где полипептид, как часть антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело, дополнительно включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 5, 6 и 7;

(3) последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2, 12, 16 и 20, последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, где полипептид, как часть антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело дополнительно включает последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4, 14, 18 и 22, последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью; или

(4) последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4, 14, 18 и 22, последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, где полипептид, как часть антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем моноклональное антитело дополнительно включает последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2, 12, 16 и 20, последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или

несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-10, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, Fab/c, фрагмента определяющей комплементарность области (CDR), одноцепочечного антитела (например, scFv), бивалентного антитела и доменного антитела.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-11, где антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело).

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-12, где антитело связывается с белком CD47 человека с KD менее примерно 10^{-5} M, например, менее примерно 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M или 10^{-10} M или менее.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-13, где антитело связывается с белком CD47 человека с EC50 менее примерно 100 нМ, например, менее примерно 10 нМ, 1 нМ, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ или 0,1 нМ или менее.

15. Выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид, выбранный из:

(1) полипептида, включающего последовательности, представленные в SEQ ID NO: 5, 6 и 7, где полипептид, как часть антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело, дополнительно включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8, 9 и 10;

(2) полипептида, включающего последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8, 9 и 10, где полипептид, как часть антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело, дополнительно включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 5, 6 и 7;

(3) полипептида, включающего последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2, 12, 16 и 20, последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или полипептида с аминокислотной последовательностью, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, где полипептид, как часть антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело дополнительно включает последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4, 14, 18 и 22, последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную

последовательность, имеющую одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью; или

(4) полипептида, включающего последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4, 14, 18 и 22, последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или полипептида с аминокислотной последовательностью, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, где полипептид, как часть антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело дополнительно включает последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2, 12, 16 и 20, последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью.

16. Выделенный полинуклеотид по п. 15, где

(1) полинуклеотидная молекула включает или состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, 11, 15 или 19, или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью;

(2) полинуклеотидная молекула включает или состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, 13, 17 или 21, или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с этой последовательностью.

17. Вектор, включающий полинуклеотидную молекулу по п.15 или 16.

18. Клетка-хозяин, включающая полинуклеотидную молекулу по п. 15 или 16 или вектор по п. 17.

19. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из п.п.1-14, включающий: культивирование клетки-хозяина по п. 18 в подходящих условиях и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клеточных культур.

20. Конъюгат антитела, включающий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-14 и конъюгированный фрагмент, связанный с ним, где конъюгированный фрагмент представляет собой метку очистки (например, His-метка), цитотоксическое средство или детектируемую метку, предпочтительно, конъюгированный фрагмент представляет собой радиоизотоп, люминесцентное вещество, окрашенное вещество, фермент или полиэтиленгликоль.

21. Мультиспецифическое антитело, предпочтительно биспецифическое антитело, включающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-14, и антитело или антигенсвязывающий фрагмент против другого антигена и/или другого антигенного эпитопа.

22. Слитый белок, включающий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-14.

23. Набор, включающий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-14, или конъюгат антитела по п. 20, мультиспецифическое антитело по п. 21 или слитый белок по п. 22.

24. Набор по п. 23, дополнительно включающий вторичное антитело, которое специфически распознает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; необязательно, вторичное антитело, дополнительно включающее детектируемую метку, такую как радиоизотоп, люминесцентное вещество, окрашенное вещество, фермент или полиэтиленгликоль.

25. Линия гибридомных клеток и моноклональное антитело, продуцируемое линией гибридомных клеток, где линия гибридомных клеток представляет собой линию гибридомных клеток LT012 под номером ССТСС NO. 2018135.

26. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из п.п. 1-14, конъюгата антитела по п. 20, мультиспецифического антитела по п. 21 или слитого белка по п. 22 для обнаружения присутствия или уровня CD47 человека в образце или для получения набора для обнаружения присутствия или уровня CD47 человека в образце.

27. Фармацевтическая композиция, включающая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-14, конъюгат антитела по п. 20, мультиспецифическое антитело по п. 21 или слитый белок по п. 22 и, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

28. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из п.п. 1-14, конъюгата антитела по п. 20, мультиспецифического антитела по п. 21 или слитого белка по п. 22 при получении:

лекарственного средства для блокирования связывания CD47 человека с SIRPα человека,

лекарственного средства для блокирования активности CD47 человека или снижения уровня CD47 человека, или

лекарственного средства для блокирования клеточного ответа, опосредованного

связыванием SIRP α человека с CD47.

29. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из п.п. 1-14, конъюгата антитела по п. 20, мультиспецифического антитела по п. 21 или слитого белка по п. 22 при лечении опухоли или при получении лекарственного средства для лечения опухоли, где опухоль предпочтительно представляет собой опухоль, экспрессирующую CD47, предпочтительно рак, например, гематологическое злокачественное новообразование или солидную опухоль, более предпочтительно лимфому, рак толстой кишки или рак молочной железы, более предпочтительно неходжкинскую лимфому и еще более предпочтительно клетки В-клеточной лимфомы.

30. Применение по п. 29, где лекарственное средство находится в форме, подходящей для инъекции, предпочтительно в форме, подходящей для введения путем подкожной инъекции, внутрикожной инъекции, внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции или внутриочаговой инъекции.

31. Способ *in vivo* или *in vitro*, включающий введение клетки, включающей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-14, конъюгат антитела по п. 20, мультиспецифическое антитело по п. 21 или слитый белок по п. 22, или введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела, мультиспецифического антитела или слитого белка, где способ выбран из:

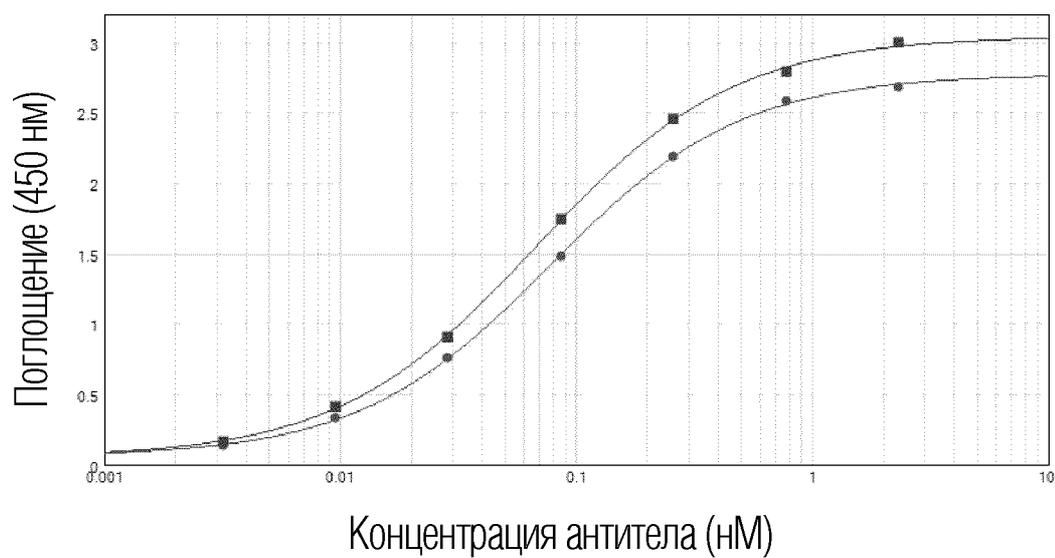
способа блокирования связывания CD47 с SIRP α человека,

способа блокирования активности CD47 человека или снижения уровня CD47 человека, и

способа блокирования клеточного ответа, опосредованного связыванием SIRP α человека с CD47.

По доверенности

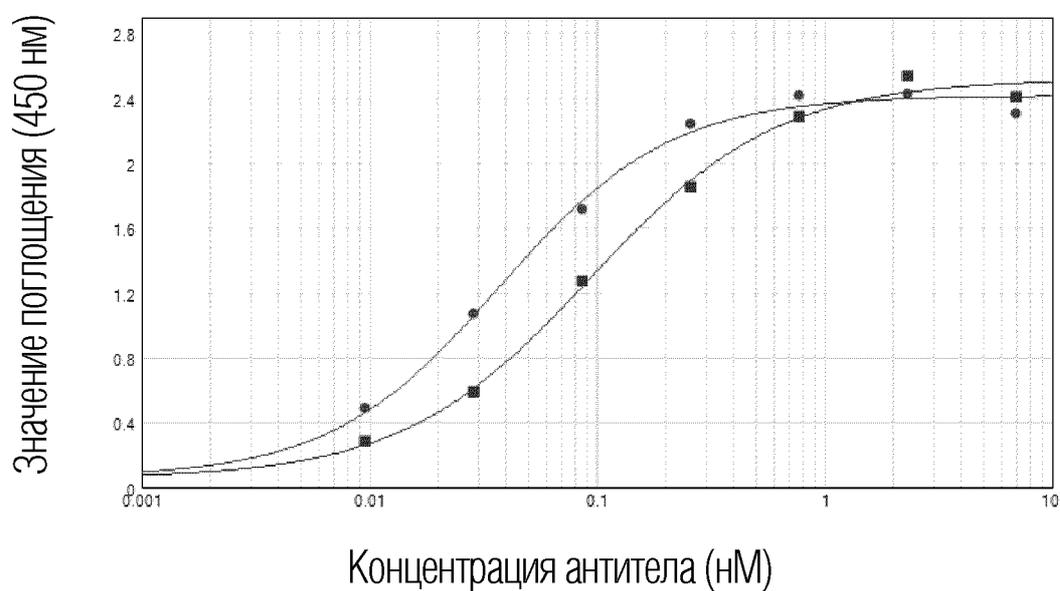
1/9



● 6F7 H1L1 (hG4)
 ■ Hu5F9-G4

6F7 H1L1 (hG4)	Hu5F9-G4
$R^2 = 1.000$	$R^2 = 1.000$
EC50 = 0.078	EC50 = 0.068

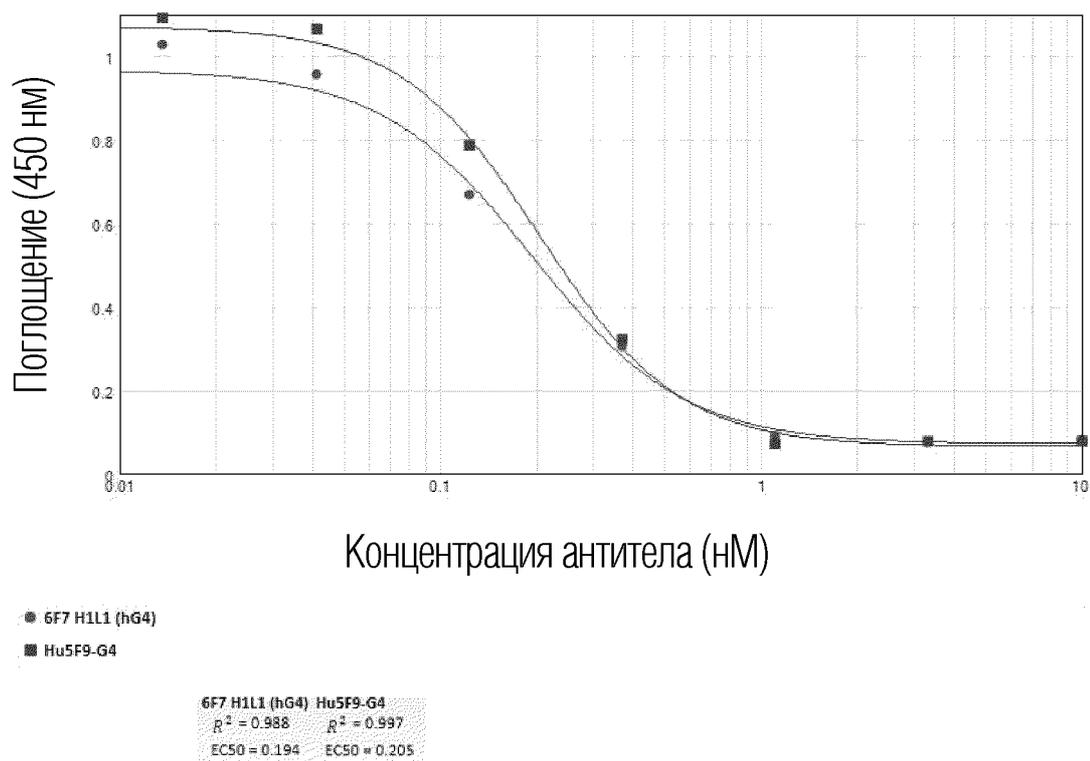
ФИГ. 1



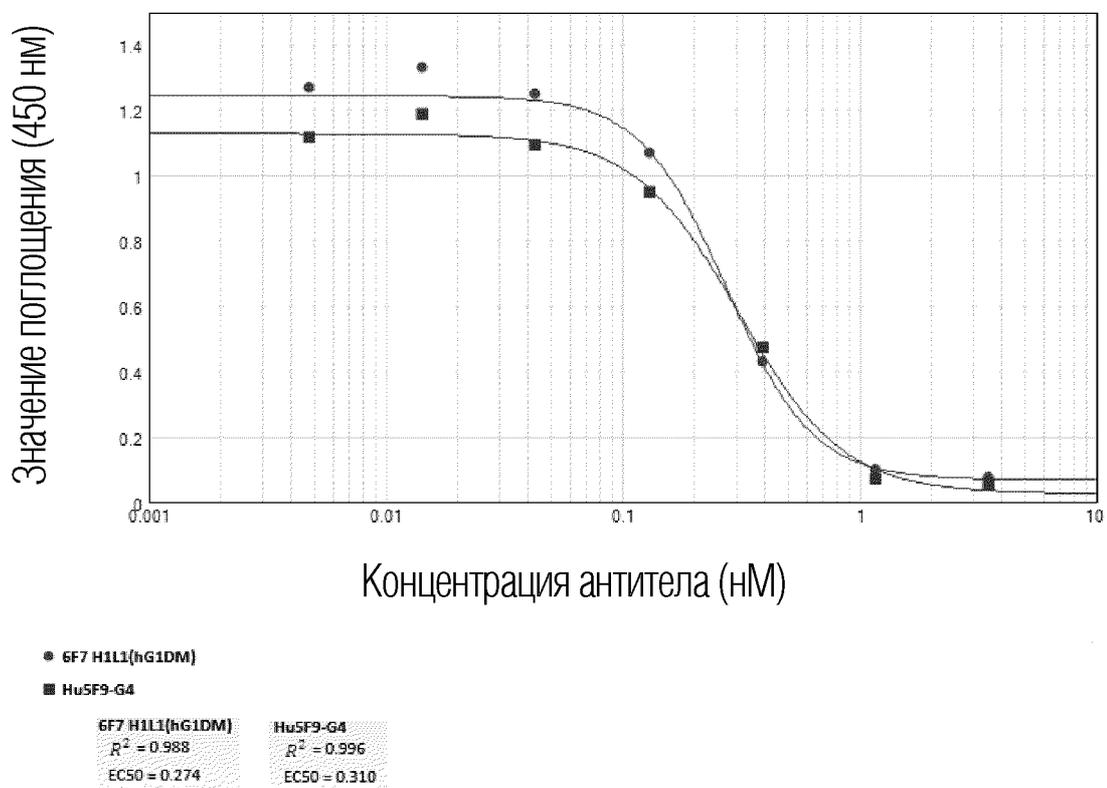
● 6F7 H1L1 (hG1DM)
 ■ Hu5F9-G4

6F7 H1L1 (hG1DM)	Hu5F9-G4
$R^2 = 0.996$	$R^2 = 0.997$
EC50 = 0.037	EC50 = 0.093

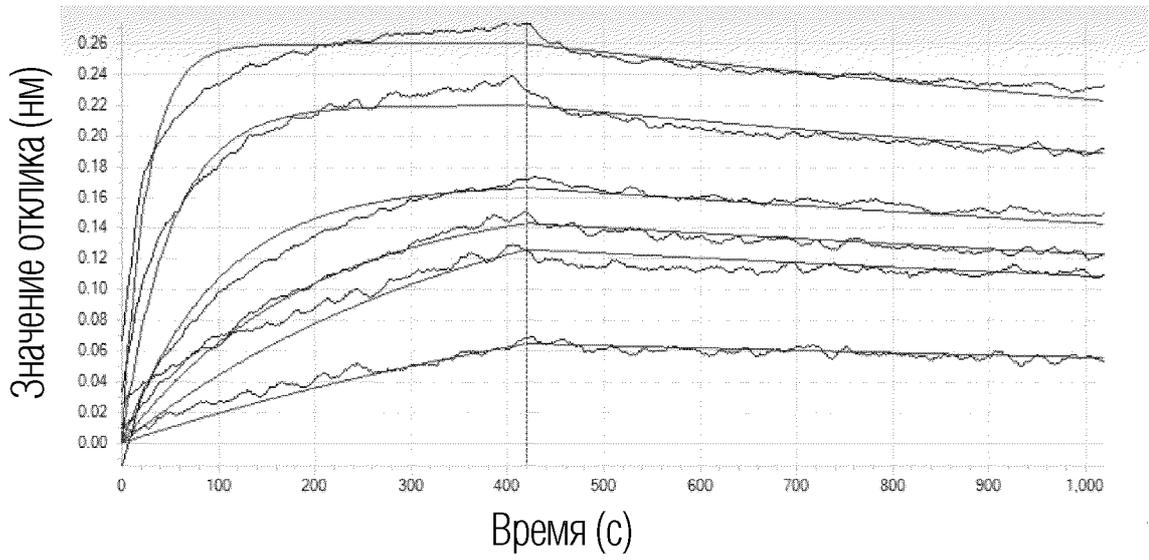
ФИГ. 2



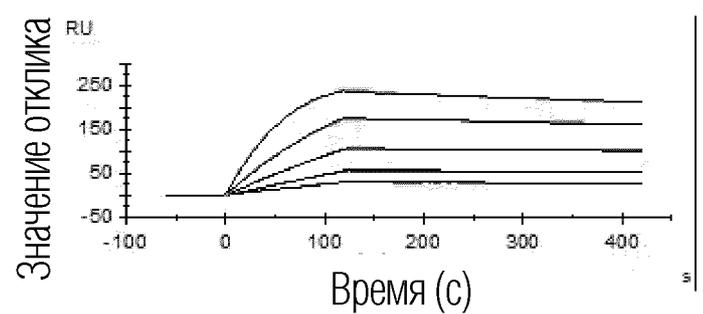
ФИГ. 3



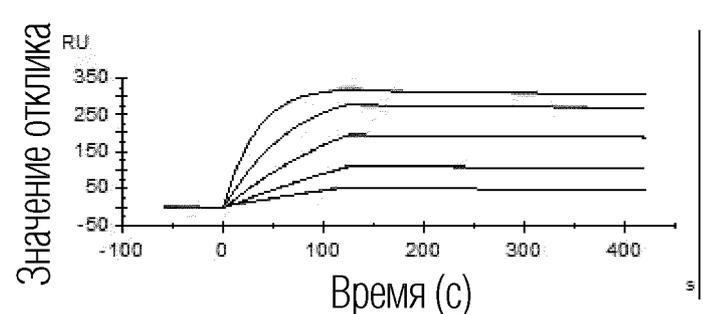
ФИГ. 4



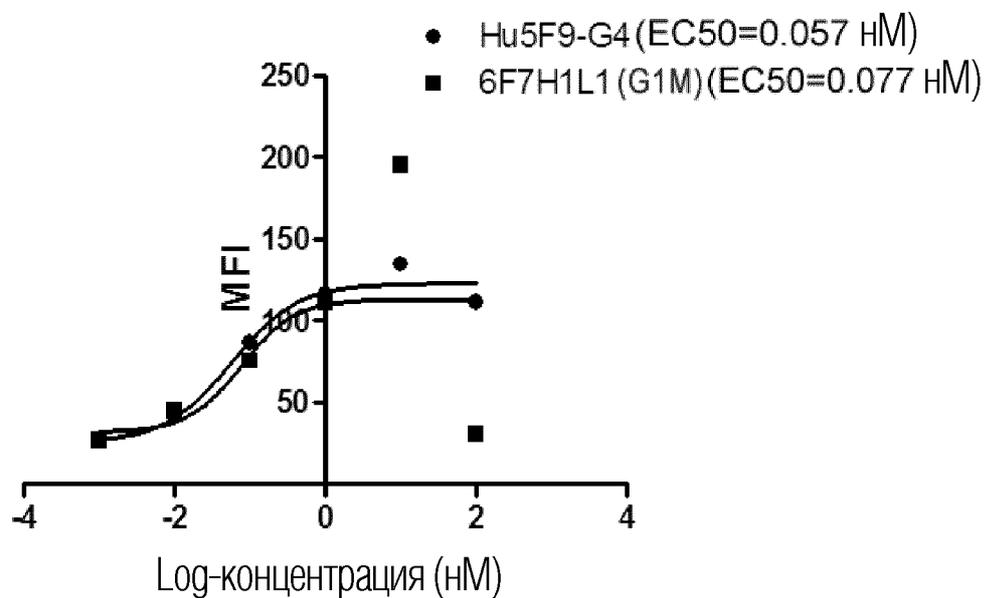
ФИГ. 5



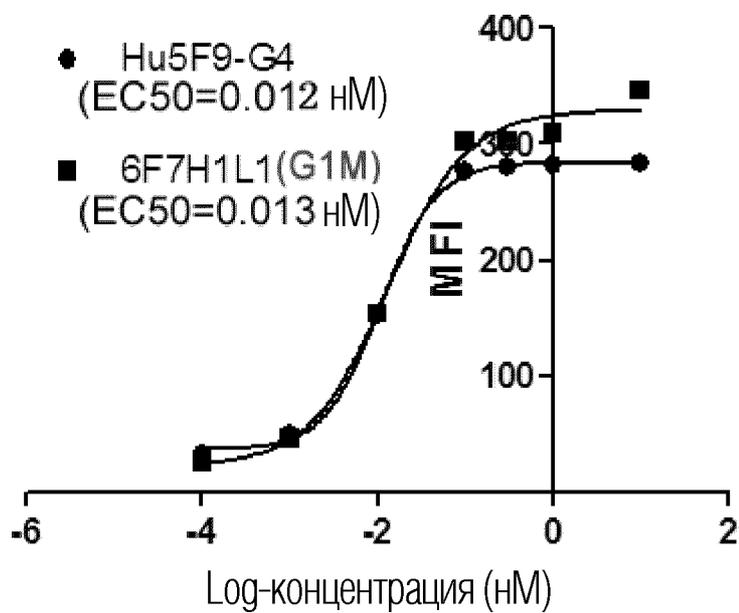
ФИГ. 6



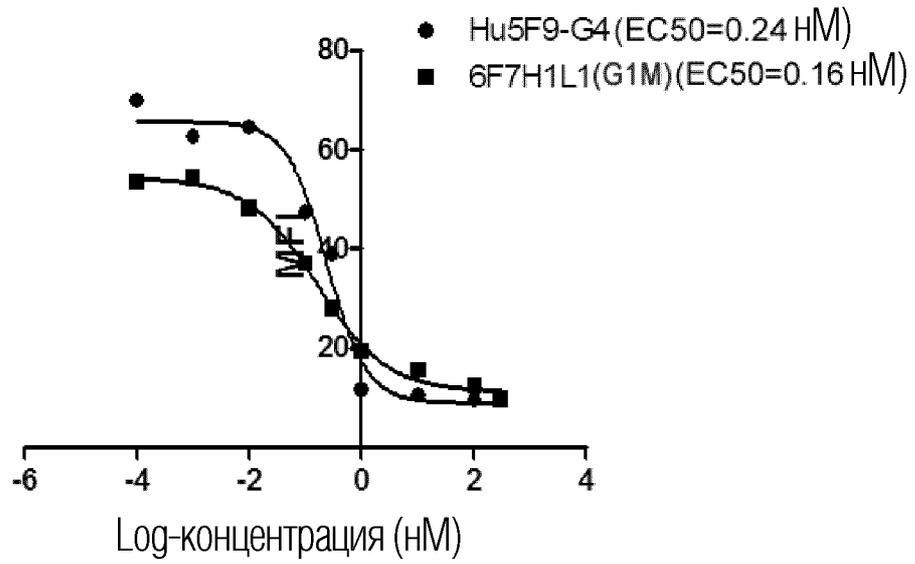
ФИГ. 7



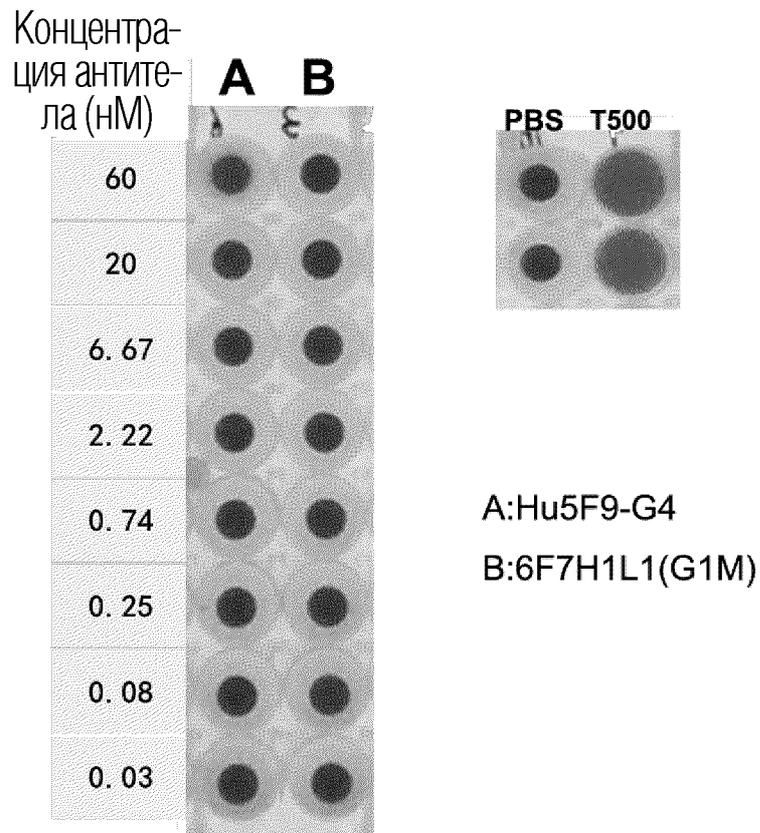
ФИГ. 8



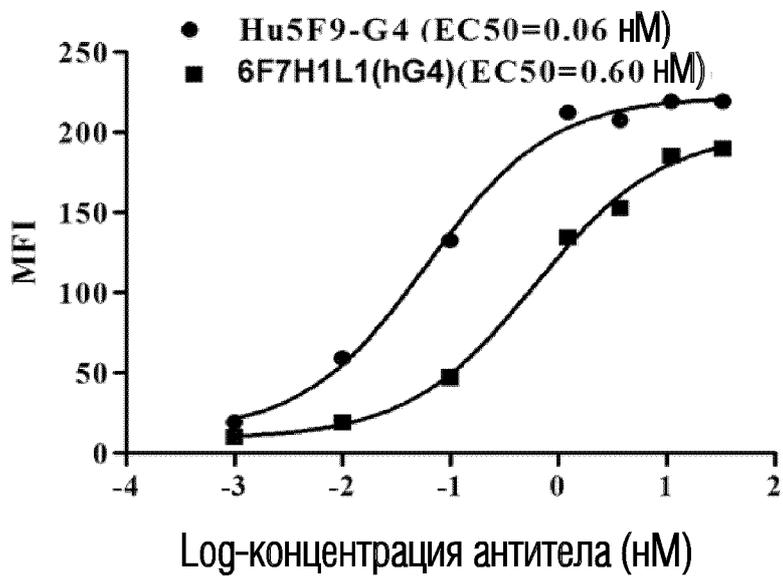
ФИГ. 9



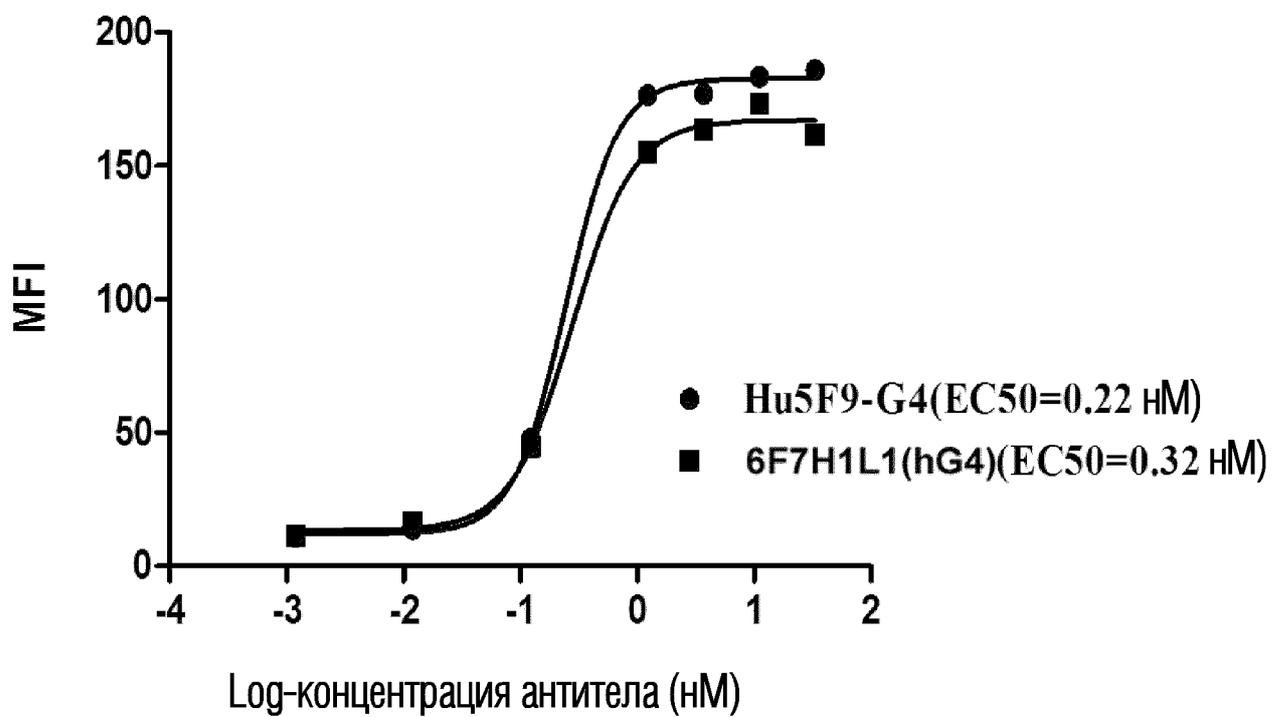
ФИГ. 10



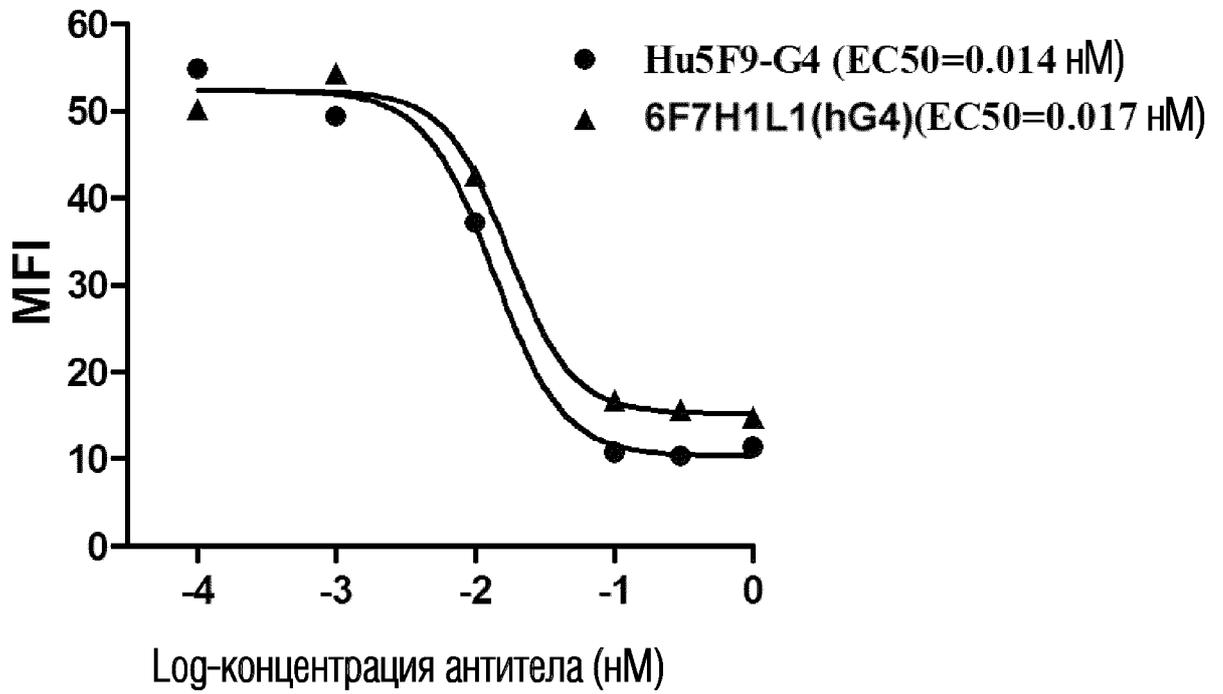
ФИГ. 11



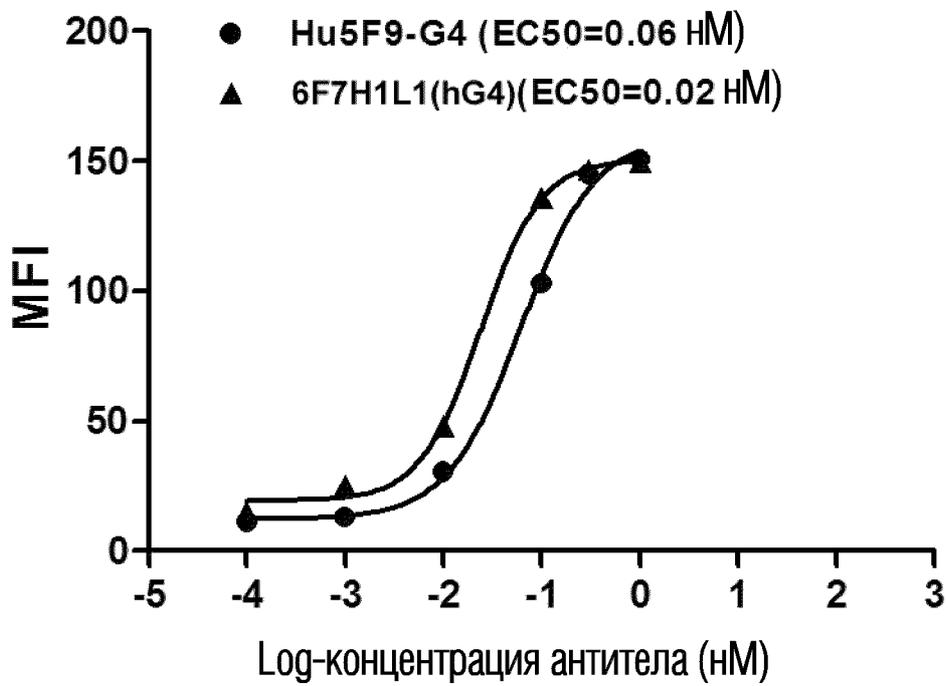
ФИГ. 12



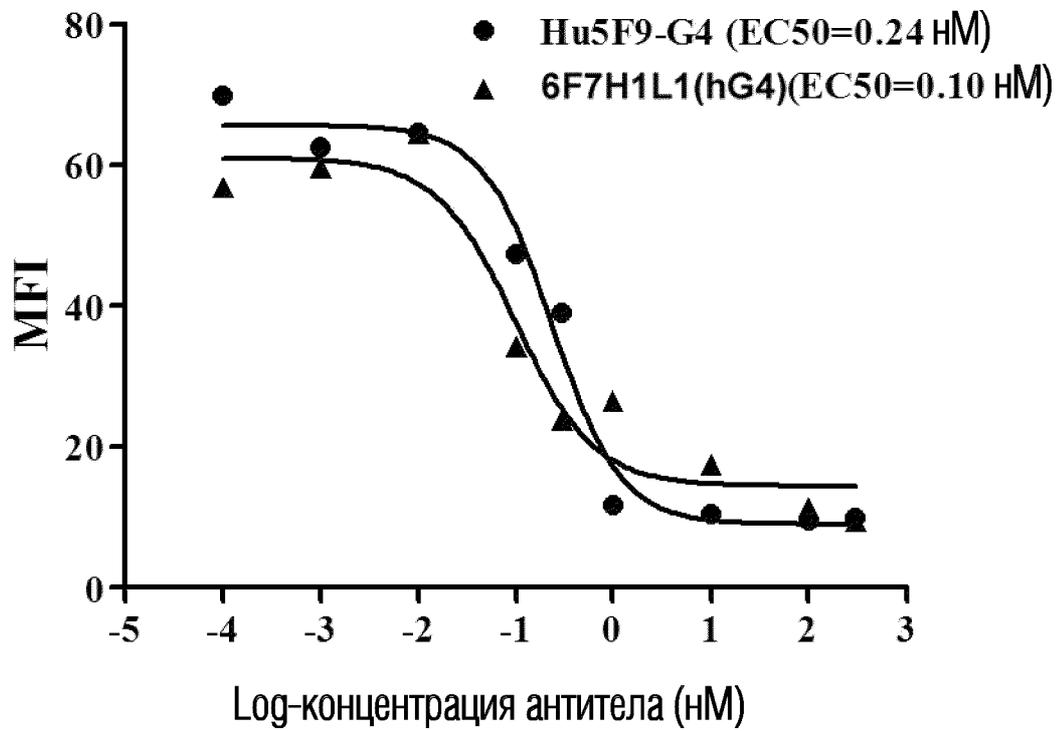
ФИГ. 13



ФИГ. 14

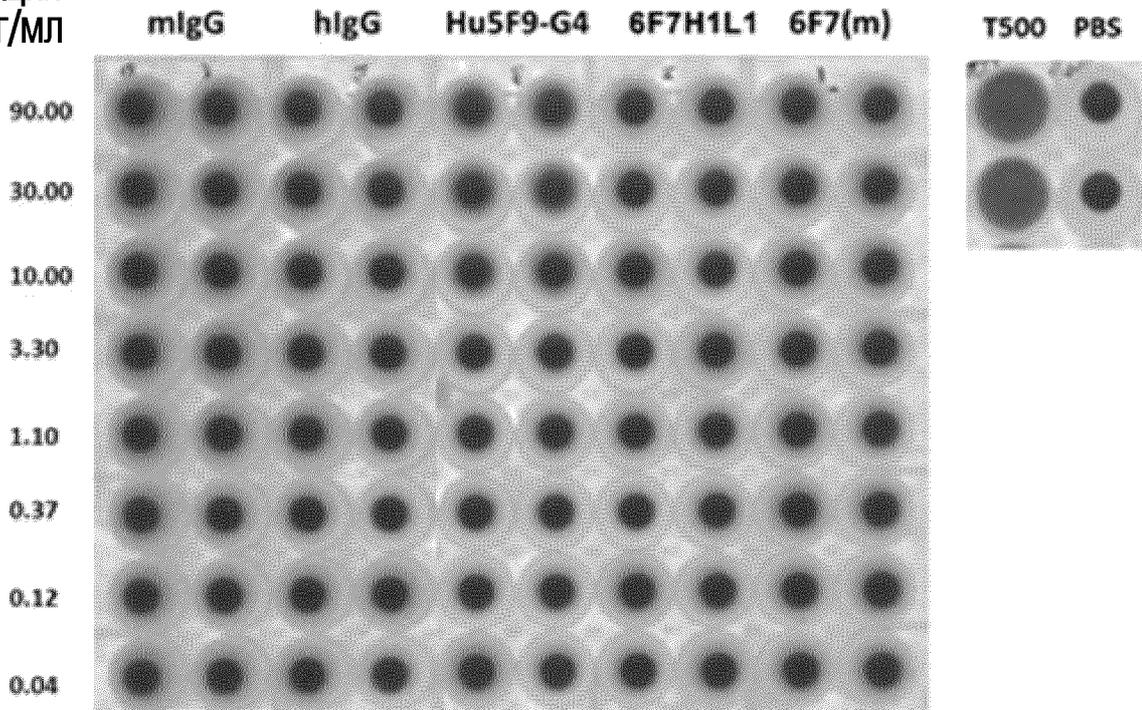


ФИГ. 15

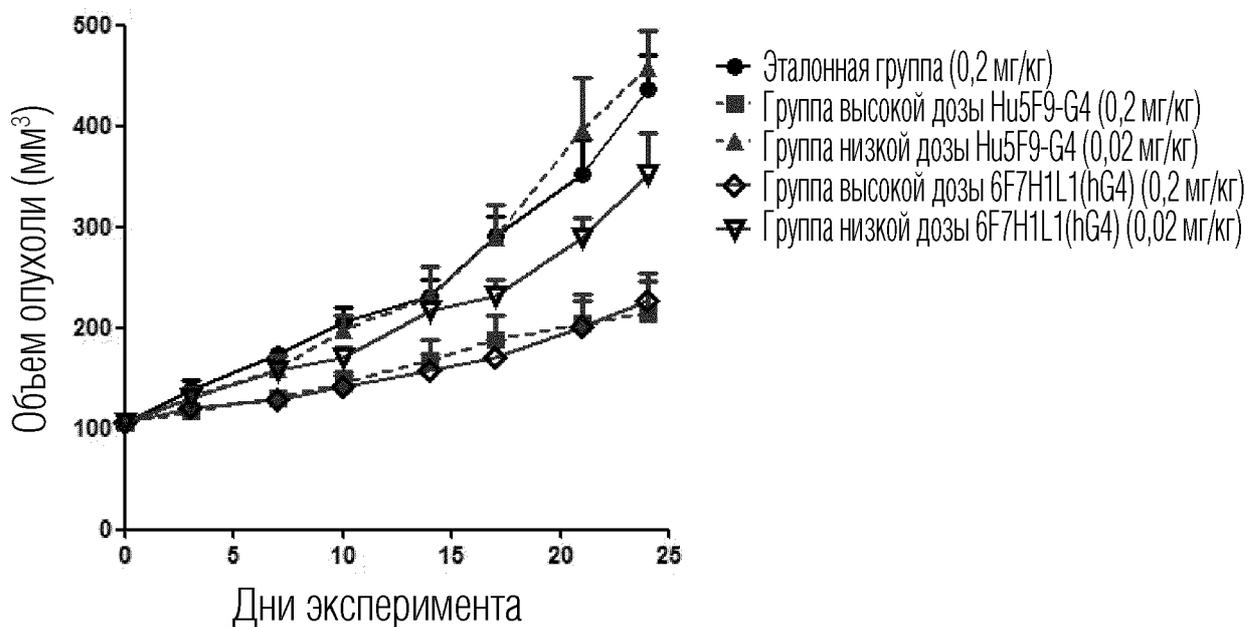


ФИГ. 16

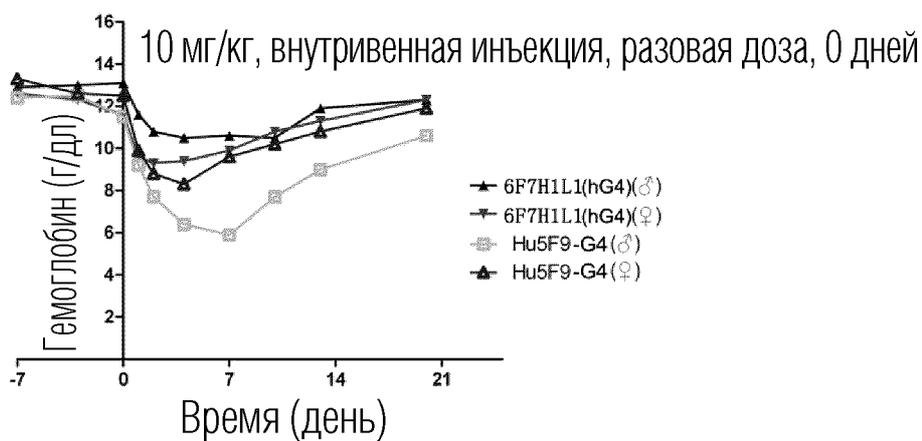
Концен-
трация
мкг/мл



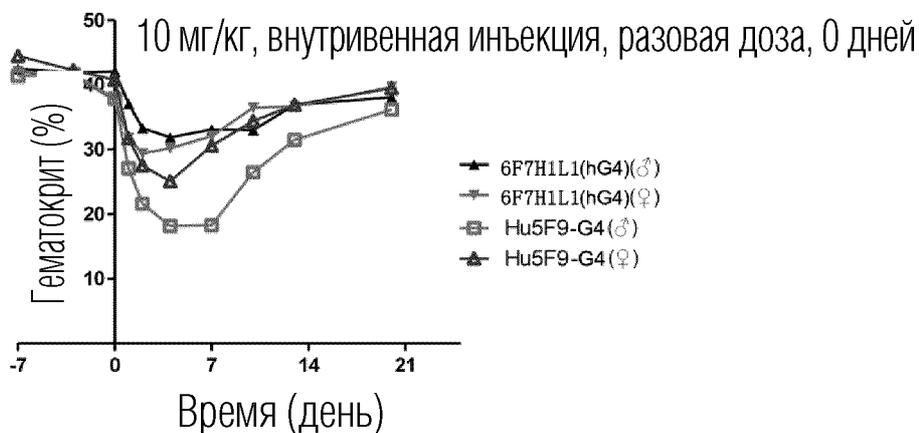
ФИГ. 17



ФИГ. 18



ФИГ. 19



ФИГ. 20