

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291269 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.09.13

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.14

(54) АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧЕСКИЕ В ОТНОШЕНИИ CD47, PD-L1, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/949,120; 63/110,693

(32) 2019.12.17; 2020.11.06

(33) US

(86) PCT/IB2020/061896

(87) WO 2021/124073 2021.06.24

(71) Заявитель:
ПФАЙЗЕР ИНК. (US)

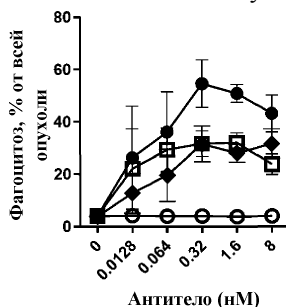
(72) Изобретатель:

Чапарро Риджерс Хавьер Фернандо,
Чэнь Ших-Хсун, Дин Шен, Доминик
Павел Камил, Салек-Ардакани
Шахрам, Стэнфилд Джессика Линн,
Ван Блэрком Томас Джон (US)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Предложены антитела, которые специфически связываются с CD47, и антитела, которые специфически связываются с PD-L1, а также биспецифические антитела против CD47/PD-L1. Также предложено применение этих антител и соответствующих композиций и способов.



A1

202291269

202291269

A1

АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧЕСКИЕ В ОТНОШЕНИИ CD47, PD-L1,**И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с одним или обоими из CD47 и PD-L1. Настоящее изобретение дополнительно относится к биспецифическим антителам, которые специфически связываются с CD47 и PD-L1. Настоящее изобретение также относится к родственным молекулам, например, нуклеиновым кислотам, которые кодируют такие антитела или биспецифические антитела, композициям и связанным способам, например, способам получения и очистки таких антител и биспецифических антител, и их применению в диагностике и терапии.

Предшествующий уровень техники

Белок CD47 сверхэкспрессируется на многих типах опухолей (например, яичников, легкого, головы и шеи) и коррелирует с плохой выживаемостью пациентов. CD47 связывается со своим лигандом SIRP α , представляющем собой контрольную точку врожденного иммунитета, экспрессирующуюся на миелоидных клетках, таких как макрофаги и дендритные клетки (DC), для подавления их активности. Последнее дает возможность опухолевым клеткам, которые сверхэкспрессируют CD47, избегать контроля со стороны врожденного иммунитета. CD47 также экспрессируется на здоровых клетках, таких как эритроциты (RBC) и тромбоциты периферической крови, и показано, что блокирование взаимодействия CD47-SIRP α моноклональными антителами истощает эти клетки, приводя в некоторых случаях к дозолимитирующим токсическим действиям.

Способы иммунотерапии против PD-L1, которые блокируют связывание PD-L1 на опухолевых или антигенпрезентирующих клетках с PD-1 на Т-клетках, приводят к результатам у пациентов с множеством типов рака (например, NSCLC (немелкоклеточный рак легкого), RCC (почечно-клеточный рак), HCC (гепатоклеточная карцинома), HNSCC (плоскоклеточный рак органов головы и шеи), лимфома, карцинома из клеток Меркеля). Тем не менее, даже при этих чувствительных к антителам против PD-L1 типах опухоли многие пациенты не отвечают на лечение. Дополнительно к

вышеперечисленным типам опухолей многие другие типы опухолей с низкой чувствительностью к антителам против PD-(L)1 также обогащены CD47.

Соответственно, учитывая различные ограничения существующих в настоящее время способов лечения с использованием антител против CD47 и антител против PD-L1, необходимы улучшенные молекулы, нацеленные как против CD47, так и PD-L1.

Краткое изложение сущности изобретения

Здесь предложены антитела, которые специфически связываются с CD47, антитела, которые специфически связываются с PD-L1, и биспецифические антитела, которые специфически связываются с CD47 и PD-L1. Также здесь предложены родственные нуклеиновые кислоты, композиции и способы получения и использования антител.

В некоторых воплощениях здесь предложено антитело, которое специфически связывается с CD47, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую первую область VH, определяющую комплементарность (VH CDR1), вторую область VH, определяющую комплементарность (VH CDR2), и третью область VH, определяющую комплементарность (VH CDR3), представленные в SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8 или 9. Возможно, что VH содержит (1) VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, 14, 15, 22, 23, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 37, 38 или 39; (2) VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, 17, 28, 29, 34 или 35; и (3) VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, 24, 30, 36 или 40. Возможно, что антитело дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую первую область VL, определяющую комплементарность (VL CDR1), вторую область VL, определяющую комплементарность (VL CDR2), и третью область VL, определяющую комплементарность (VL CDR3), представленные в SEQ ID NO: 2 или 6. Возможно, что VL содержит (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 53; (2) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или 54; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или 55.

В некоторых воплощениях здесь предложено антитело, которое специфически связывается с CD47, где VH содержит (1) VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, 14 или 15; (2) VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 17; и (3) VH CDR3,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. Возможно, что VL содержит (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; (2) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. Возможно, что VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8 или 9. Возможно, что VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 6. Возможно, что VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3 и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Возможно, что один или оба из: 1) VH, содержащей вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, где вариант последовательности содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 1; и 2) VL, содержащей вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, где вариант последовательности содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 2. Возможно, что замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. Возможно, что замены находятся в остатках, которые не располагаются в области CDR.

В некоторых воплощениях здесь предложено антитело, которое специфически связывается с CD47, где антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых воплощениях здесь предложено антитело, которое специфически связывается с CD47, где антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых воплощениях здесь предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD47, где антитело содержит VH, содержащую последовательность VH QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTN YAIWVRQAPGQGLEWMGGISPLFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARDGGRSSDVGWYVGAMDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 7) или ее вариант, где последовательность имеет вариант аминокислотной последовательности по одному или более чем одному положению 27, 30, 31, 50, 52, 53, 54, 55, 99, 100, 104, 105, 108, 113 или 114 в SEQ ID NO: 7. Возможно, что антитело дополнительно содержит VL, содержащую (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 53; (2) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID

NO: 20 или 54; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или 55. Возможно, что VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 6.

В некоторых воплощениях здесь предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD47, где антитело содержит VH, содержащую последовательность

VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYAISWVRQAPGQGLEWMGGISPLFG
TANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGGRSSDVGWYVGA
MDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 7) или ее вариант, где а) аминокислота в положении 27 представляет собой G (Y27G); б) аминокислота в положении 30 представляет собой S (T30S); в) аминокислота в положении 31 представляет собой S (N31S); г) аминокислота в положении 50 представляет собой R (G50R); д) аминокислота в положении 52 представляет собой I (S52I); е) аминокислота в положении 53 представляет собой G (P53G); ж) аминокислота в положении 54 представляет собой I (L54I); з) аминокислота в положении 55 представляет собой L (F55L); и) аминокислота в положении 99 представляет собой E (D99E); к) аминокислота в положении 100 представляет собой A, S, Q или V (G100A, G100S, G100Q или G100V); л) аминокислота в положении 105 представляет собой E (D105E); м) аминокислота в положении 108 представляет собой Y, F или A (W108Y, W108F или W108A); н) аминокислота в положении 113 представляет собой L или I (M113L или M113I); о) аминокислота в положении 114 представляет собой E (D114E); п) аминокислота в положении 53 представляет собой G и аминокислота в положении 105 представляет собой E; р) аминокислота в положении 53 представляет собой G и аминокислота в положении 114 представляет собой E; с) аминокислота в положении 54 представляет собой A и аминокислота в положении 114 представляет собой E; т) аминокислота в положении 54 представляет собой A и аминокислота в положении 102 представляет собой A; у) аминокислота в положении 54 представляет собой A и аминокислота в положении 104 представляет собой E; ф) аминокислота в положении 27 представляет собой G, аминокислота в положении 54 представляет собой I; и аминокислота в положении 100 представляет собой A; х) аминокислота в положении 27 представляет собой G, аминокислота в положении 54 представляет собой I, аминокислота в положении 100 представляет собой A, и аминокислота в положении 113 представляет собой L; ц) аминокислота в положении 27 представляет собой G, аминокислота в положении 54 представляет собой I, аминокислота в положении 100

представляет собой А, и аминокислота в положении 113 представляет собой I; ч) аминокислота в положении 30 представляет собой S, аминокислота в положении 31 представляет собой S, аминокислота в положении 54 представляет собой I, и аминокислота в положении 100 представляет собой А; щ) аминокислота в положении 27 представляет собой G, аминокислота в положении 31 представляет собой S, аминокислота в положении 54 представляет собой I, аминокислота в положении 100 представляет собой А, и аминокислота в положении 113 представляет собой L; э) аминокислота в положении 30 представляет собой S, аминокислота в положении 31 представляет собой S, аминокислота в положении 54 представляет собой I, аминокислота в положении 100 представляет собой А, и аминокислота в положении 113 представляет собой L; ю) аминокислота в положении 30 представляет собой S, аминокислота в положении 31 представляет собой S, аминокислота в положении 54 представляет собой I, аминокислота в положении 100 представляет собой А, и аминокислота в положении 113 представляет собой I; или я) аминокислота в положении 30 представляет собой S, аминокислота в положении 31 представляет собой S, аминокислота в положении 54 представляет собой I, аминокислота в положении 100 представляет собой А, аминокислота в положении 108 представляет собой Y, и аминокислота в положении 113 представляет собой L. Возможно, что антитело дополнительно содержит VL, содержащую (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 53; (2) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или 54; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или 55. Возможно, что VL содержит последовательность SEQ ID NO: 2 или 6.

В некоторых воплощениях здесь предложено антитело, которое специфически связывается с PD-L1, где антитело содержит VH, содержащую VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 в VH, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 5, 10, 11 или 12. Возможно, что VH содержит (1) VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, 42, 43, 47, 48 или 49; (2) VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, 45, 50, 51, 58 или 59; и (3) VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, 52, 56, 57 или 60. Возможно, что антитело дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 последовательности VL, представленной в SEQ ID NO: 2 или 6. Возможно, что VL содержит (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 53; (2) VL CDR2,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или 54; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или 55.

В некоторых воплощениях здесь предложено антитело, которое специфически связывается с PD-L1, VH содержит (1) VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, 42 или 43; (2) VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44 или 45; и (3) VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46. Возможно, что VL содержит (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; (2) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. Возможно, что VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 5, 10, 11 или 12. Возможно, что VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 6. Возможно, что VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Возможно, что один или оба из: 1) VH, содержащей вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, где вариант последовательности содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 4; и 2) VL, содержащую вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, где вариант последовательности содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 2. Возможно, что замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. Возможно, что замены находятся в остатках, которые не располагаются в области CDR.

В некоторых воплощениях здесь предложено антитело, которое специфически связывается с PD-L1, где антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2. В некоторых воплощениях здесь предложено антитело, которое специфически связывается с PD-L1, где антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

В некоторых воплощениях предложенное здесь выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-L1, где антитело содержит VH, содержащую последовательность

VH

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWVRQAPGKGLEWVGRIKTKA
DGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDPGSYWDSVYG
GMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 11) или ее вариант, где последовательность имеет вариант аминокислотной последовательности по одному или более чем одному положению 56, 57, 61, 62, 103, 104, 105, 107, 109, 112, 113 в SEQ ID NO: 11. Возможно, что антитело дополнительно содержит VL, содержащую (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 53; (2) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или 54; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или 55. Возможно, что VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 6.

В некоторых воплощениях предложенное здесь выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-L1, где антитело содержит а VH содержащую последовательность

VH

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWVRQAPGKGLEWVGRIKTKA
DGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDPGSYWDSVYG
GMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 11) или ее вариант, где а) аминокислота в положении 56 представляет собой Е (D56E) и аминокислота в положении 57 представляет собой Е или А (G57E или G57A); б) аминокислота в положении 61 представляет собой Q, Е, А или S, (D61Q, D61E, D61A или D61S) и аминокислота в положении 62 представляет собой Е, S, Q, А (Y62E, Y62S, Y62Q или Y62A); в) аминокислота в положении 103 представляет собой I (G103I); г) аминокислота в положении 104 представляет собой А, Н, Y, Е или I (S104A, S104H, S104Y, S104E или S104I); д) аминокислота в положении 105 представляет собой Н (Y105H); е) аминокислота в положении 107 представляет собой S, L или Y (D107S, D107L или D107Y); ж) аминокислота в положении 109 представляет собой S (V109S); з) аминокислота в положении 112 представляет собой А или S (G112A или G112S); или и) аминокислота в положении 113 представляет собой L (M113L). Возможно, что антитело дополнительно содержит VL, содержащую (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 53; (2) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или 54; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или 55. Возможно, что VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 6.

В некоторых воплощениях предложенного здесь антитела, антитело выбрано из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента F(ab')₂, фрагмента Fd, фрагмента Fv, одноцепочечного фрагмента Fv (scFv), стабилизированного дисульфидными связями фрагмента Fv (dsFv), фрагмента однодоменного антитела (dAb), моноклонального антитела, химерного антитела, биспецифического антитела, триспецифического антитела, мультиспецифического антитела, биспецифического гетеродимерного антитела, биспецифического гетеродимерного IgG, поликлонального антитела, меченого антитела, гуманизированного антитела, человеческого антитела и их фрагментов. Возможно, что антитело содержит каркасную область человеческой или гуманизированной VH и каркасную область человеческой или гуманизированной VL. Возможно, что антитело представляет собой биспецифическое антитело.

В некоторых воплощениях предложенного здесь биспецифического антитела это биспецифическое антитело специфически связывается с CD47 и PD-L1. Возможно, что антитело содержит первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, где первый антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с CD47 и второй антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с PD-L1, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и VL, где второй антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и VL, и где аминокислотная последовательность VL первого антигенсвязывающего фрагмента и аминокислотная последовательность VL второго антигенсвязывающего фрагмента имеют одну и ту же аминокислотную последовательность. Возможно, что аминокислотная последовательность VL первого антигенсвязывающего фрагмента и аминокислотная последовательность VL второго антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, или ее вариант, содержащий одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 2. Возможно, что аминокислотная последовательность VL первого антигенсвязывающего фрагмента и аминокислотная последовательность VL второго антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, или ее вариант, содержащий одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 6. Возможно, что замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. Возможно, что замены находятся в остатках, которые не располагаются в области CDR.

В некоторых воплощениях здесь предложено биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, содержащее первый антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD47, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-L1, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и VL, где второй антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и VL, и где одна, две, три или все четыре из: а) первого антигенсвязывающего фрагмента VH содержит VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 последовательности VH, представленной в SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8 или 9; б) первого антигенсвязывающего фрагмента VL содержит VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 последовательности VL, представленной в SEQ ID NO: 2; в) второго антигенсвязывающего фрагмента VH содержит VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 последовательности VH, представленной в SEQ ID NO: 4, 5, 10, 11 или 12; и г) второй антигенсвязывающий фрагмент VL содержит VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 последовательности VL, представленной в SEQ ID NO: 2 или 6. Возможно, что одна, две, три или все четыре из: а) первого антигенсвязывающего фрагмента VH содержит (1) VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, 14, 15, 22, 23, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 37, 38 или 39; (2) VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, 17, 28, 29, 34 или 35; и (3) VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, 24, 30, 36 или 40; б) первый антигенсвязывающий фрагмент VL содержит (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 53; (2) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или 54; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или 55; в) второй антигенсвязывающий фрагмент VH содержит (1) VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, 42, 43, 47, 48 или 49; (2) VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, 45, 50, 51, 58 или 59; и (3) VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, 52, 56, 57 или 60; и г) второй антигенсвязывающий фрагмент VL содержит (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 53; (2) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или 54; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или 55. Возможно, что одна, две, три или все четыре из: а) первого антигенсвязывающего фрагмента VH содержит (1) VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, 14 или 15; (2) VH CDR2, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 17; и (3) VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; б) первый антигенсвязывающий фрагмент VL содержит (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; (2) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; в) второй антигенсвязывающий фрагмент VH содержит (1) VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, 42 или 43; (2) VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44 или 45; и (3) VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; и г) второй антигенсвязывающий фрагмент VL содержит (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; (2) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. Возможно, что одна, две, три или все четыре из: а) первого антигенсвязывающего фрагмента VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3; б) первый антигенсвязывающий фрагмент VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; в) второй антигенсвязывающий фрагмент VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; и г) второй антигенсвязывающий фрагмент VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых воплощениях здесь предложено биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, содержащее первый антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD47, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-L1, где антитело содержит первый антигенсвязывающий фрагмент VH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, первый антигенсвязывающий фрагмент VL, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, второй антигенсвязывающий фрагмент VH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и второй антигенсвязывающий фрагмент VL, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых воплощениях здесь предложено биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, содержащее первый антигенсвязывающий фрагмент, который

специфически связывается с CD47, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-L1, где антитело содержит первый антигенсвязывающий фрагмент VH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, первый антигенсвязывающий фрагмент VL, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, второй антигенсвязывающий фрагмент VH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и второй антигенсвязывающий фрагмент VL, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых воплощениях здесь предложено выделенное антитело, содержащее первый антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD47, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-L1, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и VL, где второй антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и VL, и где а) первый антигенсвязывающий фрагмент VH содержит (1) VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, 14 или 15; (2) VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 17; и (3) VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и б) второй антигенсвязывающий фрагмент VH содержит (1) VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, 42 или 43; (2) VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44 или 45; и (3) VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46. Возможно, что первый антигенсвязывающий фрагмент VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и второй антигенсвязывающий фрагмент VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4. Возможно, что а) первый антигенсвязывающий фрагмент VL содержит (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; (2) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и б) второй антигенсвязывающий фрагмент VL содержит (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; (2) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. Возможно, что первый

антигенсвязывающий фрагмент VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и второй антигенсвязывающий фрагмент VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых воплощениях здесь предложено выделенное биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD47, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-L1, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и VL любого предложенного здесь антитела против CD47, и где второй антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и VL любого предложенного здесь антитела против PD-L1.

В некоторых воплощениях в предложенном здесь биспецифическом антителе это биспецифическое антитело содержит домен Fc. Возможно, что домен Fc представляет собой домен Fc IgG1, домен Fc IgG2 или домен Fc IgG4. Возможно, что первая цепь Fc и вторая цепь Fc домена Fc содержат одну или более чем одну модификацию, способствующую ассоциации первой цепи Fc со второй цепью Fc. Возможно, что каждая из первой цепи Fc и второй цепи Fc содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с цепью дикого типа Fc с образованием выступа или впадины, и где одна из цепей Fc содержит выступ, а другая цепь Fc содержит впадину. Возможно, что содержащая выступ цепь Fc содержит одну или обе из мутаций Y349C и/или T366W, и где содержащая впадину цепь Fc содержит одну, две, три или все четыре из мутаций S354C, T366S, L368A и/или Y407V (нумерация в соответствии с индексом EU).

В некоторых воплощениях здесь предложено биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, содержащее тяжелую цепь против CD47, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 или 63, и тяжелую цепь против PD-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64. Возможно, что антитело дополнительно содержит легкую цепь против CD47, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и легкую цепь против PD-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62. Возможно, что легкая цепь против CD47 и легкая цепь против PD-L1 имеют одну и ту же аминокислотную последовательность.

В некоторых воплощениях здесь предложено биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, где антитело содержит первую тяжелую цепь антитела, вторую тяжелую цепь антитела, первую легкую цепь антитела и вторую легкую цепь антитела; где первая

тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 и вторая тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; и где как первая легкая цепь антитела, так и вторая легкая цепь антитела содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62.

В некоторых воплощениях здесь предложено биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, где антитело содержит первую тяжелую цепь антитела, вторую тяжелую цепь антитела, первую легкую цепь антитела и вторую легкую цепь антитела; где первая тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, и вторая тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; и где как первая легкая цепь антитела, так и вторая легкая цепь антитела содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62.

В предложенном здесь антителе в некоторых воплощениях одна или более чем одна из тяжелых цепей в антителе может быть лишена С-концевого лизина. Например, в некоторых воплощениях в предложенном здесь биспецифическом антителе против CD47/PD-L1, одна или более чем одна из тяжелой цепи в антителе может быть лишена С-концевого лизина. Например, в предложенном здесь биспецифическом антителе, содержащем аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, 63 или 64, также включены здесь антитела, которые лишены С-концевого лизина в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 61, 63 или 64.

В некоторых воплощениях предложенного здесь биспецифического антитела против CD47/PD-L1 аффинность вариабельной области антитела против PD-L1 в отношении PD-L1 больше, чем аффинность вариабельной области антитела против CD47 в отношении CD47. Возможно, что аффинность вариабельной области антитела против PD-L1 в отношении PD-L1 от 100 раз до 1000 раз или от 1000 раз до 5000 раз больше, чем аффинность вариабельной области антитела против CD47 в отношении CD47. Возможно, что один или оба из: 1) K_D вариабельной области антитела против PD-L1 составляет 0,1-1 нМ или 0,05-5 нМ и/или 2) K_D вариабельной области антитела против CD47 составляет 10-500 нМ, 10-1000 нМ или 5-1000 нМ.

В некоторых воплощениях предложенного здесь биспецифического антитела против CD47/PD-L1 это антитело представляет собой человеческое, гуманизированное или химерное антитело.

В некоторых воплощениях здесь предложено биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, которое содержит первую тяжелую цепь антитела, вторую тяжелую цепь

антитела, первую легкую цепь антитела и вторую легкую цепь антитела, где одна, две или все три из: а) первой тяжелой цепи антитела обладающей аминокислотной последовательностью, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты вставки плазмиды, депонированной в АТСС, имеющей регистрационный номер АТСС РТА-126910; б) второй тяжелой цепи антитела обладающей аминокислотной последовательностью, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты вставки плазмиды, депонированной в АТСС, имеющей регистрационный номер АТСС РТА-126911; и в) первой легкой цепи антитела и второй легкой цепи антитела обладающими аминокислотной последовательностью, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты вставки плазмиды, депонированной в АТСС, имеющей регистрационный номер АТСС РТА-126912.

В некоторых воплощениях здесь предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество предложенного здесь антитела (например, моноспецифического или биспецифического), и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых воплощениях здесь предложен полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую предложенную здесь аминокислотную последовательность, вектор, содержащий полинуклеотид, или клетка-хозяин, содержащая вектор или рекомбинантный полинуклеотид. В некоторых воплощениях здесь предложен полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, любую одну из SEQ ID NO: 67-74.

В некоторых воплощениях здесь предложена клетка-хозяин, которая содержит одну, две или все три из: а) рекомбинантного полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, которая кодирует VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3; б) рекомбинантного полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, которая кодирует VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; и в) рекомбинантного полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, которая кодирует VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Возможно, что клетка-хозяин содержит одну, две или все три из: а) рекомбинантного полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 или 63; б) рекомбинантного полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность,

которая кодирует тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; и в) рекомбинантного полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62. Возможно, что клетка-хозяин рекомбинантно продуцирует предложенное здесь антитело. Возможно, что клетка-хозяин представляет собой бактериальную клеточную линию, линию клеток млекопитающих, дрожжевую клеточную линию или линию клеток насекомых. Возможно, что линия клеток млекопитающих представляет собой линию клеток CHO.

В некоторых воплощениях здесь предложен способ продукции антитела или биспецифического антитела, включающий культивирование предложенной здесь клетки-хозяина в условиях, которые в результате приводят к продукции антитела или предложенного здесь биспецифического антитела, и очистку полученного антитела или биспецифического антитела.

Также здесь предложено применение предложенного здесь антитела, биспецифического антитела, фармацевтической композиции, полинуклеотида, вектора или клетки-хозяина при изготовлении лекарственного средства.

Также здесь предложено применение предложенного здесь антитела, биспецифического антитела или фармацевтической композиции для применения в качестве лекарственного средства. Возможно, что антитело, биспецифическое антитело, фармацевтическая композиция или лекарственное средство предназначено для применения в лечении рака.

В некоторых воплощениях здесь предложен способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в таком лечении, где способ включает введение субъекту эффективного количества предложенного здесь антитела, биспецифического антитела или фармацевтической композиции. Возможно, что способ лечения заболевания включает модулирование или стимулирование иммунного ответа или функции. Возможно, что как приобретенный, так и врожденный иммунный ответ или функция модулирована или стимулирована. Возможно, что заболевание представляет собой инфекцию. Возможно, что заболевание представляет собой рак. Возможно, что способ дополнительно включает введение субъекту второго терапевтического агента. Возможно, что второй терапевтический агент представляет собой противоопухолевый агент. Возможно, что противоопухолевый агент представляет собой агонист TLR (Толл-подобные рецепторы), такой как агонист TLR3, агонист TLR7/8 или агонист TLR9,

ингибитор CDK (циклинзависимой киназы), такой как ингибитор CDK4/6 или CDK 2/4/6, или ингибитор PARP (поли(АДФ-рибоза)-полимеразы), такой как олапариб, рупапариб, нирапариб или талазопариб. Возможно, что агонист TLR9 представляет собой CpG24555, CpG10103, CpG7909 (PF-3512676), CpG1018. Возможно, что ингибитор CDK представляет собой PF-06873600 или палбоциклиб.

В некоторых воплощениях комбинация предложенного здесь биспецифического антитела против CD47/PD-L1 с агонистом TLR (например агонистом TLR9) обладает большей противоопухолевой активностью, чем противоопухолевая активность каждого из агентов индивидуально. В некоторых воплощениях комбинация обладает синергической противоопухолевой активностью.

В некоторых воплощениях комбинация предложенного здесь биспецифического антитела против CD47/PD-L1 с ингибитором CDK (например ингибитором CDK 2/4/6) обладает большей противоопухолевой активностью, чем противоопухолевая активность каждого из агентов индивидуально. В некоторых воплощениях комбинация обладает синергической противоопухолевой активностью.

В некоторых воплощениях здесь предложен способ усиления иммунного ответа у субъекта, где способ включает введение субъекту эффективного количества предложенного здесь антитела, биспецифического антитела или фармацевтической композиции.

В некоторых воплощениях здесь предложен способ ингибирования или уменьшения роста раковых клеток у субъекта, где способ включает введение субъекту эффективного количества предложенного здесь антитела, биспецифического антитела или фармацевтической композиции. В некоторых воплощениях предложенное здесь антитело, биспецифическое антитело или фармацевтическая композиция ингибирует или уменьшает рост раковых клеток по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 20% или по меньшей мере на 10% относительно роста раковых клеток в отсутствии антитела или биспецифического антитела.

В некоторых воплощениях предложенное здесь антитело или биспецифическое антитело связывается с эритроцитами и/или тромбоцитами яванского макака с

аффинностью, которая составляет по меньшей мере 99%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 20% или по меньшей мере 10% от аффинности в отношении человеческих эритроцитов и/или тромбоцитов, соответственно.

В некоторых воплощениях здесь предложено антитело, биспецифическое антитело или фармацевтическая композиция для применения в предложенных здесь способах лечения. В некоторых воплощениях здесь предложено антитело, биспецифическое антитело или фармацевтическая композиция для применения в лечении рака и/или усилении иммунного ответа у субъекта. В некоторых воплощениях здесь предложено применение предложенного здесь антитела, биспецифического антитела или фармацевтической композиции для изготовления лекарственного средства для применения в предложенных здесь способах лечения. В некоторых воплощениях лекарственное средство предназначено для применения в лечении рака и/или усилении иммунного ответа у субъекта.

В некоторых воплощениях, предложенных здесь, рак представляет собой рак желудка, саркому, лимфому, Ходжкинскую лимфому, лейкемию, рак головы и шеи, рак вилочковой железы, эпителиальный рак, рак слюнных желез, рак печени, рак желудка, тиреоидный рак, рак легкого (включающий, например, немелкоклеточный рак легкого), рак яичников, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак пищевода, рак поджелудочной железы, глиому, глиобластому, опухоль головного мозга, лейкемию, множественную миелому, почечно-клеточную карциному, рак почки, рак мочевого пузыря, уротелиальный рак, рак шейки матки, хориокарциному, рак толстой кишки, рак ротовой полости, рак кожи или меланому.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 демонстрирует данные экспериментального тестирования действия BsAb1 (закрашенные окружности), антитела против CD47 P01A11_75 (закрашенные ромбы), антитела против PD-L1 P06B05_245 (пустые квадраты) или контрольного антитела (пустые окружности) в отношении активности антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) макрофагов в отношении человеческих опухолевых клеток NCI-

H292. По оси Y изображен % опухолевых клеток, которые были подвергнуты фагоцитозу в концентрации соответствующего антитела, представленной по оси X.

Фиг. 2А, фиг. 2В и фиг. 2С демонстрируют данные экспериментального тестирования противоопухолевой эффективности BsAb3 и других родственных антител в мышинной опухолевой модели СТ26. В эксперименте, представленном на фиг. 2А, фиг. 2В и фиг. 2С, мышей, несущих опухоли СТ26, обрабатывали контрольным антителом (закрашенная окружность), моноспецифическим антителом против CD47 (пустой квадрат), моноспецифическим антителом против PD-L1 (закрашенный треугольник, точки, связанные сплошной линией), моноспецифическим антителом против CD47 в комбинации с моноспецифическим антителом против PD-L1 (инвертированный пустой треугольник), BsAb3 (закрашенный ромб, точки, связанные пунктирной линией), или Fc-null BsAb3 (пустые окружности). На фиг. 2А по оси X представлены сутки после лечения, а по оси Y представлен объем опухоли в мм³. На фиг. 2В по оси X представлены сутки после обработки, а по Y представлен процент массы тела. На фиг. 2С по оси X представлены сутки после обработки, а по оси Y представлен процент выживших.

Фиг. 3А и фиг. 3В демонстрируют данные экспериментального тестирования противоопухолевой эффективности различных доз BsAb3 в мышинной модели опухоли MC38. В эксперименте, представленном на фиг. 3А и фиг. 3В, мышей, несущих опухоли MC38, обрабатывали контрольным изотипом антитела (закрашенная окружность), 10 мг/кг BsAb3 (пустой квадрат), 20 мг/кг BsAb3 (закрашенный треугольник) или 40 мг/кг BsAb3 (пустые окружности). На фиг. 3А по оси X представлены сутки после инокуляции опухоли, а по оси Y представлен объем опухоли в мм³. На фиг. 3В по оси X представлены сутки после инокуляции опухоли, а по оси Y представлен процент массы тела.

Фиг. 4А и фиг. 4В демонстрируют данные экспериментального тестирования противоопухолевой эффективности BsAb3 в мышинной модели опухоли B16F10. В эксперименте, представленном на фиг. 4А и фиг. 4В, мышей, несущих опухоли B16F10, обрабатывали контрольным изотипом антитела (закрашенная окружность) или 20 мг/кг BsAb3 (закрашенный треугольник). На фиг. 4А по оси X представлены сутки после инокуляции опухоли, а по оси Y представлен объем опухоли в мм³. На фиг. 4В по оси X представлены сутки после инокуляции опухоли, а по оси Y представлен процент массы тела.

Фиг. 5А, фиг. 5В, фиг. 5С и фиг. 5D демонстрируют данные экспериментального тестирования противоопухолевой эффективности BsAb3 у мышей, несущих опухоли

MC38, когда BsAb3 вводят вместе с различными антителами, которые истощают или ингибируют различные классы иммунных клеток. В эксперименте, представленном на фиг. 5А, мышей обрабатывали контрольным изотипом антитела (закрашенная окружность), BsAb3 (пустые окружности), BsAb3 + mAb против CD8 (инвертированный закрашенный треугольник), BsAb3 + mAb против CD4 (закрашенный треугольник), или BsAb3 + mAb против CD4 + mAb против CD8 (пустой ромб). В эксперименте, представленном на фиг. 5В, мышей дикого типа C57BL/6 или мышей BATF3^{-/-} обрабатывали контрольным изотипом антитела или BsAb3. Фиг. 5В демонстрирует данные для мышей дикого типа, обработанных контрольным антителом (закрашенная окружность), мышей дикого типа, обработанных BsAb3 (пустые окружности), мышей BATF3^{-/-}, обработанных контрольным антителом (пустой квадрат), и мышей BATF3^{-/-}, обработанных BsAb3 (закрашенный треугольник). В эксперименте, представленном на фиг. 5С, мышей обрабатывали контрольным изотипом антитела (закрашенная окружность), BsAb3 (пустые окружности) или BsAb3 + mAb против CSF1R (инвертированный закрашенный треугольник). В эксперименте, представленном на фиг. 5D, мышей обрабатывали контрольным изотипом антитела (закрашенная окружность), BsAb3 (пустые окружности) или BsAb3 + mAb против NK1.1 (инвертированный закрашенный треугольник). На каждом из фиг. 5А, фиг. 5В, фиг. 5С и фиг. 5D по оси X представлены сутки после инокуляции опухоли, а по оси Y представлен объем опухоли в мм³.

Фиг. 6 демонстрирует данные экспериментального тестирования противоопухолевой эффективности BsAb1 и BsAb2 против человеческих клеток рака молочной железы MDA-MB-231 у иммунодефицитных мышей NSG. Мышей, несущих опухоли MDA-MB-231, обрабатывали контрольным изотипом антитела (закрашенная окружность), 1 мг/кг BsAb1 (закрашенный треугольник), 5 мг/кг BsAb1 (пустой ромб), 10 мг/кг BsAb1 (пустой треугольник), 1 мг/кг BsAb2 (пустые окружности), 5 мг/кг BsAb2 (закрашенный ромб) или 10 мг/кг BsAb2 (закрашенный квадрат). По оси X представлены сутки после обработки, а по оси Y представлен объем опухоли в мм³.

Фиг. 7 демонстрирует данные экспериментального тестирования противоопухолевой эффективности BsAb3 в комбинации с агонистом TLR9 в мышинной модели опухоли MC38. Мышей, несущих опухоли MC38, обрабатывали контрольным изотипом антитела (закрашенная окружность), BsAb3 (пустой квадрат), агонистом TLR9 (инвертированный закрашенный треугольник) или как BsAb3, так и агонистом TLR9

(пустой треугольник). По оси X представлены сутки после инокуляции опухоли, а по оси Y представлен объем опухоли в мм³.

Фиг. 8 демонстрирует данные экспериментального тестирования противоопухолевой эффективности BsAb3 в комбинации с ингибитором CDK2/4/6 в мышинной модели опухоли B16F10. Мышей, несущих опухоли B16F10, обрабатывали контрольным изотипом антитела (закрашенная окружность), BsAb3 (закрашенный треугольник), ингибитором CDK2/4/6 (пустой квадрат) или как BsAb3, так и ингибитором CDK2/4/6 (пустой ромб). По оси X представлены сутки после инокуляции опухоли, а по оси Y представлен объем опухоли в мм³.

Подробное описание изобретения

Здесь предложены антитела, которые специфически связываются с CD47, антитела, которые специфически связываются с PD-L1, и биспецифические антитела, которые специфически связываются с CD47 и PD-L1. Дополнительно здесь предложены биспецифические антитела, которые обладают общей легкой цепью. Также здесь предложены родственные нуклеиновые кислоты, композиции и способы получения и применения антител.

Общие методики

При практической реализации настоящего изобретения будут использованы, если не указано иное, традиционные методики молекулярной биологии (включающие рекомбинантные технологии), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методики полностью объясняются в литературе, такой как Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and

Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995), а также в последующих изданиях и соответствующих сайтах в интернете вышеприведенных ссылок в зависимости от релевантности.

Изобретение будет описано более подробно путем ссылки с использованием следующих определений и примеров. Все патенты и публикации, включая все последовательности, раскрытые в таких патентах и публикациях, на которые здесь ссылаются, включены здесь путем ссылки.

Определения

Если не определено иное, то предполагается, что все термины в области техники, условные сокращения и другие научные термины или используемая здесь терминология имеют значения, обычно понятные для специалистов в данной области техники, для которых предназначено изобретение. Например, здесь предполагается, что термин «и/или», используемый во фразе, такой как «А и/или В», включает как А, так и В; А или В; А (сам по себе); и В (сам по себе). Аналогично, предполагается, что термин «и/или», используемый во фразе, такой как «А, В и/или С» охватывает каждое из следующих воплощений: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (сам по себе); В (сам по себе); и С (сам по себе). В некоторых случаях термины, имеющие обычно понимаемые значения, определены здесь для ясности и/или для готовой ссылки, и включение таких определений здесь не обязательно следует рассматривать как представляющее существенное различие по сравнению с обычно понимаемым в области техники.

Использованные здесь формы единственного числа «a», «an» и «the» включают свои соответствующие множественные значения, если в контексте ясно не указано иное.

Использованные здесь числовые диапазоны включают значения, определяющие диапазон.

Ссылка на «приблизительную» величину или параметр здесь включает (и описывает) воплощения, которые относятся к этой самой величине или параметру, а также к величинам или параметрам, которые могут быть максимально на 10% ниже или выше обозначенной числовой величины для данного параметра. Например, как в случае

дозы «приблизительно 5 мг/кг» включается 5 мг/кг и также любая величина между 4,5 мг/кг и 5,5 мг/кг. Когда термин «приблизительно» используется в контексте временного периода (годы, месяцы, недели, сутки и т.п.), тогда термин «приблизительно» обозначает этот период времени плюс или минус одно количество из следующего подчиненного временного периода (например, приблизительно 1 год обозначает 11-13 месяцев; приблизительно 6 месяцев обозначает 6 месяцев плюс или минус 1 неделя; приблизительно 1 неделя обозначает 6-8 суток; и т.д.), или в пределах 10 процентов относительно указанной величины, в зависимости от того, что больше.

Использованный здесь термин нуклеиновые кислоты подразумевает изложение слева направо в направлении от 5' к 3' концу; аминокислотные последовательности изложены слева направо в ориентации от N к C-концу, соответственно. Практические пользователи, в частности могут обратиться к Sambrook et al., 1989, и Ausubel FM et al., 1993, в отношении определений и терминов в области техники. Понятно, что данное изобретение не ограничено конкретной описанной методологией, протоколами и реактивами, поскольку они могут варьировать.

Термины «полипептид», «олигопептид», «пептид» и «белок» используются здесь взаимозаменяемо в отношении цепей из аминокислот любой длины. Например, цепь может быть относительно короткой (например, 10-100 аминокислот) или длинной. Цепь может быть линейной или разветвленной, она может содержать модифицированные аминокислоты и/или может быть прервана не аминокислотами. Эти термины также охватывают аминокислотную цепь, которая модифицирована естественным образом или путем вмешательства; например, образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидизация, ацетилирование, фосфорилирование или любую другую манипуляцию или модификацию, такую как конъюгация с компонентом-меткой. Также в определение включены, например, полипептиды, содержащие один или более чем один аналог аминокислоты (включающая, например, не природную аминокислоту, и т.п.), а также другие модификации, известные в области техники. Понятно, что полипептиды могут существовать в виде единичных цепей или ассоциированных цепей.

«Антитело» представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную специфически связываться с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т.д., посредством по меньшей мере одного сайта распознавания антигена, расположенного в вариабельной области молекулы иммуноглобулина. При использовании здесь этот термин охватывает не только интактные поликлональные или

моноклональные антитела, но также, если не указано иное, любой их антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание, слитые белки, содержащие антигенсвязывающий фрагмент и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит сайт распознавания антигена. Антигенсвязывающие фрагменты включают, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, доменные антитела (dAb, например антитела акул и верблюжьих), фрагменты, включающие области, определяющие комплементарность (CDR), одноцепочечные вариабельные фрагменты антител (scFv), макситела, минитела, интратела, диатела, триатела, тетратела, v-NAR (вариабельная область нового рецептора антигена) и bis-scFv, и полипептиды, которые содержат по меньшей мере фрагмент иммуноглобулина, который достаточен для обеспечения специфического связывания антигена с полипептидом. Антитело включает антитело любого класса, такое как IgG, IgA или IgM (или его подкласса), и это антитело не обязательно должно принадлежать к какому-либо конкретному классу. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области тяжелых цепей антитела, иммуноглобулины могут быть отнесены к разным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть, кроме того, разделены на подклассы (изотипы), например IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные области тяжелой цепи, которые соответствуют разным классам иммуноглобулинов, называются альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации разных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

«Вариабельная область» антитела относится к вариабельной области легкой цепи антитела или к вариабельной области тяжелой цепи антитела, отдельно или в комбинации. Как известно в области техники, каждая вариабельная область тяжелой и легкой цепи состоит из четырех каркасных областей (FR), соединенных тремя областями, определяющими комплементарность (CDR), также известными как гипервариабельные области, и способствует образованию антигенсвязывающего сайта антител. Если необходимы варианты рассматриваемой вариабельной области, в частности, с заменой аминокислотных остатков за пределами области CDR (то есть в каркасной области), подходящая аминокислотная замена, предпочтительно, замена консервативной аминокислоты, может быть идентифицирована путем сравнения рассматриваемой вариабельной области с вариабельными областями других антител,

которые содержат последовательности CDR1 и CDR2 в том же каноническом классе, что и рассматриваемая вариабельная область (Chothia and Lesk, *J Mol Biol* 196(4): 901-917, 1987).

В некоторых воплощениях окончательное картирование CDR и идентификацию остатков, содержащих сайт связывания антитела, осуществляют путем определения структуры антитела и/или определения структуры комплекса антитело-лиганд. В некоторых воплощениях это может быть осуществлено при помощи любого из множества способов, известных специалистам в области техники, такого как рентгенокристаллография. В некоторых воплощениях можно использовать различные способы анализа для идентификации или аппроксимации областей CDR. Примеры таких способов включают без ограничения определение в соответствии с Кабатом, определение в соответствии с Чотиа, определение AbM, контактное определение и конформационное определение. Определение в соответствии с Кабат является стандартом для нумерации остатков в антителе и обычно используется для идентификации областей CDR. См. например, Johnson & Wu, 2000, *Nucleic Acids Res.*, 28: 214-8. Определение в соответствии с Чотиа сходно с определением в соответствии с Кабатом, но определение в соответствии с Чотиа учитывает положения некоторых структурных петлевых областей. См. например, Chothia et al., 1986, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-17; Chothia et al., 1989, *Nature*, 342: 877-83. В определении AbM используют комплексный набор компьютерных программ, созданных Oxford Molecular Group, которые модулируют структуру антител. См. например, Martin et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 86:9268-9272; "AbM™, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies," Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd. Определение AbM моделирует третичную структуру антитела исходя из первичной последовательности с использованием комбинации баз данных и на основании неэмпирических способов, таких как описаны в Samudrala et al., 1999, "Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach," in *PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl.*, 3:194-198. Контактное определение основано на анализе доступных сложных кристаллических структур. См. например, MacCallum et al., 1996, *J. Mol. Biol.*, 5:732-45. В еще одном подходе, называемом здесь как «конформационное определение» CDR, положения CDR могут быть идентифицированы как остатки, которые вносят энтальпические вклады в связывание антигена. См. например, Makabe et al., 2008, *Journal of Biological Chemistry*, 283:1156-1166. Другие определения границ CDR могут не

соответствовать строго одному из вышеуказанных подходов, но тем не менее перекрываются по меньшей мере с частью CDR в соответствии с Кабатом, хотя они могут быть укороченными или удлинёнными в свете прогнозирования или экспериментальных данных, что конкретные остатки или группы остатков не оказывают существенного влияния на связывание антигена. Используемая здесь CDR может относиться к CDR, определенному посредством любого подхода, известного в области техники, включая комбинацию подходов. Используемые здесь способы могут использовать CDR, определенные в соответствии с любым из этих подходов. Для любого заданного воплощения, содержащего более одной CDR, эти CDR могут быть определены в соответствии с любым из определений в соответствии с Кабатом, определение в соответствии с Чотиа, расширенного, AbM, контактного и/или конформационного определений.

Использованный здесь термин «цепь Fc» относится к С-концевой области тяжелой цепи антитела и содержит от двух до трех константных доменов в зависимости от изотипа. Используемая здесь цепь Fc может содержать нативную последовательность или вариант последовательности Fc. Если здесь специально не указано иное, то нумерация аминокислотных остатков в цепи Fc или константной области осуществлена в соответствии с системой нумерации EU (Евросоюза), также называемой как EU индекс, как описано в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Использованный здесь термин «домен Fc» относится к области антитела, которая содержит две цепи Fc. Например, в стандартном формате IgG антитело имеет две тяжелые цепи, обе из которых имеют цепь Fc. В общем две цепи Fc названы здесь как «домен Fc».

«Цепь Fc дикого типа» содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности цепи Fc, обнаруженной в природе. Под Fc «дикого типа» человеческого IgG понимают последовательность аминокислот, которые в природе существуют в человеческой популяции. Безусловно, поскольку последовательность Fc может слегка варьировать между индивидами, то одно или более чем одно изменение может быть произведено в отношении последовательности дикого типа и все еще остается в объеме изобретения.

«Вариант цепи Fc» содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности цепи дикого типа Fc путем по меньшей мере одной аминокислотной модификации, но сохраняет по меньшей мере одну эффекторную функцию цепи Fc дикого типа. В некоторых воплощениях вариант цепи Fc имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с цепью Fc дикого типа, например, от приблизительно одной до приблизительно десяти аминокислотных замен, и предпочтительно, от приблизительно одной до приблизительно пяти аминокислотных замен в цепи Fc дикого типа. Вариант цепи Fc здесь предпочтительно обладает по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности с цепью Fc дикого типа, и, наиболее предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности с ней, более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности с ней. В некоторых воплощениях цепь Fc содержит часть или всю из шарнирной области дикого типа (как правило по ее N-концу). В некоторых воплощениях полипептид Fc не содержит функциональную область или шарнирную область дикого типа.

Использованный здесь термин «шарнирная область» включает значение, известное в области техники, которое проиллюстрировано, например, Janeway et al., *ImmunoBiology: the immune system in health and disease*, Elsevier Science Ltd., NY (4th ed., 1999); Bloom et al., *Protein Science*, 6:407-415, 1997; и Humphreys et al., *J. Immunol. Methods*, 209:193-202, 1997.

Использованные здесь термины «связанный», «слитый» и «слияние» используются взаимозаменяемо в отношении связывания вместе двух или более чем двух элементов или компонентов, независимо от того, включена химическая конъюгация или рекомбинантные средства.

Использованный здесь термин «ковалентно связанный» означает, что указанные остатки или непосредственно ковалентно связаны один с другим, или опосредованно ковалентно связаны друг с другом через промежуточную группировку или группировки, такую как связывающий пептид или группировка.

Использованные здесь термины «генетически слитый» и «генетическое слияние» относятся к ко-линейной ковалентной связи или присоединению двух или более чем двух белков, полипептидов или их фрагментов через остов индивидуальных пептидов, путем

генетической экспрессии единичной полинуклеотидной молекулы, кодирующей эти белки, полипептиды или фрагменты. Такое генетическое слияние приводит в результате к экспрессии единичной непрерывной генетической последовательности.

Использованный здесь термин «модификация» относится к аминокислотной замене, вставке и/или делеции в полипептидной последовательности, изменению в группировке, химически связанной с белком, или модификации функции белка, например, антитела. Например, модификация может представлять собой изменение функции антитела или изменение структуры углевода, присоединенного к белку. Используемая здесь «аминокислотная модификация» относится к мутации (замене), вставке (добавлению) или делеции одного или более чем одного аминокислотного остатка в антителе. Термин «аминокислотная мутация» обозначает замену по меньшей мере одного существующего аминокислотного остатка на другой отличающийся аминокислотный остаток (например, путем замены аминокислотного остатка). Термин «аминокислотная делеция» обозначает удаление по меньшей мере одного аминокислотного остатка в predetermined положении в аминокислотной последовательности. Например, мутация L234A обозначает то, что аминокислотный остаток лизина в положении 234 в области Fc антитела замещен на аминокислотный остаток аланина (замена лизина на аланин) (нумерация в соответствии с системой нумерации индекса EU).

Термин «агент» используется здесь для обозначения биологической макромолекулы, экстракта, изготовленного из биологических материалов, смеси биологических макромолекул, химического соединения, смеси химических соединений и/или смеси химических соединений и биологических макромолекул. Термин «терапевтический агент» относится к агенту, обладающему биологической активностью.

«Гуманизированное» антитело относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки из не человеческих гипервариабельных областей и аминокислотных остатков из человеческих каркасных областей. Предпочтительно, гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из области, определяющей комплементарность (CDR), реципиента заменены на остатки из CDR видов, отличных от человека (донорное антитело), таких как мышь, крыса или кролик, обладающих желаемой специфичностью, аффинностью и эффективностью. Гуманизированное антитело может содержать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в импортированных

CDR или каркасных последовательностях, но включены для дополнительного улучшения и оптимизации эффективности антитела.

«Человеческое антитело» представляет собой антитело, которое обладает аминокислотной последовательностью, соответствующей аминокислотной последовательности антитела, продуцируемого человеком, и/или полученного с использованием любого из раскрытых здесь способов получения человеческих антител. Это определение человеческого антитела в связи с этим исключает гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки, отличающиеся от человеческих.

Термин «химерное антитело» предназначено для обозначения антител, в которых последовательности вариабельной области получены из одних видов, а последовательности константной области получены из других видов, таких как антитело, в котором последовательности вариабельной области получены из мышиного антитела, а последовательности константной области получены из человеческого антитела.

«Моноспецифическое антитело» относится к антителу, которое содержит один или более чем один сайт связывания антигена на молекулу, таким образом, что любой и все сайты связывания антитела специфически распознают идентичный эпитоп на антигене. Таким образом, в случаях, когда моноспецифическое антитело обладает более чем одним сайтом связывания антигена, тогда сайты связывания конкурируют друг с другом за связывание с одной молекулой антигена.

Как используется здесь, «биспецифическое антитело» представляет собой молекулу, которая обладает специфичностью связывания в отношении по меньшей мере двух отличающихся эпитопов. В некоторых воплощениях биспецифические антитела могут одновременно связываться с двумя отличающимися антигенами. В других воплощениях два отличающихся эпитопа могут располагаться на одном и том же антигене.

Использованные здесь «антиген-мишень», «антиген клетки-мишени», «опухолевый антиген» или «опухолеспецифический антиген» относятся к антигенной детерминанте, представленной на поверхности клетки-мишени, например клетки в опухоли, такой как раковая клетка или клетка опухолевой стромы.

Использованное здесь «выделенное антитело» обозначает антитело, которое идентифицировано и выделено и/или отделено от по меньшей мере одного компонента его природного окружения. Например, антитело, которое выделено или отделено от по меньшей мере одного компонента организма или ткани, или клетки, в которой антитело

существует в природе или продуцируется в природе, представляет собой «выделенное антитело» для задач в соответствии с настоящим изобретением. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые подвергали по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. В соответствии с некоторыми воплощениями выделенное антитело может по существу не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества.

Использованный здесь термин «линкер» относится к аминокислотной последовательности длиной две или более чем две аминокислоты. Линкер может состоять из нейтральных полярных или не полярных аминокислот. Линкер может иметь длину, например, от 2 до 100 аминокислот, такую как длина от 2 до 50 аминокислот, например, длину 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот. Линкер может быть «расщепляемым», например, путем самоотщепления или ферментативного или химического отщепления. Сайты отщепления в аминокислотных последовательностях и ферменты и химические вещества, которые осуществляют отщепление по этим сайтам, хорошо известны в области техники и также описаны здесь.

Использованный здесь термин «дисульфидная связь» или «цистеин-цистеиновая дисульфидная связь» относится к ковалентному взаимодействию между двумя цистеинами, в которых атомы серы цистеинов окислены с образованием дисульфидной связи. Средняя энергия связи дисульфидной связи составляет приблизительно 60 ккал/моль по сравнению с 1-2 ккал/моль для водородной связи. В контексте этого изобретения цистеины, которые образуют дисульфидную связь, расположены в каркасных областях одноцепочечного антитела и служат для стабилизации конформации антитела. Остатки цистеина могут быть введены, например, путем сайт-направленного мутагенеза, таким образом, что стабилизация дисульфидных связей может быть осуществлена в молекуле.

Термин «конкурировать» при использовании здесь в отношении антитела означает, что первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (или область) связывается с эпитопом при помощи способа, достаточно похожего на связывание второго антитела или его антигенсвязывающей области, таким образом, что результат связывания первого антитела с его соответствующим эпитопом заметно уменьшается в присутствии второго антитела по сравнению со связыванием первого антитела в отсутствие второго антитела. Альтернативно, связывание второго антитела с его

эпитопом также заметно снижается в присутствии первого антитела, но это необязательно. То есть первое антитело может ингибировать связывание второго антитела с его эпитопом без ингибирования связывания первого антитела с его соответствующим эпитопом вторым антителом. Тем не менее, когда каждое антитело заметно ингибирует связывание другого антитела с его соответствующим эпитопом или лигандом, в той же, большей или меньшей степени, говорят, что антитела «перекрестно конкурируют» друг с другом за связывание с их соответствующим(и) эпитопом(ами). И конкурирующие и перекрестно-конкурирующие антитела включены в настоящее изобретение. Независимо от механизма, посредством которого осуществляется такая конкуренция или перекрестная конкуренция (например, стерическое затруднение, конформационное изменение или связывание с общим эпитопом или его частью), специалисту в данной области техники может быть понятно на основании изложенных здесь принципов, что такие конкурирующие и/или перекрестно-конкурирующие антитела охватываются изобретением и могут быть полезны для раскрытых здесь способов.

Использованные здесь «антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «ADCC» относятся к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, естественные клетки-киллеры (НК-клетки), нейтрофилы и макрофаги) узнают связанное антитело на клетке-мишени и затем вызывают лизис этой клетки-мишени. Оценка активности ADCC представляющей интерес молекулы может быть осуществлена с использованием анализа ADCC *in vitro*, такой как анализ, описанный в патенте США № 5500362 или № 5821337. Применимые эффекторные клетки для таких анализов включают в себя мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и НК-клетки. Альтернативно или дополнительно, активность ADCC представляющей интерес молекулы может быть оценена *in vivo*, например, в животной модели, такой как модель, описанная в Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656, 1998.

Используемые здесь «комплемент-зависимая цитотоксичность» или «CDC» относятся к лизированию мишени в присутствии комплемента. Этот путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антителом), находящейся в комплексе с соответствующим антигеном. Для оценки активации комплемента может быть выполнен анализ CDC, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163, 1996.

Использованные здесь термины «иммуноспецифически связывается», «иммуноспецифически распознает», «специфически связывается», «специфически распознает» и аналогичные термины относятся молекулам, например, связывающим доменам, которые специфически связываются с антигеном (например, эпитопом или иммунным комплексом) и не связываются специфически с другой молекулой. Молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами с меньшей аффинностью, определяемой при помощи анализов, известных в области техники, например, иммуноанализов BIACORE™ или других анализов. Предпочтительно, молекулы, которые специфически связываются с антигеном, не осуществляют перекрестную реакцию с другими белками.

Термин «эпитоп» относится к фрагменту молекулы, способному распознаваться путем создания контакта и/или связывания с антителом по одной или более чем одной антигенсвязывающей области антитела, известной как паратоп. Единичный антиген может иметь более чем один эпитоп. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут обладать различными биологическими действиями. Эпитопы часто состоят из химически активной поверхностной группировки молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи, и обладают специфическими трехмерными структурными характеристиками, а также специфическими характеристиками заряда. Использованные здесь эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп формируется пространственно соседними аминокислотами различных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, формируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В некоторых воплощениях эпитоп может включать группировки сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

Использованный здесь термин «антигенный эпитоп» определен как фрагмент полипептида, с которым антитело может специфически связываться, как определено при помощи любого из способов, хорошо известных в данной области техники, например, при помощи обычных иммуноанализов. «Нелинейный эпитоп» или «конформационный эпитоп» содержит несмежные полипептиды (или аминокислоты) в антигенном белке, с которым связывается антитело, специфическое в отношении эпитопа. После того, как определен желаемый эпитоп на антигене, можно создавать антитела к этому эпитопу, например, с использованием описанных здесь способов.

Термины «специфическое связывание» или «специфически связывающий» при использовании в отношении взаимодействия антитела и белка или пептида, относится к взаимодействию, которое зависит от присутствия конкретной структуры (т.е. антигенной детерминанты или эпитопа) на белке; другими словами, антитело распознается и связывается с конкретной белковой структурой, нежели чем с белками в общем. Например, если антитело является специфическим в отношении эпитопа «А», то присутствие белка, содержащего эпитоп А (или свободный не меченный А), в реакционной смеси, содержащей меченный «А» и антитело, будет уменьшать количество меченного А, связанного с антителом.

В некоторых воплощениях «специфически связывается» означает, например, что антитело связывается с белком с K_D приблизительно 0,1 нМ или менее, но, более обычно, менее чем приблизительно 1 мкМ. В некоторых воплощениях «специфически связывается» означает, что антитело связывается с мишенью в одни моменты времени с K_D по меньшей мере приблизительно 0,1 мкМ или менее, в другие моменты времени по меньшей мере приблизительно 0,01 мкМ или менее, а в другие моменты времени по меньшей мере приблизительно 1 нМ или менее. Из-за идентичности последовательности между гомологичными белками у различных видов специфическое связывание может включать антитело, которое распознает белок в более чем одном виде (например, человеческий CD47 и мышиный CD47). Аналогично, из-за гомологии в некоторых областях полипептидных последовательностей различных белков специфическое связывание может включать антитело, которое распознает более чем один белок. Понятно, что в некоторых воплощениях антитело или связывающая группировка, которая специфически связывается с первой мишенью, может специфически связываться или не связываться специфически со второй мишенью. Для самого по себе «специфического связывания» не обязательно требуется (хотя может включать) исключительное связывание, т.е. связывание с одной мишенью. Таким образом, антитело в некоторых воплощениях может специфически связываться с более чем одной мишенью. В некоторых воплощениях множество мишеней могут быть связаны одним и тем же антигенсвязывающим сайтом на антителе. Например, антитело в некоторых случаях может содержать два идентичных антигенсвязывающих сайта, каждый из которых специфически связывается с тем же самым эпитопом на двух или более чем двух белках. В некоторых альтернативных воплощениях антитело может быть мультиспецифическим и содержать по меньшей мере две антигенсвязывающих сайта,

обладающих отличающимися специфичностями. В качестве не ограничивающего объем изобретения примера биспецифическое антитело может содержать один антигенсвязывающий сайт, который распознает эпитоп на одном белке и дополнительно содержит второй отличающийся антигенсвязывающий сайт, который распознает отличающийся эпитоп на втором белке. Как правило, но не обязательно, ссылка на связывание означает специфическое связывание.

Антитело, которое специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами с меньшей аффинностью, что определяют при помощи анализов, известных в области техники, например, иммуноанализов, **BIACORE™** или других анализов. Предпочтительно, антитело, которое специфически связывается с антигеном, не осуществляет перекрестную реакцию с другими белками.

Термины «не специфическое связывание» или «фоновое связывание» при их использовании в отношении взаимодействия антитела и белка или пептида, относятся к взаимодействию, которое не зависит от присутствия конкретной структуры (т.е. антитело связывается с белками в общем, нежели чем с конкретной структурой, такой как эпитоп).

Использованный здесь термин « k_{on} » или « k_a » относится к константе скорости ассоциации антитела с антигеном.

Использованный здесь термин « k_{off} » или « k_d » относится к константе скорости диссоциации антитела из комплекса антитело/антиген.

Использованный здесь термин « K_D » относится к равновесной константе диссоциации взаимодействия антитело-антиген.

Определения констант скорости ассоциации и диссоциации k_{on} и k_{off} , соответственно, для определения K_D и других отношений, могут быть осуществлены, например, с использованием биосенсора, основанного на поверхностном плазмонном резонансе, для того, чтобы охарактеризовать взаимодействие анализируемого вещества/лиганда в условиях, когда анализируемое вещество является одновалентным в отношении связывания лиганда, который иммобилизован с низкой эффективностью на поверхности сенсора при помощи реактива для связывания. Анализ может быть осуществлен, например, с использованием методологии кинетического титрования, как описано в Karlsson et al., Anal. Biochem 349, 136-147, 2006, или с использованием многоциклового кинетического анализа. Сенсорный чип, реактив для связывания и буфер для анализа, использованные для данного анализа, выбраны для обеспечения

стабильного связывания лиганда на поверхности сенсора, минимизируя не специфическое связывание анализируемого вещества с поверхностями, и приводят к ответам вследствие связывания анализируемого вещества, которые подходят для кинетического анализа в соответствии с рекомендациями Myszka, J. Mol. Recognit 12, 279-284, 1999. Ответы вследствие связывания анализируемого вещества на взаимодействие анализируемого вещества/лиганда дважды регистрируют и подгоняют к 1:1 «ограниченной модели массопереноса» Лэнгмюра с k_a , k_d и R_{max} в качестве общих параметров, как описано в Myszka & Morton et al., *Biophys. Chem* 64, 127-137 (1997). Равновесную константу диссоциации K_D выводят из отношения кинетических констант скорости, $K_D = k_{off}/k_{on}$. Такие определения предпочтительно осуществляют при 25°C или 37°C. Как правило, константы скорости (k_{on}/k_a и k_{off}/k_d) и равновесные константы диссоциации измеряют с использованием полноразмерного антитела и мономерного (например, белка CD47 или белка PD-L1).

Использованный здесь термин «аффинность связывания» в общем относится к силе общей суммы не ковалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антителом) и ее связывающимся партнером (например, антигеном). Если не указано иное, то использованная здесь «аффинность связывания» относится к собственной связывающей аффинности, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающей пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y в общем может быть представлена константой диссоциации (K_D). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y в общем может быть представлена константой диссоциации (K_d). Например, K_d может составлять приблизительно 200 нМ, 150 нМ, 100 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 8 нМ, 6 нМ, 4 нМ, 2 нМ, 1 нМ или сильнее. Аффинность может быть измерена при помощи общих способов, известных в области техники, включающих способы, описанные здесь. Низкоаффинные антитела как правило медленно связываются с антигеном и обладают тенденцией к легкой диссоциации, тогда как высокоаффинные антитела как правило связываются с антигеном быстрее и обладают тенденцией к более длительного сохранения связывания. Множество способов измерения связывающей аффинности известны в области техники, любой из которых может быть использован для задач в соответствии с настоящим изобретением. В частности, предполагается, что термин «связывающая аффинность» относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антиген-антитело. K_D представляет собой отношение скорости

диссоциации, также называемой как «скорость диссоциации (k_{off})», к скорости ассоциации или «скорость ассоциации (k_{on})». Таким образом, K_D равен k_{off} / k_{on} и выражается в мольной концентрации (М). Таким образом, чем меньше K_D , тем сильнее аффинность связывания. Таким образом, K_D , равная 1 мкМ, свидетельствует о слабой аффинности связывания по сравнению с K_D , равной 1 нМ. Величины K_D для антител могут быть определены с использованием способов, хорошо известных в области техники. Один из способов определения K_D антитела заключается в использовании поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как правило с использованием биосенсорной системы, такой как система BIACORE. Кинетический анализ BIACORE включает анализ связывания и диссоциации антигена из чипов с иммобилизированными молекулами (например, молекулами, содержащими домены, связывающие эпитоп) на своей поверхности. Еще один способ определения K_D антитела заключается в использовании биослойной интерферометрии, как правило с использованием технологии OCTET® (система Octet QK^e, ForteBio).

Если не указано иное, то «биологически активный», «биологическая активность» и «биологические характеристики» в отношении биспецифического антитела в соответствии с настоящим изобретением, такого как антитело, фрагмент или его производное, означает способность связываться с биологической молекулой.

Использованные здесь термины «полинуклеотиды», «нуклеиновые кислоты» и «нуклеотидные последовательности» включают молекулы ДНК (например, кДНК или геномную ДНК), молекулы РНК (например, мРНК), комбинации молекул ДНК и РНК или гибридных молекул ДНК/РНК, и аналоги молекул ДНК или РНК. Такие аналоги могут быть получены с использованием, например, нуклеотидных аналогов, которые включают без ограничения инозин или тритилированные основания. Такие аналоги могут также содержать молекулы ДНК или РНК, содержащие модифицированные остовы, которые придают благоприятные свойства молекулам, такие как, например, устойчивость к нуклеазам или увеличенная способность проникать через клеточные мембраны. Нуклеиновые кислоты или нуклеотидные последовательности могут быть одноцепочечными, двухцепочечными, могут содержать как одноцепочечные, так и двухцепочечные фрагменты, и могут содержать трехцепочечные фрагменты, но предпочтительно представляют собой двухцепочечную ДНК.

Использованный здесь термин «выделенное» относится к веществу, которое извлекают из его исходного окружения (например, природного окружения, если оно

встречается в природе). Например, природный полинуклеотид или полипептид, представленный в живом животном, не является выделенным, но тот же самый полинуклеотид или полипептид, который отделен от некоторых или всех сопутствующих веществ в природной системе, является выделенным. Такой полинуклеотид может представлять собой часть вектора и/или такой полинуклеотид или полипептид может представлять собой часть композиции, например, смеси, раствора или суспензии, или включает выделенную клетку или культивируемую клетку, которая содержит полинуклеотид или полипептид, и является выделенным, поскольку вектор или композиция не является частью своего природного окружения. Любая предложенная здесь молекула может быть выделенной.

Использованный здесь термин «функционально связанный» относится к ситуации, когда описанные компоненты находятся во взаимосвязи, обеспечивающей их функцию надлежащим образом. Например, контрольная последовательность, «функционально связанная» с кодирующей последовательностью, лигирована таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, подходящих или совместимых с контрольной последовательностью. Как правило, «функционально связанный» означает, что эти связываемые последовательности ДНК являются смежными и, в случае секреторной лидерной последовательности, смежными и находящимися в фазе считывания. Тем не менее, энхансеры не должны быть обязательно смежными. Связывание осуществляют путем лигирования в удобных сайтах рестрикции. Если таких сайты не существует, то используют синтетические олигонуклеотидные адапторы или линкеры в соответствии с общепринятой практикой.

Использованный здесь «вектор» означает конструкцию, которая способна доставлять, и, предпочтительно, экспрессировать один или более чем один ген(ы) или интересующую(ие) последовательность(и) в клетке-хозяине. Примеры векторов включают без ограничения вирусные векторы, векторы, экспрессирующие депротенинизированную ДНК или РНК, плазмиду, космиду или фаговые векторы, векторы, экспрессирующие ДНК или РНК, ассоциирующиеся с катионными конденсирующими агентами, векторы DNA или РНК, инкапсулированные в липосомах, и некоторых эукариотических клетках, таких как клетки-продуценты.

Использованный здесь термин «последовательность, контролирующая экспрессию», или «контрольная последовательность» относится к полинуклеотидной последовательности, которая необходима для осуществления экспрессии кодирующей

последовательности, с которой она лигирована. Природа таких контрольных последовательностей отличается в зависимости от организма хозяина. Например, у прокариот такие контрольные последовательности как правило включают промотор, сайт связывания с рибосомами и терминаторы и, в некоторых случаях, энхансеры. Таким образом, предполагается, что термин «контрольная последовательность» включает минимум все компоненты, присутствие которых необходимо для экспрессии, и также может включать дополнительные компоненты, присутствие которых является благоприятным, например, лидерные последовательности.

«Клетка-хозяин» включает индивидуальную клетку или культуру клеток, которая может представлять собой или представляет собой реципиент вектора(ов), включающих полинуклеотидные вставки. Клетки-хозяева включают потомство единичной клетки-хозяина, и потомство может не обязательно быть полностью идентичным (по морфологии или в комплементе геномной ДНК) исходной родительской клетке вследствие природной, случайной или преднамеренной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные *in vivo* полинуклеотидом(ами) в соответствии с данным изобретением.

Использованные здесь «клетки млекопитающих» включают ссылку на клетки, полученные у млекопитающих, включая людей, крыс, мышей, хомяков, морских свинок, шимпанзе или макака. Эти клетки могут быть культивированы *in vivo* или *in vitro*.

Использованный здесь термин «очищенный продукт» относится к получению продукта, который был отделен от клеточных составляющих, с которыми продукт обычно ассоциируется, и/или от других типов клеток, которые могут быть представлены в интересующем образце.

Использованный здесь «по существу чистый» относится к веществу, которое по меньшей мере на 50% является чистым (т.е. без примесей), более предпочтительно, по меньшей мере на 90% является чистым, более предпочтительно, по меньшей мере на 95% является чистым, еще более предпочтительно, по меньшей мере на 98% является чистым, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере на 99% является чистым.

Использованный здесь термин «рак» или «раковый» относится к или описывает физиологическое состояние у млекопитающих, которое типично характеризуется не регулируемым клеточным ростом, новообразованием или опухолью, возникающей в результате аномального не контролируемого роста клеток. В некоторых аспектах рак относится к злокачественной первичной опухоли без метастазов, которая остается

локализованной. В других аспектах рак относится к злокачественной опухоли, которая внедряется и разрушает соседние структуры организма и распространяется в удаленные сайты. В некоторых аспектах рак ассоциируется со специфическим раковым антигеном.

Использованный здесь термин «злокачественная клетка» или «злокачественность» относится к опухолям или опухолевым клеткам, которые являются инвазивными и/или способны претерпевать метастазирование, т.е. к раковой клетке.

Использованный здесь термин «лечить», «лечение» или «процесс лечения» представляет собой подход для достижения благоприятных или желаемых клинических результатов. Для задачи в соответствии с настоящим изобретением лечение определено как введение молекулы антител против CD47, против PD-L1 или против CD47/PD-L1 (например, моноклональное антитело против CD47, моноклональное антитело против PD-L1 или биспецифические антитело CD47/PD-L1) субъекту, например, пациенту. Такое введение может осуществляться, например, путем прямого введения субъекту или путем применения в отношении выделенной ткани или клетки субъекта, которая возвращается субъекту. Молекула антитела против CD47, против PD-L1 или против CD47/PD-L1 может быть введена сама по себе или в комбинации с одним или более чем одним агентом. Лечение может быть целительным, заживляющим, облегчающим, ослабляющим, изменяемым, корректирующим, купирующим, паллиативным, улучшающим или влияющим на расстройство, симптомы расстройства или предрасположенность в отношении расстройства, например, рака.

Предполагается, что использованный здесь термин «субъект» включает любое животное (например, млекопитающее), включающее без ограничения людей, отличающихся от людей приматов, грызунов и т.п., которое является реципиентом конкретного лечения. Например, субъект может представлять собой пациента (например, пациента-человека или ветеринарного пациента), страдающего от рака. Как правило, термины «субъект», «индивид» и «пациент» используются здесь взаимозаменяемо в отношении субъекта-человека.

Если не указано иное, то термин «животные, отличающиеся от человека», в соответствии с изобретением включает всех позвоночных, отличающихся от человека, например, млекопитающих, отличающихся от человека, и животных, отличающихся от млекопитающих, таких как приматы, отличающиеся от человека, овца, собака, корова, курица, амфибия, рептилия, мышь, крыса, кролик или коза.

Использованный здесь термин «фармацевтически приемлемый» относится к продукту или соединению, одобренному (или одобряемому) регулирующим органом Федерального правительства или правительства государства, или перечисленному в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения в отношении животных, включающих людей.

Использованные здесь термины «фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или адъювант» или «приемлемый фармацевтический носитель» относятся к эксципиенту, носителю или адъюванту, который может быть введен субъекту, вместе с по меньшей мере одним антителом в соответствии с описанием настоящего изобретения, и который не разрушает активность антитела. Эксципиент, носитель или адъювант должен быть не токсичным при введении с антителом в дозах, достаточных для доставки терапевтического эффекта.

Использованный здесь термин «облегчение» означает ослабление или улучшение одного или более чем одного симптома по сравнению с отсутствием введения молекулы антитела в соответствии с изобретением. «Облегчение» также включает укорочение или уменьшение длительности симптома.

Использованные здесь термины «предупредить», «предупреждение» и «профилактика» относятся к предупреждению рецидива или начала одного или более чем одного симптома расстройства у субъекта в результате введения профилактического или терапевтического агента.

Использованное здесь «эффективное количество», «терапевтически эффективное количество», «терапевтически достаточное количество» или «эффективная доза» относится к любому количеству терапевтического агента, которое после введения субъекту разовой дозы или множества доз является эффективным или достаточным для предупреждения, заживления, облегчения, лечения или вылечивания заболевания, расстройства или побочного эффекта, или уменьшения скорости прогресса заболевания или расстройства, или увеличении длительности исцеления, облегчения, ослабления или улучшения состояния у субъекта, страдающего от расстройства, как описано здесь, по сравнению с ожидаемым в отсутствие такого лечения. Термин также включает в своем объеме количества, эффективные для усиления нормальной физиологической функции. Эффективное количество может быть рассмотрено в контексте введения одного или более чем одного терапевтического агента, и единичный агент может быть рассматриваться как вводимый в эффективном количестве, если, в сочетании с одним

или более чем одним другим агентом может достигаться или достигается желаемый результат.

Использованное здесь «ингибирование роста» опухоли или рака относится к замедлению, прерыванию, прекращению или остановке их роста и/или метастазов и не обязательно указывает на полное устранение опухолевого роста.

Эффективность представляет собой меру активности терапевтического агента, выраженную в количестве, которое требуется для достижения эффекта данной интенсивности. Высокоэффективный агент вызывает больший ответ при меньших концентрациях по сравнению с агентом с меньшей эффективностью, который вызывает меньший ответ при низких концентрациях. Эффективность представляет собой функцию аффинности и эффективности. Эффективность относится к способности терапевтического агента вызывать биологический ответ после связывания с лигандом-мишенью и количественной величине этого ответа. Использованный здесь термин «полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50})» относится к концентрации терапевтического агента, которая вызывает ответ, находящийся на середине между базовым уровнем и максимальным после указанного времени воздействия. Терапевтический агент может вызывать ингибирование или стимулирование. Обычно используют величину EC_{50} , и здесь ее используют в качестве меры эффективности.

Использованная здесь «комбинированная терапия» или введение «в комбинации с» относятся к применению более чем одного профилактического и/или терапевтического агента. Применение термина «комбинированная терапия» или «в комбинации» не ограничивает последовательность, в которой профилактический и/или терапевтический агент вводят субъекту, страдающему от расстройства. Другими словами, комбинированная терапия может быть осуществлена путем отдельного, последовательного или одновременного лечения терапевтическими агентами. В случае «последовательного введения» первый вводимый агент может вызывать некоторый физиологический эффект у субъекта, когда второй агент вводят или он становится активным у субъекта.

Термин «одновременное введение», использованный здесь в отношении введения профилактического и/или терапевтического агента, относится к введению агентов, такому, что индивидуальные агенты представлены у субъекта одновременно. На одновременное введение могут оказывать влияние молекулы, приготовленные в одной композиции или в отдельных композициях, вводимых в одно и то же время или близкие

моменты времени. Последовательное введение может быть осуществлено в любой требуемой последовательности.

Использованный здесь «CD47» относится к белку кластера дифференцировки 47 (CD47) у млекопитающих, предпочтительно человеческому белку CD47. Аминокислотная последовательность и связанная информация для человеческого CD47 приведена, например, в UniProtKB под номером A0A0A1TSG4, которая во всех случаях включена путем ссылки.

Как правило, встречающийся в природе аллельный вариант CD47 обладает аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 95%, 97% или 99% идентичной белку, описанному в UniProtKB под номером A0A0A1TSG4. Белок CD47 охарактеризован как трансмембранный белок, который относится к суперсемейству иммуноглобулинов, и который взаимодействует с различными лигандами, такими как сигнал-регуляторный белок альфа (SIRP α), тромбоспондин-1 (TSP-1) и мембранные интегрины. CD47 сверхэкспрессируется различными типами раковых клеток. Лиганд CD47 SIRP α экспрессируется на различных клетках системы врожденного иммунитета, таких как макрофаги и дендритные клетки (DC). Связывание CD47 с SIRP α подавляет активность иммунных клеток, которые экспрессируют SIRP α , и, таким образом, обеспечивает опухолевым клеткам возможность избежать надзора системы врожденного иммунитета.

Использованное здесь «антитело, которое связывается с CD47», «антитело, которое распознает CD47», «антитело против CD47», «антитело против молекулы CD47», «антитело, которое специфически связывается с CD47», «антитело против CD47» и т.п. включает молекулу, которая содержит по меньшей мере один связывающий домен, который специфически связывается с CD47. Молекулы антитела против CD47 в соответствии с настоящим изобретением включают антитела, которые взаимодействуют с или распознают, например, связываются (например, специфически связываются) с CD47, например, человеческим CD47, мышинным CD47, крысиным CD47, CD47 яванского макака.

Использованный здесь «PD-L1» относится к белку лиганду 1 программируемой гибели клеток (PD-L1) млекопитающего, предпочтительно человеческому белку PD-L1. PD-L1 также известен как CD274 или B7-H1. Аминокислотная последовательность и связанная информация для человеческого PD-L1 представлена, например, в UniProtKB под номером Q9NZQ7, которая для всех задач включена здесь путем ссылки.

Как правило, встречающийся в природе аллельный вариант PD-L1 обладает аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95%, 97% или 99% идентична белку, описанному в UniProtKB под номером Q9NZQ7. Белок PD-L1 охарактеризован как трансмембранный белок, который вовлечен в подавление приобретенного плеча иммунной системы, например, путем связывания с PD-1. PD-L1 сверхэкспрессируется различными типами раковых клеток. PD-L1 представляет собой лиганд рецептора PD-1, который экспрессируется клетками системы приобретенного иммунитета, такими как Т-клетки. Связывание PD-L1 с PD-1 подавляет активность иммунных клеток, которые экспрессируют PD-1, и, таким образом, дает возможность опухолевым клеткам уходить из-под контроля иммунных клеток, экспрессирующих PD-1 (например эффекторных Т-клеток).

Использованное здесь «антитело, которое связывается с PD-L1», «антитело, которое распознает PD-L1», «антитело против PD-L1», «молекула антитела против PD-L1», «антитело, которое специфически связывается с PD-L1», «антитело против PD-L1» и т.п. включает молекулу, которая содержит по меньшей мере один связывающий домен, который специфически связывается с PD-L1. Молекулы антитела против PD-L1 в соответствии с настоящим изобретением включают антитела, которые взаимодействуют с или распознают, например, связываются (например, специфически связываются) с PD-L1, например, человеческим PD-L1, мышинным PD-L1, крысиным PD-L1, PD-L1 яванского макака.

Использованный здесь термин «биспецифические антитело против CD47/PD-L1» относится к молекуле, разработанной для специфического связывания с CD47 и PD-L1.

Использованный здесь «первый полипептид» представляет собой любой полипептид, который ассоциируется со вторым полипептидом. Первый полипептид и второй полипептид соприкасаются на поверхности контакта. Дополнительно к поверхности контакта первый полипептид может содержать один или более чем один дополнительный домен, такой как «связывающие домены» (например, переменный домен антитела, рецептор-связывающий домен, лиганд-связывающий домен или ферментативный домен) или константный домен антитела (или его фрагменты), включающий домены CH2, CH1 и CL. Обычно первый полипептид содержит по меньшей мере один домен, который получен из антитела. Этот домен для удобства представляет собой константный домен, такой как домен CH3 антитела и может образовывать поверхность контакта с первым полипептидом. Примеры первых полипептидов

включают полипептиды тяжелой цепи антитела, химеры, комбинирующие константный домен антитела с связывающим доменом гетерологического полипептида, полипептидами рецептора, полипептидами лиганда, и полипептиды вариабельного домена антитела (например, биспецифические антитела).

Дополнительно к поверхности контакта второй полипептид может содержать дополнительные домены, такие как «связывающий домен» (например, вариабельный домен антитела, связывающий домен рецептора, связывающий домен лиганда или ферментативный домен), или константный домен антитела (или его фрагменты), включающий домены CH2, CH1 и CL. Как правило, второй полипептид содержит по меньшей мере один домен, который получен из антитела. Этот домен для удобства представляет собой константную область, такую как домен CH3 антитела, и может образовывать поверхность контакта со вторым полипептидом. Примеры вторых полипептидов включают полипептиды тяжелой цепи антитела, химеры, комбинирующие константный домен антитела со связывающим доменом гетерологического полипептида, и полипептиды вариабельного домена антитела (например, биспецифических антител).

Использованный здесь термин «комплекс» или «комплексный» относится к ассоциации двух или более чем двух молекул, которые взаимодействуют друг с другом при помощи связей и/или сил (например, Ван-дер-Вальсовых, гидрофобных, гидрофильных сил), которые не представляют собой пептидные связи. В одном из воплощений комплекс является гетеромультимерным. Понятно, что использованный здесь термин «белковый комплекс» или «полипептидный комплекс» включает комплексы, которые имеют не белковую сущность, конъюгированную с белком в белковом комплексе (например, включая без ограничения химические молекулы, такие как токсин или детектирующий агент).

Хотя любые вещества и способы, похожие на или эквивалентные описанным здесь, могут быть использованы на практике или тестировании в соответствии с настоящим изобретением, здесь описаны предпочтительные вещества и способы.

Материалы и способы

Описаны различные способы для продуцирования антител, которые включают традиционный гибридомный способ получения моноклональных антител, рекомбинантные способы получения антител (включающих химерные антитела, например, гуманизированные антитела), получение антител у трансгенных животных и

ранее описанный способ фагового дисплея для получения «полностью человеческих» антител.

Здесь предложены способы получения любых предложенных здесь антител. Антитела в соответствии с данным изобретением могут быть получены при помощи способов, известных в области техники. Полипептиды могут быть получены при помощи протеолитической или другой деградации антител, при помощи рекомбинантных способов (т.е. единичных или слитых полипептидов), как описано выше или при помощи химического синтеза. Полипептиды антител, особенно более короткие полипептиды длиной до приблизительно 50 аминокислот, обычно получают при помощи химического синтеза. Способы химического синтеза известны в области техники и имеются в продаже. Например, антитело может быть получено при помощи автоматического полипептидного синтезатора, в котором используется твердофазный способ. Смотри также патенты США №№ 5807715; 4816567 и 6331415.

Любой подходящий способ получения биспецифических антител может быть использован для получения предложенных здесь биспецифических антител (например, в зависимости от выбора особенностей антитела и компонентов).

В соответствии с одним из подходов получения биспецифических антител переменные домены антитела с желаемыми специфичностями связывания сливают с последовательностями константной области иммуноглобулина. Слияние предпочтительно осуществляют с константной областью тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащей по меньшей мере часть шарнирной области, областей CH2 и CH3. В некоторых воплощениях первая константная область тяжелой цепи (CH1), содержащая сайт для связывания легкой цепи, может быть представлена в, по меньшей мере, одном из слияний. В некоторых воплощениях полинуклеотиды, кодирующие слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и, если желательно, легкую цепь иммуноглобулина, могут быть вставлены в отдельные экспрессионные векторы, и могут быть ко-трансфицированы в подходящий организм хозяина. В других воплощениях кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей могут быть вставлены в один экспрессионный вектор, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных отношениях приводит в результате к высоким выходам или когда отношения не обладают существенной значимостью.

В одном из подходов биспецифические антитела состоят из гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина с первой специфичностью связывания с одной стороны, и

гибридной парой тяжелой цепи-легкой цепи иммуноглобулина (обеспечивающей вторую специфичность связывания) с другой стороны. Ассиметричная структура в отношении легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы облегчает отделение желаемого биспецифического соединения от нежелательных комбинаций иммуноглобулиновых цепей. Этот подход описан в публикации заявки РСТ № WO 94/04690.

В еще одном подходе биспецифические антитела состоят из аминокислотной модификации в первой шарнирной области с одной стороны, и замещенная аминокислота в первой шарнирной области обладает противоположным зарядом с соответствующей аминокислотой во второй шарнирной области с другой стороны. Этот подход описан в Международной заявке на патент № PCT/US2011/036419 (WO2011/143545).

В еще одном подходе образование желаемого гетеромультимерного или гетеродимерного белка (например, биспецифического антитела) усиливается путем изменения или конструирования поверхности контакта между первой и второй цепью Fc. В этом подходе биспецифические антитела могут состоять из области CH3, где область CH3 содержит первый полипептид CH3 и второй полипептид CH3, которые взаимодействуют вместе с образованием поверхности контакта CH3, где одна или более чем одна аминокислота в поверхности контакта CH3 дестабилизирует образование гомодимера и не является электростатически неблагоприятной для образования гомодимера. Этот подход описан в Международной заявке на патент № PCT/US2011/036419 (WO2011/143545). В некоторых воплощениях одна цепь Fc биспецифического антитела может содержать аминокислотные модификации в положениях 223 и 228 (например, (C223E или C223R) и (P228E или P228R)) в шарнирной области и в положении 409 (например, K409R (схема нумерации EU (Евросоюза))) в области CH3 человеческого IgG2, а другая цепь Fc биспецифического антитела может содержать аминокислотные модификации в положениях 223, 225 и 228 (например, (C223E или C223R), (E225R) и (P228E или P228R)) в шарнирной области и в положении 368 (например, L368E (схема нумерации EU)) в области CH3 человеческого IgG2. В других воплощениях одна цепь Fc биспецифического антитела может содержать аминокислотные модификации в положениях 223 и 228 (например, (C223E или C223R) и (P228E или P228R)) в шарнирной области и в положении 368 (например, L368E (схема нумерации EU)) в области CH3 человеческого IgG2, и другая цепь Fc биспецифического

антитела может содержать аминокислотные модификации в положениях 223, 225 и 228 (например, (C223E или C223R), (E225R) и (P228E или P228R)) в шарнирной области и в положении 409 (например, K409R (схема нумерации EU)) в области CH3 человеческого IgG2. В некоторых воплощениях биспецифическое антитело может содержать аминокислотные модификации в положениях 221 и 228 (например, (D221R или D221E) и (P228R или P228E)) в шарнирной области и в положении 409 или 368 (например, K409R или L368E (схема нумерации EU)) в области CH3 человеческого IgG1. В некоторых воплощениях биспецифическое антитело может содержать аминокислотные модификации в положениях 228 (например, (P228E или P228R)) в шарнирной области и в положении 409 или 368 (например, R409 или L368E (схема нумерации EU)) в области CH3 человеческого IgG4.

В некоторых воплощениях биспецифическое антитело может иметь мутации выступ во впадину в цепях Fc. Например, в некоторых воплощениях в биспецифическом антителе, имеющем мутацию выступ во впадину, первая цепь Fc домена Fc антитела имеет одну или более чем одну мутацию с образованием «выступа», а вторая цепь Fc домена Fc антитела имеет одну или более чем одну мутацию с образованием «впадины» (или наоборот). Примеры антител, сконструированных с выступом во впадину, описаны в патенте США № 5731168, публикации заявки PCT № WO2009089004, публикации патента США № 20090182127, Marvin and Zhu, *Acta Pharmacologica Sinica* (2005) 26(6):649-658 и Kontermann (2005) *Acta Pharmacol. Sin.*, 26:1-9.

«Выступ» относится к по меньшей мере одной аминокислотной боковой цепи, которая выступает из поверхности контакта первого полипептида (например, первой цепи Fc) и, таким образом, позиционируется в компенсирующей впадине в соседнем втором полипептиде (например второй цепи Fc) таким образом, чтобы стабилизировать гетеродимер, и, таким образом, благоприятствовать образованию гетеродимера по сравнению с образованием гомодимера. Выступ может существовать в исходной поверхности контакта или может быть введен синтетически (например, путем изменения нуклеиновой кислоты, кодирующей поверхность контакта). Как правило, нуклеиновую кислоту, кодирующую поверхность контакта первого полипептида, изменяют для кодирования выступа. Для достижения этого нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один исходный аминокислотный остаток в первом полипептиде, заменяют на нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один «импортный» аминокислотный остаток, который обладает большим объемом боковой цепи чем

исходный аминокислотный остаток. Некоторые импортные остатки для образования выступа как правило представляют собой встречающиеся в природе аминокислотные остатки и предпочтительно выбраны из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y) и триптофана (W).

«Впадина» относится к по меньшей мере одной аминокислотной боковой цепи, которая уходит внутрь из поверхности контакта второго полипептида (например, второй цепи Fc) и, таким образом, вмещает соответствующий выступ из соседнего первого полипептида (например первой цепи Fc). Впадина может существовать в исходной поверхности контакта или может быть введена синтетически (например, путем замены нуклеиновой кислоты, кодирующей поверхность контакта). Как правило, нуклеиновая кислота, кодирующая поверхность контакта второго полипептида, изменена таким образом, чтобы кодировать впадину. Для достижения этого нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один исходный аминокислотный остаток второго полипептида, заменяют на ДНК, кодирующую по меньшей мере один «импортный» аминокислотный остаток, который обладает меньшим объемом боковой цепи, чем исходный аминокислотный остаток. Некоторые импортируемые остатки для образования впадины обычно представляют собой встречающиеся в природе аминокислотные остатки и предпочтительно выбраны из аланина (A), серина (S), треонина (T) и валина (V).

Использованный здесь термин «поверхность контакта» как правило относится к любому аминокислотному остатку, представленному в домене, который может быть вовлечен в контакты первого полипептида со вторым полипептидом. Остаток «исходной аминокислоты» представляет собой остаток, который замещается на «импортируемый аминокислотный остаток», который может обладать меньшим или большим объемом боковой цепи, чем исходный остаток. Импортируемый аминокислотный остаток может представлять собой аминокислотный остаток, встречающийся в природе или не встречающийся в природе, но предпочтительно последний. «Встречающиеся в природе» аминокислотные остатки представляют собой остатки, кодируемые генетическим кодом. Под «не встречающимся в природе» аминокислотным остатком понимают остаток, который не кодируется генетическим кодом, но который способен ковалентно связываться с соседним(и) аминокислотным(и) остатком(ами) в полипептидной цепи. Примеры не встречающихся в природе аминокислотных остатков представляют собой

норлейцин, орнитин, норвалин, гомосерин и другие аналоги аминокислотного остатка, такие как описанные в Ellman et al., Meth. Enzym. 202:301-336 (1991).

В некоторых воплощениях биспецифические антитела могут обладать любым из свойств или характеристик любого из биспецифических антител, предложенных в WO2016166629.

Возможный формат биспецифического антитела представляет собой стратегию производного Fv, основанную на структуре ковалентно связанного, биспецифического гетеродимерного диатела, также известного как белки, полученные в соответствии со стратегией повторного нацеливания на основе двойной аффинности (DART[®]), которые описаны, например, публикациях патентов США №№ 2007/0004909, 2009/0060910 и 2010/0174053.

После получения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулы в соответствии с изобретением (т.е. связывающие домены) вектор для продуцирования молекул может быть получен при помощи технологии рекомбинантной ДНК с использованием способов, хорошо известных в области техники.

Полинуклеотиды, кодирующие связывающие домены антитела (например, антитела против CD47, антитела против PD-L1 или биспецифического антитела против CD47/PD-L1) в соответствии с настоящим изобретением могут включать полинуклеотидную последовательность, контролирующую экспрессию, функционально связанную с последовательностями, кодирующими, включая ассоциирующиеся в природе или гетерологические промоторные области, известные в области техники. Последовательности, контролирующие экспрессию, могут представлять собой эукариотические промоторные системы в векторах, способные трансформироваться или трансфицироваться в эукариотические клетки-хозяева, но также могут быть использованы контролирующие последовательности для прокариотических хозяев. После включения вектора в подходящую линию клеток-хозяев последние заставляют делиться в условиях, подходящих для экспрессии нуклеотидных последовательностей, и, как желательно, для сбора и очистки антител. Эукариотические клеточные линии включают линии клеток CHO (клетки яичников китайского хомячка), различные линии клеток COS, клетки HeLa, линии клеток миеломы, трансформированные В-клетки или человеческие эмбриональные почечные клеточные линии.

В одном из воплощений ДНК, кодирующую антитела в соответствии с изобретением, выделяют и секвенируют с использованием обычных способов

(например, путем использования олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антител). После выделения ДНК может быть внедрена в экспрессирующиеся векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как обезьяньи клетки COS, клетки CHO или клетки миеломы, которые, в противном случае, не продуцируют белок иммуноглобулин, для обеспечения синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. ДНК также может быть модифицирована, например, для улучшения одного или более чем одного свойства соответствующего антитела (например, связывающей аффинности, иммуногенности и т.п.).

Антитела против CD47

В некоторых воплощениях здесь предложены антитела против CD47.

В одном из аспектов предложено антитело против CD47, содержащее (а) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую первую область VH, определяющую комплементарность (VH CDR1), вторую область VH, определяющую комплементарность (VH CDR2), и третью область VH, определяющую комплементарность (VH CDR3), где последовательности VH представлены в SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8 или 9; и/или (б) переменную область легкой цепи (VL), содержащую первую область VL, определяющую комплементарность (VL CDR1), вторую область VL, определяющую комплементарность (VL CDR2), и третью область VL, определяющую комплементарность (VL CDR3), где последовательности VL представлены в SEQ ID NO: 2 или 6.

В еще одном аспекте предложено антитело против CD47, имеющее любую одну из последовательности VH и/или любую одну из последовательности VL, перечисленных в таблице 1. В таблице 1 подчеркнутые последовательности представляют собой последовательности CDR в соответствии с нумерацией Кабата и жирным шрифтом приведены в соответствии с нумерацией Чотиа. В одном из воплощений изобретения предложено антитело, содержащее VH и/или VL, где: (а) VH содержит SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8 или 9; и/или (б) VL содержит SEQ ID NO: 2 или 6.

Таблица 1: Примеры последовательностей VH и VL антитела против CD47

Описание	Последовательность
CD47_P01A11_75	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYAISWVRQAP GQGLEWMGGISPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYME

VH	LSSLRSED TAVYYC AR <u>DAGRSSDVGWYVG</u> AIDVWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 1)
CD47_ P01A11_497 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFTS <u>YAIS</u> WVRQA PGQGLEWMGGIS <u>PIFGT</u> ANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSED TAVYYC AR <u>DAGRSSDVGWYVG</u> ALDVWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 3)
CD47_ P01A11_родительская VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTN <u>YAIS</u> WVRQA PGQGLEWMGGIS <u>PLFGT</u> ANYAQKFQGRVTITADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYC AR <u>DGGRSSDVGWYVG</u> AMDVWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 7)
CD47_ P14D04_родительская VH	EVQLLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFSFST <u>FTMN</u> WVRQAP GKGLEWVSTIS <u>GTGGNT</u> YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAED TAVYYC AR <u>RRSTVGSNGHSYWF</u> DYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 8)
CD47_ P01A08_ родительская VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSN <u>YAIT</u> WVRQA PGQGLEWMGGIS <u>PIFGT</u> ANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSED TAVYYC AR <u>DGGRSSDGGWRGAGMD</u> YWGQ TLVTVSS (SEQ ID NO: 9)
Общая легкая цепь 1 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISC <u>SGSSSNIGSNYVY</u> WYQQLPG TAPKLLIY <u>RNNQRPS</u> GV PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDE ADYYC <u>AAWDDSLSGV</u> VFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 2)
Общая легкая цепь 2 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RASQSISSYLN</u> WYQQKPGK APKLLIY <u>AASSLQSG</u> VPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFAT YYC <u>QOSYSTPLT</u> FGGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 6)

В некоторых воплощениях предложенное здесь антитело против CD47 содержит VH и VL, где VH содержит последовательность SEQ ID NO: 1 и VL содержит последовательность SEQ ID NO: 2. В воплощении предложенное здесь антитело против CD47 содержит VH и VL, где VH содержит последовательность SEQ ID NO: 3 и VL содержит последовательность SEQ ID NO: 2. В воплощении предложенное здесь

антитело против CD47 содержит VH и VL, где VH содержит последовательность SEQ ID NO: 7 и VL содержит последовательность SEQ ID NO: 2. В воплощении предложенное здесь антитело против CD47 содержит VH и VL, где VH содержит последовательность SEQ ID NO: 9 и VL содержит последовательность SEQ ID NO: 2. В воплощении предложенное здесь антитело против CD47 содержит VH и VL, где VH содержит последовательность SEQ ID NO: 8 и VL содержит последовательность SEQ ID NO: 6.

В некоторых воплощениях предложенное здесь антитело против CD47 имеет аминокислотную последовательность VL, которая является той же самой, как у множества различных антител, обладающих отличающимися специфичностями связывания. Таким образом, различные предложенные здесь антитела могут иметь различные последовательности VH, но одну и ту же последовательность VL. Хотя эти антитела имеют одну и ту же последовательность VL, поскольку они обладают различными последовательностями VH, они обладают отличающейся друг от друга аффинностью связывания и/или специфичностью. В некоторых воплощениях предложенные здесь антитела, которые имеют одну и ту же последовательность VL, специфически связываются с различными антигенами. Например, здесь предложены антитела против CD47 и против PD-L1, которые имеют VL, которые несут одну и ту же аминокислотную последовательность. Здесь предложены последовательности VL, которые являются одинаковыми для более чем одного антитела, названные здесь как «общая легкая цепь». В таблице 1 предложена информация о последовательности для различных общих легких цепей, которые являются частью предложенных здесь антител. Например, «общая легкая цепь 1» VL является общей для следующих отличающихся антител против CD47 и против PD-L1: CD47_P01A11_75; CD47_P01A11_497; CD47_P01A11_родительская; CD47_P01A08_родительская; PDL1_P06B05_245; PDL1_P06B05_родительская; PDL1_P06A09_родительская. В еще одном примере «общая легкая цепь 2» VL является общей для следующих отличающихся антител против CD47 и против PD-L1: CD47_P14D04_родительская; PDL1_D04D09_родительская VL.

В изобретении также предложены фрагменты CDR антител против CD47.

В одном из аспектов предложено антитело против CD47, имеющее любую одну последовательность из последовательностей VH CDR и/или любую одну последовательность из последовательностей VL CDR, перечисленных в таблице 2. В одном из аспектов изобретения предложено антитело, которое специфически

связывается с CD47, где антитело содержит: (а) VH, содержащую (1) VH CDR1, содержащую SEQ ID NO: 13, 14, 15, 22, 23, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 37, 38 или 39; (2) VH CDR2, содержащую SEQ ID NO: 16, 17, 28, 29, 34 или 35; и (3) а VH CDR3 содержащую SEQ ID NO: 18, 24, 30, 36 или 40; и/или (б) VL, содержащую (1) VL CDR1, содержащую SEQ ID NO: 19 или 53; (2) VL CDR2, содержащую SEQ ID NO: 20 или 54; и (3) VL CDR3, содержащую SEQ ID NO: 21 или 55.

Таблица 2: Примеры последовательностей CDR антитела против CD47

VH CDR			
mAb	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
CD47_ P01A11 _75 VH	GYTFSSY (SEQ ID NO: 13)(Чотиа) SYAIS (SEQ ID NO: 14) (Кабат) GYTFSSY AIS (SEQ ID NO: 15)(Расширенная)	SPIFGT (SEQ ID NO: 16) (Чотиа) GISPIFGTANYAQKF QG (SEQ ID NO: 17) (Кабат)	DAGRSSDVGWYVGA IDV (SEQ ID NO: 18)(Чотиа / Кабат)
CD47_ P01A11 _497 VH	GGTFTSY (SEQ ID NO: 22) (Чотиа) SYAIS (SEQ ID NO: 14) (Кабат) GGTFTSY AIS (SEQ ID NO: 23) (Расширенная)	SPIFGT (SEQ ID NO: 16) (Чотиа) GISPIFGTANYAQKF QG (SEQ ID NO: 17) (Кабат)	DAGRSSDVGWYVGA LDV (SEQ ID NO: 24) (Чотиа / Кабат)

CD47_ P01A11 _родительск ая VH	GYTFTNY (SEQ ID NO: 25) (Чотиа) NYAIS (SEQ ID NO: 26) (Кабат) GYTFTNYAIS (SEQ ID NO: 27) (Расширенная)	SPLFGT (SEQ ID NO: 28) (Чотиа) GISPLFGTANYAQKF QG (SEQ ID NO: 29) (Кабат)	DGGRSSDVGWYVGA MDV (SEQ ID NO: 30) (Чотиа / Кабат)
CD47_ P14D04 _родительск ая VH	GFSFSTF (SEQ ID NO: 31) (Чотиа) TFTMN (SEQ ID NO: 32) (Кабат) GFSFSTFTMN (SEQ ID NO: 33) (Расширенная)	SGTGGN (SEQ ID NO: 34) (Чотиа) TISGTGGNTYYADSV KG (SEQ ID NO: 35) (Кабат)	RRSTVGSNGHSYWFD Y (SEQ ID NO: 36) (Чотиа / Кабат)
CD47_ P01A08 _родительск ая VH	GYTFSNY (SEQ ID NO: 37) (Чотиа) NYAIT (SEQ ID NO: 38) (Кабат)	SPIFGT (SEQ ID NO: 16) (Чотиа) GISPIFGTANYAQKF QG (SEQ ID NO: 17) (Кабат)	DGGRSSDGGWRGAG MDY (SEQ ID NO: 40) (Чотиа / Кабат)

	GYTFSNYAIT (SEQ ID NO: 39) (Расширенная)		
VL CDR			
mAb	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
Общая легкая цепь 1 VL	SGSSSNIGSNYVY (SEQ ID NO: 19) (Чотиа / Кабат)	RNNQRPS (SEQ ID NO: 20) (Чотиа / Кабат)	AAWDDSLSGVV (SEQ ID NO: 21) (Чотиа / Кабат)
Общая легкая цепь 2 VL	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 53) (Чотиа / Кабат)	AASSLQS (SEQ ID NO: 54) (Чотиа / Кабат)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 55) (Чотиа / Кабат)

В некоторых воплощениях здесь предложено антитело против CD47, где VH содержит последовательность SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8 или 9, или ее вариант с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными заменами в последовательности; и/или где VL содержит последовательность SEQ ID NO: 2 или 6, или ее вариант с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными заменами в последовательности. Возможные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. Возможно, замены не располагаются в области CDR.

Изобретение также охватывает предложенные здесь scFv антител против CD47. Одноцепочечные фрагменты вариабельной области получают, например, без ограничения путем генетического слияния вариабельной области легких и/или тяжелых цепей с использованием короткого связывающего пептида (Bird et al., Science 242:423-426, 1988). Также охвачены другие формы одноцепочечных антител, таких как диатела или минитела.

В некоторых воплощениях предложенные здесь антитела против CD47 представляют собой моноклональное антитело. Возможно, антитело против CD47 представляет собой человеческое антитело или гуманизированное антитело.

Антитела против PD-L1

В некоторых воплощениях здесь предложены антитела против PD-L1.

В одном из аспектов предложено антитело против PD-L1, содержащее (а) VH, содержащую VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 последовательности VH, представленной в SEQ ID NO: 4, 5, 10, 11 или 12; и/или (б) VL, содержащую VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 последовательности VL, представленной в SEQ ID NO: 2 или 6.

В еще одном аспекте предложено антитело против PD-L1, имеющее одну из любых последовательностей VH и/или одну из любых последовательностей VL, перечисленных в таблице 3. В таблице 3 подчеркнутые последовательности представляют собой последовательности CDR в соответствии с нумерацией Кабата и жирным шрифтом в соответствии с нумерацией Чотиа. В одном из воплощений изобретения предложено антитело, содержащее VH и/или VL, где: (а) VH содержит SEQ ID NO: 4, 5, 10, 11 или 12; и/или (б) VL содержит SEQ ID NO: 2 или 6.

В некоторых воплощениях предложенное здесь антитело против PD-L1 содержит VH и VL, где VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В воплощении предложенное здесь антитело против PD-L1 содержит VH и VL, где VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В воплощении предложенное здесь антитело против PD-L1 содержит VH и VL, где VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В воплощении предложенное здесь антитело против PD-L1 содержит VH и VL, где VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В воплощении предложенное здесь антитело против PD-L1 содержит VH и VL, где VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

Таблица 3: Примеры последовательностей VH и VL антитела против PD-L1

Описание	Последовательность
PDL1_ P06B05_245 VH	EVQLVESGGGLV KPGG SLRLSCAASGFTFS <u>NAWMN</u> WVRQ APGKGLEWVGRIKTKADGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT <u>DPGEYWDSVYGGMDY</u> WG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 4)

PDL1_ P04D09_113 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAIGVRGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARERSVGELVGIDQMDHWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 5)
PDL1_ P04D09_родительская VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAIGVRGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARERSVGELVGIDWMDHWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 10)
PDL1_ P06B05_родительская VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWVRQ APGKGLEWVGRIKTKADGGTTDYAAPVKGRFTISRDDS KNNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDPGSYWD SVYGGMDYWG QGT LVTVSS (SEQ ID NO: 11)
PDL1_ P06A09_родительская VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWVRQ APGKGLEWVGRIKSESDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDS KNNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDYRIDDWGYPYPGMDYWG QGT LVTVSS (SEQ ID NO: 12)
Общая легкая цепь 1 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYQQLPG TAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDE ADYYCAAWDDSLSGVVF GGG TKLTVL (SEQ ID NO: 2)
Общая легкая цепь 2 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQOQSYSTPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 6)

В изобретении также предложены фрагменты CDR антител против PD-L1.

В одном из аспектов предложено антитело против PD-L1, имеющее одну из любых последовательностей VH CDR и/или одну из любых последовательностей VL CDR, перечисленных в таблице 4. В одном из аспектов изобретения предложено антитело, которое специфически связывается с PD-L1, где антитело содержит: (а) VH, содержащую (1) VH CDR1, содержащую SEQ ID NO: 41, 42, 43, 47, 48 или 49; (2) VH CDR2, содержащую SEQ ID NO: 44, 45, 50, 51, 58 или 59; и (3) VH CDR3, содержащую

SEQ ID NO: 46, 52, 56, 57 или 60; и/или (б) VL, содержащую (1) VL CDR1, содержащую SEQ ID NO: 19 или 53; (2) VL CDR2, содержащую SEQ ID NO: 20 или 54; и (3) VL CDR3, содержащую SEQ ID NO: 21 или 55.

Таблица 4: Примеры последовательностей CDR антитела против PD-L1

VH CDR			
mAb	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
PDL1_ P06B05_245 VH	GFTFSNA (SEQ ID NO: 41)(Чотиа)	KTKADGGT (SEQ ID NO: 44) (Чотиа)	DPGEYWDSVYGGMDY (SEQ ID NO: 46)(Чотиа / Кабат)
	NAWMN (SEQ ID NO: 42) (Кабат)	RIKTKADGGTTDYA APVKG (SEQ ID NO: 45) (Кабат)	
	GFTFSNAWMN (SEQ ID NO: 43)(Расширенная)		
PDL1_ P04D09_113 VH	GFTFSSY (SEQ ID NO: 47) (Чотиа)	GVRGGI (SEQ ID NO: 50) (Чотиа)	ERSVGELVGIDQMDH (SEQ ID NO: 52) (Чотиа / Кабат)
	SYAMS (SEQ ID NO: 48) (Кабат)	AIGVRGGITYYADS VKG (SEQ ID NO: 51) (Кабат)	
	GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 49) (Расширенная)		

PDL1_ P04D09_ родительская VH	GFTFSSY (SEQ ID NO: 47) (Чотиа) SYAMS (SEQ ID NO: 48) (Кабат) GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 49) (Расширенная)	GVRGGI (SEQ ID NO: 50) (Чотиа) AIGVRGGITYYADS VKG (SEQ ID NO: 51) (Кабат)	ERSVGELVGIDWMD H (SEQ ID NO: 56) (Чотиа / Кабат)
PDL1_ P06B05_ родительская VH	GFTFSNA (SEQ ID NO: 41)(Чотиа) NAWMN (SEQ ID NO: 42) (Кабат) GFTFSNAWMN (SEQ ID NO: 43)(Расширенная)	KTKADGGT (SEQ ID NO: 44) (Чотиа) RIKTKADGGTTDYA APVKG (SEQ ID NO: 45) (Кабат)	DPGSYWDSVYGGMD Y (SEQ ID NO: 57) (Чотиа / Кабат)
PDL1_ P06A09_ родительская VH	GFTFSNA (SEQ ID NO: 41)(Чотиа) NAWMN (SEQ ID NO: 42) (Кабат)	KSESDGGT (SEQ ID NO: 58) (Чотиа) RIKSESDGGTTDYA APVKG (SEQ ID NO: 59) (Кабат)	DYRIDDWGYPYPGM DY (SEQ ID NO: 60) (Чотиа / Кабат)

	GFTFSNAWMN (SEQ ID NO: 43)(Расширенная)		
VL CDR			
mAb	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
Общая легкая цепь 1 VL	SGSSSNIGSNYVY (SEQ ID NO: 19) (Чотиа / Кабат)	RNNQRPS (SEQ ID NO: 20) (Чотиа / Кабат)	AAWDDSLSGVV (SEQ ID NO: 21) (Чотиа / Кабат)
Общая легкая цепь 2 VL	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 53) (Чотиа / Кабат)	AASSLQS (SEQ ID NO: 54) (Чотиа / Кабат)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 55) (Чотиа / Кабат)

В некоторых воплощениях здесь предложено антитело против PD-L1, где VH содержит последовательность SEQ ID NO: 4, 5, 10, 11 или 12, или ее вариант с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными заменами в последовательности; и/или где VL содержит последовательность SEQ ID NO: 2 или 6, или ее вариант с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными заменами в последовательности. Возможно замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. Возможно, замены не находятся в области CDR.

Изобретение также охватывает scFv предложенного здесь антитела против PD-L1. Также охвачены другие формы одноцепочечных антител, таких как диатела или минитела.

В некоторых воплощениях предложенное здесь антитело против PD-L1 представляет собой моноклональное антитело. Возможно, антитело против PD-L1 представляет собой человеческое антитело или гуманизированное антитело.

Биспецифические антитела против CD47/PD-L1

В некоторых воплощениях здесь предложены биспецифические антитела против CD47/PD-L1.

Биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 содержит по меньшей мере первый антигенсвязывающий фрагмент (который специфически связывается с CD47) и второй антигенсвязывающий фрагмент (который специфически связывается с PD-L1). В

некоторых воплощениях первый антигенсвязывающий фрагмент содержит первую VH и второй антигенсвязывающий фрагмент содержит вторую VH. В некоторых воплощениях первый антигенсвязывающий фрагмент содержит первую VH и первую VL, и второй антигенсвязывающий фрагмент содержит вторую VH и вторую VL. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность первой VL и второй VL являются одинаковыми.

Предложенное здесь биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 может содержать любое из предложенных здесь антител против CD47 (например в качестве первого антигенсвязывающего фрагмента) и любое из предложенных здесь антител против PD-L1 (например в качестве второго антигенсвязывающего фрагмента).

В некоторых воплощениях предложенное здесь антитело представляет собой биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, содержащее первый антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD47, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-L1, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и/или VL, где: (а) VH содержит SEQ ID NO: 1 и (б) VL содержит SEQ ID NO: 2, и второй антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и/или VL, где: (а) VH содержит SEQ ID NO: 4; и (б) VL содержит SEQ ID NO: 2.

В некоторых воплощениях предложенное здесь антитело представляет собой биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, содержащее первый антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD47, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-L1, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и/или VL, где: (а) VH содержит SEQ ID NO: 3 и (б) VL содержит SEQ ID NO: 2, и второй антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и/или VL, где: (а) VH содержит SEQ ID NO: 4; и (б) VL содержит SEQ ID NO: 2.

В некоторых воплощениях здесь предложено биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, содержащее первый антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD47, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-L1, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит одну из любых последовательностей VH CDR, перечисленных в таблице 2, и где второй антигенсвязывающий фрагмент содержит одну из любых последовательностей VH CDR, перечисленных в таблице 4.

В некоторых воплощениях здесь предложено биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, содержащее первый антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD47, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-L1, где биспецифическое антитело содержит VH и VL или CDR любого из антител против CD47, как представлено в таблице 5, и где биспецифическое антитело содержит VH и VL или CDR любого из антител против PD-L1, представленных в таблице 5.

Таблица 5: Последовательности VH и VL антител против CD47 и против PD-L1:

Антитело	VH SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:
CD47_P01A11_75	1	2
CD47_P01A11_497	3	2
CD47_ P01A11_родительская	7	2
CD47_ P14D04_родительская	8	6
CD47_ P01A08_родительская	9	2
PDL1_P06B05_245	4	2
PDL1_P04D09_113	5	6
PDL1_ P04D09_родительская	10	6
PDL1_ P06B05_родительская	11	2
PDL1_ P06A09_родительская	12	2

В некоторых воплощениях здесь предложено антитело, которое связывается с CD47 и/или PD-L1, и конкурирует с описанным здесь антителом за связывание с

соответствующим антигеном, например, которое конкурирует с CD47_ P01A11_75, CD47_ P01A11_497, CD47_ P01A11_родительская, CD47_ P14D04_родительская или CD47_ P01A08_родительская за связывание с CD47, или которое конкурирует с PDL1_ P06B05_245, PDL1_ P04D09_113, PDL1_ P04D09_родительская, PDL1_ P06B05_родительская или PDL1_ P06A09_родительская за связывание с PD-L1.

Аффинность связывания (K_D) описанных здесь антител к CD47 или PD-L1 может составлять от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 6500 нМ. В некоторых воплощениях аффинность связывания является приблизительно любой из 6500 нМ, 6000 нМ, 5500 нМ, 4500 нМ, 4000 нМ, 3500 нМ, 3000 нМ, 2500 нМ, 2000 нМ, 1500 нМ, 1000 нМ, 750 нМ, 500 нМ, 400 нМ, 300 нМ, 250 нМ, 200 нМ, 150 нМ, 100 нМ, 75 нМ, 50 нМ, 45 нМ, 40 нМ, 35 нМ, 30 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 19 нМ, 17 нМ, 16 нМ, 15 нМ, 10 нМ, 8 нМ, 7,5 нМ, 7 нМ, 6,5 нМ, 6 нМ, 5,5 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,3 нМ, 0,1 нМ, 0,01 нМ, 0,002 нМ или 0,001 нМ. В некоторых воплощениях аффинность связывания составляет менее, чем приблизительно любая из 6500 нМ, 6000 нМ, 5500 нМ, 5000 нМ, 4000 нМ, 3000 нМ, 2000 нМ, 1000 нМ, 900 нМ, 800 нМ, 500 нМ, 250 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 7,5 нМ, 7 нМ, 6,5 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4,5 нМ, 4 нМ, 3,5 нМ, 3 нМ, 2,5 нМ, 2 нМ, 1,5 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ, 0,01 нМ или менее.

В некоторых воплощениях предложенное здесь биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 обладает большей аффинностью в отношении PD-L1, чем CD47 (например, аффинность второго антигенсвязывающего фрагмента антитела в отношении PD-L1 больше, чем аффинность первого антигенсвязывающего фрагмента антитела в отношении CD47). Не желая быть связанными теорией, биспецифические антитело против CD47/PD-L1, обладающее большей аффинностью в отношении PD-L1, чем в отношении CD47, может быть желательным для уменьшения возможных побочных действий или токсичности, возможно вызванными связывающим фрагментом антитела против CD47. Кроме того, для экспрессии на различных раковых клетках CD47 экспрессируется в широком диапазоне здоровых человеческих клеток (включая эритроциты (RBC)), и последнее представляет собой возможность для существенных неблагоприятных побочных действий со стороны антител против CD47 вследствие связывания антител против CD47 с здоровыми клетками. Биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, содержащее антигенсвязывающий фрагмент против CD47 с относительно низкой аффинностью, преимущественно может связываться с раковыми клетками, нежели чем со здоровыми клетками, вследствие относительно низкой

аффинности таких биспецифических антител в отношении здоровых клеток, таких как RBC (которые экспрессируют белок CD47, но не белок PD-L1), и относительно высокой аффинности таких биспецифических антител в отношении раковых клеток (которые часто экспрессируют как CD47, так и PD-L1). В некоторых воплощениях в предложенном здесь биспецифическом антителе против CD47/PD-L1, которое обладает большей аффинностью в отношении PD-L1, чем CD47, связывающий фрагмент антитела против PD-L1 обладает по меньшей мере 2х (т.е. 2-раза), 3х, 5х, 10х, 20х, 50х, 100х, 200х, 500х, 1000х, 2000х или 5000х большей аффинностью в отношении PD-L1, чем аффинность связывающего фрагмента антитела против CD47. В некоторых воплощениях в предложенном здесь биспецифическом антителе против CD47/PD-L1, которое обладает большей аффинностью в отношении PD-L1, чем в отношении CD47, связывающий фрагмент антитела против PD-L1 обладает связывающей аффинностью (K_D) в отношении PD-L1 приблизительно или менее чем 10 нМ, 5 нМ, 3 нМ, 2 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, и связывающий фрагмент антитела против CD47 обладает связывающей аффинностью (K_D) в отношении CD47 приблизительно или менее чем 1000 нМ, 600 нМ, 500 нМ, 400 нМ, 300 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 20 нМ или 10 нМ, где аффинность связывающего фрагмента антитела против PD-L1 в отношении PD-L1 является по меньшей мере 2х, 3х, 5х, 10х, 20х, 50х, 100х, 200х, 500х, 1000х, 2000х или 5000х большей (т.е. меньшая величина в нМ, поскольку о большей аффинности свидетельствует меньшая величина в нМ), чем аффинность связывающего фрагмента антитела против CD47 в отношении CD47.

В некоторых воплощениях предложенное здесь биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 обладает похожей аффинностью в отношении CD47 и PD-L1.

Предложенное здесь биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 может иметь любой подходящий формат. В некоторых воплощениях предложенное здесь биспецифическое антитело содержит полноразмерное человеческое антитело. В некоторых воплощениях человеческое антитело имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых воплощениях антитело содержит иммунологически инертную цепь Fc.

В некоторых воплощениях предложенное здесь биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 может иметь формат, описанный в Suurs, F.V. et al, *Pharmacology & Therapeutics*, 201 (2019) pp. 103-119.

Возможно, биспецифические антитела могут быть получены путем конструирования фрагментов scFv с короткими линкерами (например, приблизительно 3-10 остатков) между VH и VL, таким образом, что достигается межцепочечное, нежели чем внутрицепочечное спаривание областей V, что приводит в результате к двухвалентному фрагменту, т.е. фрагменту, имеющему два антигенсвязывающих сайта. Биспецифические антитела могут быть получены из плоноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифических антител F(ab')₂). Антитела более полно описаны, например, в EP404,097; WO93/11161; и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993.

Настоящее изобретение охватывает биспецифические антитела, содержащие цепь Fc или домен, или их фрагменты. В некоторых воплощениях цепь Fc или ее фрагмент(ы) содержит один или более чем один константный(е) домен(ы) цепи Fc из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (например, домен CH2 или CH3). В еще одном воплощении изобретение охватывает молекулы, содержащие цепь Fc или ее фрагмент, где цепь Fc или ее фрагмент содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию (например, замену) относительно сравниваемой цепи Fc дикого типа или ее фрагмента. Варианты цепи Fc хорошо известны в области техники и прежде всего используются для изменения фенотипа антитела, содержащего вариант цепи Fc, измеряемого в соответствии с любым из анализов связывающей активности или эффекторной функции, хорошо известными в области техники, например, ELISA (иммуноферментный анализ), анализ SPR (поверхностно-плазмонный резонанс) или ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность). Такие варианты цепей Fc или их фрагментов могут увеличивать период полувыведения из плазмы крови и стабильность, демонстрируемую биспецифическим антителом в соответствии с изобретением, содержащую цепь Fc или ее фрагмент. В еще одном воплощении изобретение охватывает применение любого варианта Fc, известного в области техники.

В некоторых воплощениях одну или более чем одну модификацию осуществляют в отношении аминокислот цепи Fc для уменьшения аффинности и авидности цепи Fc и, таким образом, молекулы биспецифического антитела в соответствии с изобретением в отношении одного или более чем одного рецептора FcγR. В конкретном воплощении изобретение охватывает биспецифические антитела, содержащие вариант цепи Fc, или ее фрагмент, где вариант цепи Fc содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию относительно цепи Fc дикого типа, где вариант цепи Fc связывается

только с одним FcγR, где FcγR представляет собой FcγRIIA. В еще одном специфическом воплощении изобретение охватывает биспецифические антитела, содержащие вариант цепи Fc или ее фрагмент, где вариант цепи Fc содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию относительно цепи Fc дикого типа, где вариант цепи Fc связывается только с одним FcγR, где FcγR представляет собой FcγRIIA. В еще одном конкретном воплощении изобретение охватывает биспецифические антитела, содержащие вариант цепи Fc или ее фрагмент, где вариант цепи Fc содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию относительно цепи дикого типа Fc, где вариант цепи Fc связывается только с одним FcγR, где FcγR представляет собой FcγRIIB. В еще одном воплощении изобретение охватывает молекулы, содержащие вариант цепи Fc, где вариант обеспечивает или опосредует уменьшенную активность ADCC (или другую эффекторную функцию) и/или увеличенное связывание с FcγRIIB (CD32B) относительно молекулы, не содержащей цепь Fc или содержащей цепь Fc дикого типа, что измеряют с использованием способов, известных специалистам в данной области техники и описанных здесь.

Изобретение также охватывает применение цепи Fc, содержащей домены или области двух или более чем двух изотипов IgG. Как известно в области техники, аминокислотная модификация цепи Fc может кардинально влиять на опосредованную Fc эффекторную функцию и/или связывающую активность. Тем не менее, эти изменения функциональных характеристик могут быть дополнительно улучшены и/или модифицированы в контексте выбранных изотипов IgG. Аналогично, нативные характеристики изотипа Fc могут быть модифицированы путем одной или более чем одной аминокислотной модификации. Множество изотипов IgG (т.е. IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) демонстрирует отличающиеся физические и функциональные свойства, включающие период полувыведения из сыворотки крови, фиксацию комплемента, аффинности связывания с FcγR и эффекторные функциональные активности (например, ADCC, CDC) вследствие различия в аминокислотных последовательностях шарнирных областей и/или цепей Fc.

В некоторых воплощениях аминокислотная модификация и цепь Fc IgG независимо выбраны на основе их соответствующих, отдельных активностей связывающей и/или эффекторной функции для конструирования биспецифического антитела, обладающего желаемыми характеристиками. В конкретном воплощении аминокислотные модификации и шарнирная область/цепь Fc IgG анализируют по

отдельности в отношении связывания и/или эффекторной функции в соответствии с описанным здесь или известным в области техники в контексте IgG1. В одном из воплощений аминокислотная модификация и шарнирная область/цепь Fc IgG демонстрируют похожую функциональность, например, уменьшенную активность ADCC (или другую эффекторную функцию) и/или увеличенное связывание с FcγRIIB в контексте биспецифического антитела или другой содержащей Fc молекулы (например, иммуноглобулина). В еще одном воплощении изобретение охватывает варианты цепей Fc, содержащие комбинации аминокислотных модификаций, известных в области техники, и выбранных областей IgG, которые демонстрируют новые свойства, которые не обнаруживались тогда, когда модификации и/или области анализировали независимо в соответствии с описанным здесь.

В некоторых таких воплощениях биспецифические антитела в соответствии с настоящим изобретением содержат первый домен, способствующий образованию гетеродимера, на первой полипептидной цепи и второй домен, способствующий образованию гетеродимера, на второй полипептидной цепи. Вместе первый и второй домены, способствующие образованию гетеродимера, способствуют гетеродимеризации и/или стабилизируют биспецифическое антитело (например, путем взаимодействия выступа и впадины на комплементарных доменах, способствующих образованию гетеродимера) и/или служат для стабилизации биспецифического антитела.

В некоторых воплощениях домен Fc предложенного здесь биспецифического антитела содержит первую цепь Fc и вторую цепь Fc, где каждая из первой и второй цепи Fc содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с цепью Fc дикого типа с образованием выступа или впадины. В некоторых воплощениях первая цепь Fc содержит выступ, а вторая цепь Fc содержит впадину. В некоторых воплощениях первая цепь Fc может содержать домен CH2 и/или CH3, модифицированный таким образом, что содержит выступ или впадину. В некоторых воплощениях первая цепь Fc содержит мутации Y349C и/или T366W для образования выступа; и вторая цепь Fc содержит мутации S354C, T366S, L368A и/или Y407V для образования впадины (нумерация в соответствии с индексом EU). В некоторых конкретных воплощениях мутации приводят к уменьшенной эффекторной функции.

В конкретном воплощении каждого из вышеприведенных первая цепь Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 65 с образованием выступа (цепь Fc человеческого IgG1 с мутациями выступа); и вторая цепь Fc содержит

последовательность SEQ ID NO: 66 с образованием впадины (цепь Fc человеческого IgG1 с мутациями впадины).

Возможно, предложенная здесь VH антитела против CD47 может быть генетически слита с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 66 с образованием первой тяжелой цепи биспецифического антитела, и предложенная здесь VH антитела против PD-L1 может быть генетически слита с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 66 с образованием второй тяжелой цепи биспецифического антитела, где одна из них генетически слита с SEQ ID NO: 65, а другая генетически слита с SEQ ID NO: 66. Возможно, предложенная здесь тяжелая цепь антитела против CD47 или против PD-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 66, может быть лишена С-концевого лизина SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 66. Другими словами, в некоторых случаях С-концевой лизин тяжелой цепи предложенного здесь антитела может быть отщеплен от антитела, и такие антитела, лишенные С-концевого лизина, включены в объем предложенных здесь тяжелых цепей антитела.

В некоторых воплощениях здесь предложено биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи против CD47 и тяжелой цепи против PD-L1, как приведено в таблице 6А. Как тяжелые цепи антитела против CD47 в таблице 6А имеют мутацию впадины в цепи Fc, так и тяжелая цепь антитела против PD-L1 имеет мутацию выступа в цепи Fc. В некоторых воплощениях здесь предложено биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, содержащее тяжелую цепь против CD47, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, и тяжелую цепь против PD-L1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64. Возможно, что биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 может дополнительно содержать две копии легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62. Легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62, представляет собой обычную легкую цепь, и она может образовывать пару с тяжелой цепью антитела против CD47 и с тяжелой цепью антитела против PD-L1. В некоторых воплощениях здесь предложено биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, содержащее тяжелую цепь против CD47, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63, и тяжелую цепь против PD-L1, содержащую аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64. Возможно, что биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 может дополнительно содержать две копии легкой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62.

Таблица 6А: Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи для примера биспецифических антител против CD47/PD-L1

Описание	Последовательность
CD47_ P01A11_75 Тяжелая цепь [человеческий IgG1 содержащий мутации впадины в цепи Fc; мутации впадины подчеркнуты (S354C, T366S, L368A, и Y407V, нумерация EU); VH курсивом]	<i>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</i> <i>SCKASGYTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM</i> <i>GGISPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD</i> <i>AGRSSDVGWYVG</i> <i>AIDVWGQGTLVTVSS</i> ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 61)
CD47_ P01A11_497 Тяжелая цепь [человеческий IgG1, содержащий мутации впадины в	<i>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</i> <i>SCKASGGTFTSYAISWVRQAPGQGLEWM</i> <i>GGISPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD</i> <i>AGRSSDVGWYVG</i> <i>ALDVWGQGTLVTVSS</i> ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLSCA

цепи мутации впадины подчеркнуты (S354C, T366S, L368A, и Y407V, нумерация EU); VH курсивом]	VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 63)
PDL1_ P06B05_245 Тяжелая цепь [человеческий IgG1, содержащий мутации выступа; мутации выступа подчеркнуты (Y349C и Y366W); VH курсивом]	<i>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWVRQAPGKGLEW VGRIKTKADGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCTTDPGEYWDSVYGGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 64)</i>
Общая легкая цепь 1 Полноразмерн ая легкая цепь (VL курсивом)	<i>QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYR NNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGVVF GGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV TVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 62)</i>

В любом из предложенных здесь воплощений, которые включают антитело, имеющее тяжелую цепь, включенную в объем воплощения, это антитело не содержит C-

концевой лизин в тяжелой цепи. Соответственно, например, для предложенного здесь антитела, которое включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, также предложено антитело, имеющее аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, за исключением С-концевого лизина как представлено в SEQ ID NO: 61. В еще одном примере для предложенного здесь антитела, которое включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63, также предложено антитело, имеющее аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63, за исключением С-концевого лизина как представлено в SEQ ID NO: 63. В еще одном примере для предложенного здесь антитела, которое включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, также предложено антитело, имеющее аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, за исключением С-концевого лизина как представлено в SEQ ID NO: 64. В некоторых воплощениях здесь предложено биспецифические антитело против CD47/PD-L1, содержащее первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, где ни одна из, одна или обе тяжелые цепи лишены С-концевого лизина в соответствующей последовательности тяжелой цепи. В некоторых воплощениях здесь предложено биспецифические антитело против CD47/PD-L1, содержащее первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63, и вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, где ни одна из, одна или обе тяжелые цепи лишены С-концевого лизина соответствующей последовательности тяжелой цепи.

В одном из аспектов здесь предложено биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, где биспецифическое антитело содержит первую тяжелую цепь, специфическую в отношении CD47, вторую тяжелую цепь, специфическую в отношении PD-L1, и общую легкую цепь; где первая тяжелая цепь обладает аминокислотной последовательностью, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты вставки плазмиды, депонированной в АТСС, и имеющей регистрационный номер АТСС РТА-126910; вторая тяжелая цепь обладает аминокислотной последовательностью, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты вставки плазмиды, депонированной в АТСС и имеющей регистрационный номер АТСС РТА-126911, и

общая легкая цепь обладает аминокислотной последовательностью, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты вставки плазмиды, депонированной в АТСС и имеющей регистрационный номер АТСС РТА-126912.

Полинуклеотиды и способы получения, характеристики и модификации антител

Настоящее изобретение также включает полинуклеотиды, которые кодируют антитела в соответствии с изобретением, включая полипептиды и связывающие области антител. Могут быть получены полинуклеотиды, кодирующие молекулы в соответствии с изобретением, и нуклеотидная последовательность полинуклеотидов определена при помощи любого из способов, известных в области техники.

Полинуклеотиды, которые кодируют антитела в соответствии с настоящим изобретением могут включать следующие: кодирующие исключительно последовательность для варианта, кодирующие последовательность для варианта и дополнительные кодирующие последовательности, такие как функциональный полипептид или сигнальная или секреторная последовательность или последовательность пробелка; кодирующие последовательность антитела и не кодирующая последовательность, такая как интроны или не кодирующая последовательность, расположенная 5' и/или 3' относительно кодирующей последовательности антитела. Термин «полинуклеотид, кодирующий антитело» охватывает полинуклеотид, который включает дополнительную кодирующую последовательность для варианта, а также полинуклеотид, который включает дополнительную кодирующую и/или не кодирующую последовательность. В области техники известно, что полинуклеотидная последовательность, которая оптимизирована для конкретной клетки-хозяина/системы экспрессии, может быть легко получена из аминокислотной последовательности желаемого белка (смотри GENEART® AG, Regensburg, Germany).

В некоторых воплощениях здесь предложен полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую любую из аминокислотных последовательностей предложенных здесь антител против CD47 или против PD-L1, (например, в любой из таблиц 1, 2, 3, 4 или 5). Также здесь предложены родственные векторы и клетки-хозяева, содержащие полинуклеотиды.

В некоторых воплощениях здесь предложен полинуклеотид, кодирующий VH антитела, которое специфически связывается с CD47, где полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67 или 69. В

некоторых воплощениях здесь предложен полинуклеотид, кодирующий VL обычной легкой цепи антитела, которое специфически связывается с CD47 и PD-L1, где полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 68. В некоторых воплощениях здесь предложен полинуклеотид, кодирующий VH антитела, которое специфически связывается с PD-L1, где полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70. В некоторых воплощениях здесь предложен полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с CD47, где полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71 или 73. В некоторых воплощениях здесь предложен полинуклеотид, кодирующий общую легкую цепь антитела, которое специфически связывается с CD47 и PD-L1, где полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72. В некоторых воплощениях здесь предложен полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с PD-L1, где полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 74. Также здесь предложены родственные векторы и клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO 67-74.

В некоторых воплощениях здесь предложен полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в таблице 6B.

Таблица 6B:

Описание	Последовательность
Полинуклеотид, кодирующий CD47_ P01A11_75 VH (SEQ ID NO: 1)	caagtgcaactggtgcagtcaggcgccgaagtcaagaagccgggtctagcgtgaaagtgtcgtgcaagg cctcaggctacacctctcctcctatgcatcagctgggtcagacaggcgctggacagggactcgagtgga tggtggcatttccccatcttcggaaccgcaaactacgcccagaagtttcaggggccgcgtgaccatcactg ccgacgagagcacttcgaccgcctacatggaactgtcctcgtcggtccgaagataccgccgtgtactact gtgctcgggatgctggaaggtcctccgacgtcggttggtacgtgggggccattgacgtctggggacagggga actctggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO: 67)
Полинуклеотид,	caatcagtgctgaccagcctccctctgcatccggaacccgggacagagagtcaccatctcctgctccggt tcgtcctcgaacatcggcagcaactacgtgtactggtaccagcaactccctgggactgccccaaagctgctc

кодирующий общую легкую цепь 1 VL (SEQ ID NO: 2)	atctatcggaacaatcagcggccttcggagtgccggacaggttctccggaagcaaactgggcactagcgc ctcactggctattagcgggttgcgctccgaggacgaagccgactactactgtgccgcgtgggatattcccttt ccggcgctcgtgttcggggcggaaccaagctgactgtgcta (SEQ ID NO: 68)
Полинуклеот ид, кодирующий CD47_ P01A11_497 VH (SEQ ID NO: 3)	caagtgcagcttgtgcagtcgggcgctgaagtcaagaagcctgggtcatcggtgaaagtgtcctgaaggc ctctgggggaaccttcacgtcctacgcgattagctgggtccgccaagcaccgggacagggaactggagtgg atgggcggaatcagccccatcttcggcactgccaaactacgcccagaagtctcagggtcgcgctgactatcacc ggcgacgaatccacctaaccgcctacatggaactgagctccctgcggtccgaggacactgccgtgtattac tgtgcgagagatgctggacggctgctccgatgtcggttggtacgtgggagccctcgacgtctggggacaggg caccctggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO: 69)
Полинуклеот ид, кодирующий PDL1_ P06B05_245 VH (SEQ ID NO: 4)	gaagtgcagctggttgaaagcgggtgggtggcctgggtcaaacctgggtgtagcctgcgtctgagctgtgcggc gtcagggtttacgttctcaaatgcgtggatgaattgggtcagacaggcgcccgaaagggaactggaatgggt cgggcgcattaaaacaaaggctgatggcggtactaccgattatgcagcgccggtgaaaggacgtttaccat ctcacgtgacgattcgaaaaacaccctgtaccttcagatgaacagcctgaaaaccgaggacaccgcagtata ctattgcactaccgacccgggcgagtagctgggatagcgtttatggcggtatggattactggggccaaggtag actggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO: 70)
Полинуклеот ид, кодирующий CD47_ P01A11_75 Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 61)	caagtgcaactgggtgcagtcaggcgccgaagtcaagaagccggggtctagcgtgaaagtgtcgtgcaagg cctcaggctacaccttctcctctatgcgatcagctgggtcagacaggcgccctggacagggaactcgagtgga tgggtggcatttccccatcttcggaaccgcaaaactacgcccagaagtctcaggggccgctgaccatcactg ccgacgagagcacttcgaccgcctacatggaactgtcctcgctgcggtccgaagataccgccgtgtactact gtgctcgggatgctggaaggtcctccgacgtcggttggtacgtgggggccattgacgtctggggacagggga actctgggtcaccgtctcctcagcgtcgaccaaggggcccatcggtcttccccctggcacccctcctcaagagc acctctgggggcacagcgccctggggtgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctgtg gaactcaggcgccctgaccagcgcggtgcacaccttcccggtgtcctacagtctcaggactctactccct cagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagc ccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaattctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgc

	ccagcacctgaactcctggggggaccgtcagctcttcttcccccaaaaccaaggacaccctcatgatct cccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagtcaactgg tacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaacagcacgtac cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctcc aacaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag gtgtacaccctgccccatgccgggaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgtcctgcgcggtcaag gcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccac gcctcccgctgctggactccgacggctccttctcctgtagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggca gcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctc cctgtcccccgaaaa (SEQ ID NO: 71)
Полинуклеот ид, кодирующий общую легкую цепь 1 Полноразмер ная легкая цепь (SEQ ID NO: 62)	caatcagtgtgacccagcctcctctgcatccggaacccgggacagagatcacctctcctgctccggt tcgtcctcgaacatcggcagcaactacgtgtactggtaccagcaactcctgggactgccccaaagctgctc atctatcggaacaatcagcggccttcggagtgccggacaggttctccggaagcaaatcgggcactagcgc ctcactggctattagcggtttgcgctccgaggacgaagccgactactactgtgccgctgggatgattcccttt ccggcgtcgtgttcggggggcgaaccaagctgactgtgctaggtcagcccaaggctgccccctcggtcact ctgttcccaccctcctctgaggagcttcaagccaacaagggcacactggtgtgtctcataagtgaattctacc gggagccgtgacagtggcctggaaggcagatagcagccccgtaaggcgggagtggagaccaccacac cctccaaacaagcaacaacaagtacgcggccagcagctacctgagcctgacgcctgagcagtggaaagtc ccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagcaccgtggagaagacagtggcccctacaga atgttca (SEQ ID NO: 72)
Полинуклеот ид, кодирующий CD47_ P01A11_497 Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 63)	caagtgcagcttgtgagtcgggcgctgaagtcaagaagcctgggtcatcggtgaaagtgtcctgcaaggc ctctgggggaaccttcacgtcctacgcgattagctgggtccgccaagcaccgggacagggaactggagtgg atgggcggaatcagccccatcttcggcactgccaactacgccagaagtttcagggtcgcgtgactatcacc gccgacgaatccacctcaaccgcctacatggaactgagctccctgcggtccgaggacactgccgtgtattac tgtgcgagagatgctggacggctcgtccgatgtcggttggtacgtgggagccctcgacgtctggggacaggg caccctggtcaccgtctcctcagcgtcgaccaagggcccatcggttctccccctggcaccctcctcaagag cacctctgggggacagcggccctgggctgcctggtaaggactactccccgaaccgggtgacggtgtcgt ggaaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacctccgggtgtcctacagtctcaggactctactccc tcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaag cccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgacaaaactcacacatgccaccgtg

	cccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgat ctcccgaccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagtcaact ggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgt accgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctt ccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctcaaagccaaagggcagccccgagaaccac aggtgtacaccctgcccccatgccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgtcctgcgcggtcaa aggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgggagaacaactacaagacc acgcctcccgtgtggactccgacggctccttcttctcgttagcaagctcaccgtggacaagagcaggtgg cagcaggggaacgtcttctcatgctcgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctc tcctgtcccccggaaaa (SEQ ID NO: 73)
Полинуклеот ид, кодирующий PDL1_ P06B05_245 Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 64)	gaagtgcagctggtgaaagcgggtggcctgggtcaaacctggtggtagcctgcgtctgagctgtgcggc gtcaggttttacgttctcaaatgcgtggatgaattgggtcagacaggcggccggaaagggactggaatgggt cgggcgcattaaaacaaaggctgatggcggtactaccgattatgcagcggcggtaagagcgtttaccat ctcacgtgacgattcgaaaaacaccctgtaccttcagatgaacagcctgaaaaccgaggacaccgcagtata ctattgcactaccgacccgggcgagtactgggatagcgtttatggcggtatggattactggggccaaggtag actggtcaccgtctcctcagcgtcgaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctcaagagcac ctctggggggcacagcggccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccggtagcgggtgctgga actcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctca gcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccc agcaacaccaagggtggacaagaaagttgagcccaaatctgtgacaaaactcacatgcccaccgtgccc agcacctgaactcctggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcc cggaccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggta cgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccg tgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctctcaa caaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctcaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggt gtgcaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgtggtgcctgggtcaaaggc ttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgc ctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagc

	aggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccggaaaa (SEQ ID NO: 74)
--	---

Полинуклеотиды, комплементарные любым таким последовательностям, также охвачены настоящим изобретением. Полинуклеотиды могут быть одноцепочечными (кодирующими или антисмысловыми) или двухцепочечными, и могут представлять собой молекулы ДНК (геномной, кДНК или синтетической) или РНК. Молекулы РНК включают зрелые и незрелые мРНК, такие как предшественники мРНК (пре мРНК), или гетерогенные ядерные мРНК (гяРНК) и зрелые мРНК. Дополнительные кодирующие или не кодирующие последовательности могут быть представлены, но не обязательно, в полинуклеотиде в соответствии с настоящим изобретением, и полинуклеотид может быть связан, но не обязательно, с другими молекулами и/или сопутствующими материалами.

Специалистам в данной области техники понятно, что в результате вырожденности генетического кода существует множество нуклеотидных последовательностей, которые кодируют предложенные здесь аминокислотные последовательности. Полинуклеотиды, которые варьируют вследствие различий в использовании кодонов, специфически охвачены в настоящем изобретении.

В одном из аспектов здесь предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере VN антитела, которое специфически связывается с CD47, где нуклеиновая кислота содержит вставки последовательности нуклеиновой кислоты плазмиды, депонированной в АТСС и имеющей регистрационный номер АТСС РТА-126910. Также здесь предложен полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, кодируемую вставкой последовательности нуклеиновой кислоты плазмиды, депонированной в АТСС и имеющей регистрационный номер АТСС РТА-126910.

В одном из аспектов здесь предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере VL общей легкой цепи антитела, которое специфически связывается с CD47 и PD-L1, где нуклеиновая кислота содержит вставки последовательности нуклеиновой кислоты плазмиды, депонированной в АТСС и имеющей регистрационный номер АТСС РТА-126912. Также здесь предложен полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, кодируемую вставкой

последовательности нуклеиновой кислоты плазмиды, депонированной в АТСС и имеющей регистрационный номер АТСС РТА-126912.

В одном из аспектов здесь предложено выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере V_H антитела, которое специфически связывается с PD-L1, где нуклеиновая кислота содержит вставки последовательности нуклеиновой кислоты плазмиды, депонированной в АТСС и имеющей регистрационный номер АТСС РТА-126911. Также здесь предложен полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, кодируемую вставкой последовательности нуклеиновой кислоты плазмиды, депонированной в АТСС и имеющей регистрационный номер АТСС РТА-126911.

В одном из аспектов изобретения предложен способ получения любых полинуклеотидов, предложенных здесь. Например, полинуклеотиды в соответствии с данным изобретением можно получить, используя химический синтез, рекомбинантные способы или ПЦР (полимеразная цепная реакция). Способы химического синтеза хорошо известны в уровне техники и не нуждаются здесь в подробном описании. Специалист в данной области техники может использовать последовательности, предложенные здесь, и имеющийся в продаже ДНК-синтезатор для получения необходимой последовательности ДНК.

Для получения полинуклеотидов с использованием рекомбинантных способов, полинуклеотид, содержащий желаемую последовательность, может быть встроен в подходящий вектор, и данный вектор, в свою очередь, может быть введен в подходящую клетку-хозяина для репликации и размножения, как обсуждается здесь далее. Полинуклеотиды могут быть встроены в клетки-хозяева при помощи любых способов, известных в области техники. Клетки трансформируют путем введения экзогенного полинуклеотида посредством прямого поглощения, эндоцитоза, трансфекции, F-спаривания или электропорации. После встраивания экзогенный полинуклеотид может поддерживаться в данной клетке как неинтегрированный вектор (такой как плазида) или интегрированный в геном клетки-хозяина. Амплифицированный таким образом полинуклеотид может быть выделен из клетки-хозяина при помощи способов, хорошо известных в области техники (например, Sambrook et al., 1989).

Альтернативно, с помощью ПЦР можно репродуцировать последовательности ДНК. Методика ПЦР хорошо известна в области техники и описана в патентах США

№№ 4683195, 4800159, 4754065 и 4683202, а также в PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkhäuser Press, Boston, 1994.

РНК может быть получена с использованием выделенной ДНК в соответствующем векторе и встраиванием в подходящую клетку-хозяина. При клеточной репликации и транскрипции ДНК в РНК, указанную РНК затем можно выделить с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, как описано, например, в Sambrook et al., 1989, выше.

Подходящие клонирующие векторы могут быть сконструированы в соответствии со стандартными способами или же могут быть выбраны из большого количества клонирующих векторов, доступных в области техники. Хотя выбранный клонирующий вектор может варьировать в зависимости от того, какую клетку-хозяин предполагается использовать, полезные клонирующие векторы как правило должны обладать способностью к саморепликации, могут обладать единственной мишенью для конкретной эндонуклеазы рестрикции и/или могут нести гены для маркера, которые можно использовать при селекции клонов, содержащих указанный вектор. Подходящие примеры включают в себя плазмиды и бактериальные вирусы, например, pUC18, pUC19, Bluescript (например, pBS SK+) и их производные, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, фаговые ДНК и челночные векторы, такие как pSA3 и pAT28. Эти и многие другие клонирующие векторы доступны у коммерческих поставщиков, таких как Biorad, Strategene и Invitrogen.

Как правило, экспрессирующиеся векторы представляют собой реплицируемые полинуклеотидные конструкции, которые содержат полинуклеотид в соответствии с изобретением. Последнее означает, что экспрессирующийся вектор должен реплицироваться в клетках-хозяевах либо в виде эписом, либо как интегральная часть хромосомной ДНК. Подходящие экспрессирующиеся векторы включают в себя без ограничения плазмиды, вирусные векторы, включая аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы, космиды и экспрессирующийся(иеся) вектор(ы), раскрытые в публикации РСТ № WO 87/04462. Компоненты вектора как правило могут включать в себя без ограничения один или более чем один из следующих: сигнальную последовательность; точку начала репликации; один или более чем один маркерный ген; подходящие элементы, осуществляющие контроль транскрипции (такие как промоторы, энхансеры и терминатор). Для экспрессии (то есть трансляции) обычно требуется также один или более чем один элемент, осуществляющий контроль

трансляции, такие как сайты связывания с рибосомами, сайты инициации трансляции и стоп-кодона.

Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотиды, могут быть встроены в клетку-хозяина при помощи любого из множества подходящих способов, включающих электропорацию, трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE (диэтиламиноэтил)-декстрана или других веществ; бомбардировку микрочастицами; липофекцию и инфицирование (например, в случае, когда вектор является инфекционным агентом, таким как вирус коровьей оспы). Выбор вводимых векторов или полинуклеотидов будет зачастую зависеть от особенностей клетки-хозяина.

Любые клетки-хозяева, способные к повышенной экспрессии гетерологичных ДНК, могут быть использованы для задач экспрессии генов, кодирующих представляющие интерес антитела, полипептид или белок. Не ограничивающие объем изобретения примеры клеток-хозяев млекопитающих включают в себя, но не ограничиваются клетками COS, HeLa и CHO. Смотри также публикацию РСТ № WO 87/04462. Подходящие клетки-хозяева, отличающиеся от млекопитающих, включают в себя прокариоты (такие как *E. coli* или *B. subtilis*) и дрожжи (такие как *S. cerevisiae*, *S. pombe*; или *K. lactis*). Клетка, в которой осуществляется повышенная экспрессия интересующего антитела или белка, может быть идентифицирована при помощи известных способов скрининга.

Изобретение также охватывает модификации предложенных здесь антител, включающие функционально эквивалентные антитела, которые не оказывают существенного влияния на их свойства, и варианты, обладающие увеличенной или уменьшенной активностью и/или аффинностью. Например, аминокислотная последовательность может быть подвергнута мутации с получением антитела, обладающего желаемой аффинностью связывания с CD47 и/или PD-L1. Примеры модифицированных полипептидов включают полипептиды с консервативными заменами аминокислотных остатков, одной или более чем одной делецией или вставкой аминокислот, которые не оказывают существенного пагубного изменения функциональной активности, или которые приводят к созреванию (усилению) аффинности полипептида в отношении своего лиганда, или применение химических аналогов.

Вставки в аминокислотную последовательность включают слияния по аминокислотному и/или карбоксильному концу, варьирующие по длине от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более чем сто остатков, а также вставки в последовательность одного или множества аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело, имеющее N-концевой метионильный остаток, или антитело, слитое с эпитопной меткой. Другие варианты вставки молекулы антитела включают антитело, слитое по N- или C-концу с ферментом или полипептидом, увеличивающим период полувыведения антитела из системы кровообращения.

Варианты по замене включают удаление по меньшей мере одного аминокислотного остатка из молекулы антитела и встраивание вместо него отличающегося остатка. Представляющие наибольший интерес сайты для мутагенеза путем замены включают гипервариабельные области, но также рассматриваются замены FR. Консервативные замены представлены в таблице 7 под заголовком «Консервативные замены». Если такие замены приводят в результате к изменению биологической активности, то дополнительные существенные изменения, обозначенные в таблице 7 как «Примеры замен», или как дополнительно описано ниже в отношении классов аминокислот, могут быть осуществлены, и продукты подвергнуты скринингу.

Таблица 7: Аминокислотные замены

Исходный остаток (встречающаяся в природе аминокислота)	Консервативные замены	Примеры замен
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg

Исходный остаток (встречающаяся в природе аминокислота)	Консервативные замены	Примеры замен
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин
Leu (L)	Ile	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин

Существенные модификации в биологических свойствах антитела осуществляют путем выбора замен, которые существенно отличаются по их влиянию на поддержание (а) структуры полипептидного скелета в области замены, например, в виде складчатой или спиральной конформации, (б) заряда или гидрофобности молекулы в сайте-мишени или (в) объема боковой цепи. Встречающиеся в природе аминокислотные остатки могут быть разделены на группы на основе свойств обычных боковых цепей:

- (1) Неполярные: Норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Полярные без заряда: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) Кислотные (отрицательно заряженные): Asp, Glu;
- (4) Основные (положительно заряженные): Lys, Arg;
- (5) Остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и
- (6) Ароматические: Trp, Tyr, Phe, His.

Неконсервативные замены осуществляют путем замены члена одного из этих классов на другой класс.

Любой остаток цистеина, не участвующий в поддержании правильной конформации антитела, может быть также заменен, как правило, на серин, для улучшения окислительной стабильности этой молекулы и предотвращения ошибочного перекрестного связывания. Наоборот, цистеиновая(ые) связь(и) могут быть добавлены в антитело для улучшения его стабильности, в частности, когда это антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как фрагмент Fv.

Аминокислотные модификации могут находиться в диапазоне от замены или модификации одной или более чем одной аминокислоты до полного изменения структуры области, такой как вариабельная область. Изменения в вариабельной области могут изменять аффинность и/или специфичность связывания. В некоторых воплощениях от не более чем одной до пяти консервативных аминокислотных замен осуществляют внутри домена CDR. В других воплощениях от не более чем одной до трех консервативных аминокислотных замен осуществляют внутри домена CDR. В других воплощениях домен CDR представляет собой VH CDR3 и/или VL CDR3.

Модификации также включают гликозилированные и негликозилированные полипептиды, а также полипептиды с другими посттрансляционными модификациями, такими как, например, гликозилирование отличающимися сахарами, ацетилирование и фосфорилирование. Антитела гликозилируются в консервативных положениях в их константных областях (Jefferis and Lund, *Chem. Immunol.* 65:111-128, 1997; Wright and Morrison, *TibTECH* 15:26-32, 1997). Олигосахаридные боковые цепи иммуноглобулинов влияют на функции белков (Boyd et al., *Mol. Immunol.* 32:1311-1318, 1996; Wittwe and Howard, *Biochem.* 29:4175-4180, 1990) и на внутримолекулярное взаимодействие между фрагментами гликопротеина, что может влиять на конформацию и презентируемую трехмерную поверхность гликопротеина (Jefferis and Lund, выше; Wyss and Wagner, *Current Opin. Biotech.* 7:409-416, 1996). Олигосахариды также могут служить для направления данного гликопротеина к определенным молекулам на основе специфических распознающих структур. Сообщалось о том, что гликозилирование антител влияет на антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). В частности, сообщалось о том, что клетки CHO с регулируемой тетрациклином экспрессией $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII), гликозилтрансферазой, катализирующей формирование разветвленных GlcNAc, обладают улучшенной активностью ADCC (Umana et al., *Mature Biotech.* 17:176-180, 1999).

Гликозилирование антител, как правило, является или N-связанным, или O-связанным. N-связанное относится к присоединению молекулы углевода к боковой цепи остатка аспарагина. Распознаваемыми последовательностями для ферментативного присоединения молекулы углевода к боковой цепи аспарагина являются трипептидные последовательности аспарагин-X-серин, аспарагин-X-треонин и аспарагин-X-цистеин, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением пролина. Таким образом, присутствие в полипептиде любой из этих трипептидных последовательностей создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров: N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикамину, чаще всего серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин.

Добавление сайтов гликозилирования к антителу удобно проводить посредством изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более чем одну из описанных выше трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования). Изменение также можно проводить путем добавления к последовательности исходного антитела одного или более чем одного остатка серина или треонина или замены в последовательности исходного антитела на один или более чем один остаток серина или треонина (для O-связанных сайтов гликозилирования).

Профиль гликозилирования антител также можно изменять без изменения лежащей в основе нуклеотидной последовательности. Гликозилирование в основном зависит от клетки-хозяина, используемой для экспрессии антитела. Поскольку тип клеток, используемых для экспрессии рекомбинантных гликопротеинов, например антител, в качестве потенциальных терапевтических средств крайне редко представляет собой природную клетку, можно ожидать значительных вариаций в профиле гликозилирования антител (смотри, например, Hse et al., J. Biol. Chem. 272:9062-9070, 1997).

Кроме выбора клеток-хозяев, факторы, влияющие на гликозилирование при рекомбинантной продукции антител, включают в себя способ роста, состав сред, плотность культуры, оксигенацию, pH, схемы очистки и т.п. Для изменения профиля гликозилирования, достигаемого в конкретном организме-хозяине, предложены различные способы, включая вставку или сверхэкспрессию определенных ферментов, вовлеченных в продукцию олигосахаридов (патенты США №№ 5047335; 5510261 и

5278299). Гликозилирование или определенные типы гликозилирования можно удалить из гликопротеина ферментативно, например, с применением эндогликозидазы H (Endo H), N-гликозидазы F, эндогликозидазы F1, эндогликозидазы F2, эндогликозидазы F3. Кроме того, рекомбинантную клетку-хозяина можно сконструировать генетически, сделав ее дефектной по процессингу определенных типов полисахаридов. Эти и похожие способы хорошо известны в области техники.

Другие способы модификации включают использование способов присоединения, известных в области техники, в том числе но без ограничения ферментативные способы, окислительное замещение и хелатообразование. Можно использовать модификации, например, для присоединения меток для иммунологического анализа. Модифицированные полипептиды получают, используя общепринятые в данной области техники способы, и их скрининг может быть осуществлен с помощью стандартных анализов, известных в области техники, некоторые из которых описаны ниже и в примерах.

В некоторых воплощениях изобретения, данное антитело содержит модифицированную константную область, такую как константная область, которая обладает увеличенной аффинностью в отношении человеческого Fc гамма рецептора, иммунологически инертную или частично инертную, например, которая не запускает комплемент-опосредованный лизис, не стимулирует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), или не активирует микроглию; или обладает сниженными активностями (по сравнению с не модифицированным антителом) в одном или более чем одном из следующих процессов: запуск комплемент-опосредованного лизиса, стимулирование антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) или активирование микроглии. Различные модификации константной области можно использовать для достижения оптимального уровня и/или комбинации эффекторных функций. Смотри, например, Morgan et al., *Immunology* 86:319-324, 1995; Lund et al., *J. Immunology* 157:4963-9 157:4963-4969, 1996; Idusogie et al., *J. Immunology* 164:4178-4184, 2000; Tao et al., *J. Immunology* 143: 2595-2601, 1989; и Jefferis et al., *Immunological Reviews* 163:59-76, 1998. В некоторых воплощениях константная область модифицирована, как описано в Eur. J. Immunol., 29:2613-2624, 1999; публикации заявки на патент PCT № PCT/GB99/01441; и/или заявке на патент Великобритании № 9809951.8. В других воплощениях константная область является дегликозилированной для N-связанного гликозилирования. В других воплощениях константная область является

дегликозилированной для N-связанного гликозилирования путем мутации гликозилируемого аминокислотного остатка или фланкирующих остатков, которые являются частью последовательности распознавания N-гликозилирования в данной константной области. Например, сайт N-гликозилирования N297 может быть мутирован в A, Q, K или H. См. Tao et al., *J. Immunology* 143: 2595-2601, 1989; и Jefferis et al., *Immunological Reviews* 163:59-76, 1998. В некоторых воплощениях данная константная область является дегликозилированной для N-связанного гликозилирования. Данная константная область может быть ферментативно дегликозилирована для N-связанного гликозилирования (такого, как удаление углевода с помощью фермента PNGазы) или путем экспрессии в клетке-хозяине с дефицитом гликозилирования.

Другие модификации антител включают антитела, которые модифицированы, как описано в публикации РСТ № WO99/58572. Эти антитела содержат дополнительно к связывающему домену, направленному против молекулы-мишени, эффекторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, по существу гомологичную всей константной области или фрагменту константной области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина. Эти антитела способны связываться с молекулой-мишенью без запуска существенного комплемент-зависимого лизиса или опосредованного клетками разрушения мишени. В некоторых воплощениях эффекторный домен способен специфически связываться с FcRn и/или FcγRIIb. Они как правило основаны на химерных доменах, полученных из двух или более чем двух доменах тяжелой цепи CH2 человеческого иммуноглобулина. Антитела, модифицированные таким образом, особенно подходят для применения в хронической терапии антителом для того, чтобы избежать воспалительных и других неблагоприятных реакций, характерных для обычной терапии антителами.

В некоторых воплощениях цепь Fc предложенного здесь антитела может быть модифицирована для того, чтобы устранять эффекторную функцию. Например, цепь Fc человеческого IgG1 может быть модифицирована для того, чтобы ввести мутации L234A, L235A и G237A с использованием стандартного направляемого праймерами мутагенеза путем ПЦР для устранения эффекторной функции вследствие связывания с FcγRIII, обеспечивая нулевой фенотип эффекторной функции (Canfield et al., *J. Exp. Med* (1991) 173: 1483-1491; Shields et al., *J. Biol. Chem.* (2001) 276:6591-604).

В некоторых воплощениях предложенное здесь биспецифическое антитело может быть сконструировано таким образом, что содержит по меньшей мере один цистеиновый

остаток, который может взаимодействовать с сопряженным цистеиновым остатком на другой полипептидной цепи в соответствии с изобретением с образованием межцепочечной дисульфидной связи. Межцепочечные дисульфидные связи могут служить для стабилизации биспецифического антитела, улучшая экспрессию и выделение в рекомбинантных системах, приводящих в результате к стабильной и устойчивой композиции, а также, улучшая стабильность выделенного и/или очищенного продукта *in vivo*. Цистеиновый остаток или остатки могут быть введены в виде единичной аминокислоты или как часть большей аминокислотной последовательности, например, шарнирной области в любом фрагменте полипептидной цепи. В конкретном аспекте по меньшей мере один цистеиновый остаток сконструирован таким образом, чтобы располагаться по С-концу полипептидной цепи.

Композиции, способы и наборы

В некоторых воплощениях изобретение охватывает композиции, включающие фармацевтические композиции, содержащие антитела в соответствии с изобретением, как здесь описано, или приготовленные при помощи способов и обладающие описанными здесь свойствами. Используемые здесь фармацевтические композиции могут содержать одно или более чем одно антитело, которое связывается с CD47, одно или более чем одно антитело, которое связывается с PD-L1, одно или более чем одно биспецифическое антитело, которое связывается с CD47 и PD-L1, и/или один или более чем один полинуклеотид, содержащий последовательности, кодирующие одно или более чем одно из этих антител. Эти композиции дополнительно могут содержать подходящие эксципиенты, такие как фармацевтически приемлемые эксципиенты, включающие буферы, которые хорошо известны в области техники.

Приведенное здесь изобретение дополнительно охватывает способы и композиции для лечения, предупреждения или лечения рака у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества предложенных здесь антител против CD47, антител против PD-L1 или биспецифических антител против CD47/PD-L1. Антитело против CD47, антитело против PD-L1 и биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 могут быть особенно полезны для предупреждения, ингибирования, уменьшения роста и/или регресса первичных опухолей и метастаза раковых клеток.

В одном из аспектов изобретения предложен способ лечения состояния, связанного с экспрессией CD47 и/или PD-L1 у субъекта. В некоторых воплощениях

способ лечения состояния, связанного с экспрессией CD47 и/или PD-L1 у субъекта, включает введение субъекту, нуждающемуся в таком введении, эффективного количества композиции (например, фармацевтической композиции), содержащей соответствующие описанные здесь антитела против CD47, антитела против PD-L1 или биспецифические антитела против CD47/PD-L1. Состояния, связанные с экспрессией CD47 и/или PD-L1, включают без ограничения аномальную экспрессию CD47 и/или PD-L1, измененную или нарушенную экспрессию CD47 и/или PD-L1, злокачественные клетки, экспрессирующие CD47 и/или PD-L1, и пролиферативное расстройство (например, рак). В конкретных воплощениях рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, светлоклеточный рак почки, плоскоклеточную карциному головы/шеи [плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN)], плоскоклеточную карциному легкого, легочную аденокарциному, злокачественную меланому, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого (SCLC), трижды негативный рак молочной железы, уротелиальный рак, острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоцитарный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелоидный лейкоз (CML), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), фолликулярную лимфому, Ходжкинскую лимфому (HL), лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), множественную миелому (MM), белок-1 клетки миелолейкоза (Mcl-1), миелодиспластический синдром (MDS), неходжкинскую лимфому (NHL), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), рак эндометрия, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, колоректальный рак, глиобластома, рак матки, рак шейки матки, рак полового члена или немеланомный рак кожи.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложено описанное здесь антитело против CD47, антитело против PD-L1 и/или биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, или фармацевтическая композиция, содержащая такое антитело, для применения в терапии. В конкретном воплощении изобретения также предложено антитело против CD47, антитело против PD-L1 и/или биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 для применения в лечении расстройства, связанного с CD47 и/или PD-L1. В конкретных воплощениях расстройство, связанное с CD47 и/или PD-L1, представляет собой определенный здесь рак.

В настоящем изобретении дополнительно предложено описанное здесь антитело против CD47, антитело против PD-L1 и/или биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, или фармацевтическая композиция, содержащая такое антитело, для применения при приготовлении лекарственного средства для применения в терапии. В некоторых воплощениях эта терапия представляет собой лечение расстройства, ассоциирующегося с CD47 и/или PD-L1. В конкретных воплощениях расстройство, ассоциирующееся с CD47 и/или PD-L1, представляет собой рак.

В конкретном аспекте предложенное здесь антитело против CD47, антитело против PD-L1 и/или биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 ингибирует или уменьшает рост раковых клеток по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 20% или по меньшей мере на 10% относительно роста раковых клеток в отсутствие антитела или биспецифического антитела.

В конкретном аспекте предложенное здесь антитело против CD47, антитело против PD-L1 и/или биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 уничтожает клетки или ингибирует или уменьшает рост раковых клеток по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 100% лучше, чем в отсутствие антитела или биспецифического антитела.

В некоторых воплощениях описанные здесь способы и применения дополнительно включают стадию лечения субъекта при помощи дополнительной формы терапии. В некоторых воплощениях дополнительная форма терапии представляет собой дополнительную противораковую терапию, включающую без ограничения химиотерапию, лучевую терапию, хирургическую, гормональную терапию и/или дополнительную иммунотерапию.

Изобретение дополнительно охватывает введение молекул в соответствии с изобретением в комбинации с другими способами терапии, известными специалистам в

данной области техники для лечения или предупреждения рака, включающими без ограничения существующие в настоящее время и экспериментальные способы химиотерапии, способы биологической терапии, способы иммунотерапии, способы лучевой терапии или хирургические способы. В некоторых аспектах молекулы в соответствии с изобретением могут быть введены в комбинации с терапевтически или профилактически эффективным количеством одного или более чем одного агента, терапевтических антител или других агентов, известных специалистам в данной области техники для лечения и/или предупреждения рака.

Соответственно, способы и применения для лечения рака включают введение субъекту, нуждающемуся в таком введении, эффективного количества антитела или биспецифического антитела в соответствии с настоящим изобретением в комбинации с химиотерапевтическим агентом. Такое комбинированное лечение может быть осуществлено отдельно, последовательно или одновременно. Подходящие химиотерапевтические агенты включают без ограничения по меньшей мере один дополнительный агент, такой как бевацизумаб, цетуксимаб, сиролимус, панитумумаб, 5-фторурацил (5-FU), капецитабин, тивозаниб, иринотекан, оксалиплатин, цисплатин, трифлуридин, типирацил, лейковорин, гемцитабин и/или эрлотиниба хлоргидрат.

Предложенные здесь количества доз и частоты введения охвачены терминами терапевтически эффективное и профилактически эффективное. Доза и частота дополнительно могут варьировать в зависимости от факторов, специфических для каждого пациента в зависимости от конкретных вводимых терапевтических или профилактических агентов, тяжести и типа рака, пути введения, а также возраста, массы тела, ответа и предшествующего анамнеза пациента. Подходящие схемы введения могут быть выбраны специалистом в данной области техники путем рассмотрения таких факторов и в соответствии, например, с дозами, приведенными в литературе и рекомендованными в Physician's Desk Reference (56th ed., 2002).

Антитела или биспецифические антитела в соответствии с настоящим изобретением могут находиться в форме фармацевтической композиции для введения, которая приготовлена таким образом, что подходит для выбранного способа введения, и фармацевтически приемлемый разбавитель или эксципиенты, такие как буферы, поверхностно-активные вещества, консерванты, солюбилизирующие агенты, агенты, придающие изотоничность, стабилизирующие агенты, носители и т.п. В Remington's

Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton Pa., 18th ed., 1995, приведено краткое изложение способов изготовления, в общем известных для практических специалистов.

Эти фармацевтические композиции могут быть введены при помощи любого из средств, известных в области техники, которые позволяют достичь глобально предполагаемую задачу лечения рака. Путь введения может быть парентеральным, определенным здесь как относящийся к способам введения, которые включают без ограничения чреспищеводную, внутриопухолевую, трансколоноскопическую, чрескожную, внутривенную, внутримышечную, внутрибрюшинную, подкожную и внутрисуставную инъекцию и инфузию. Способ введения и дозы молекул в соответствии с изобретением (например, антител против CD47, антител против PD-L1, биспецифических антител против CD47/PD-L1, родственных фармацевтических композиций) зависят от типа заболевания, с которым борются, когда возможно, его стадии, антигена, подлежащего контролю, вида одновременного лечения, если такое осуществляется, частоты введения, природы желаемого эффекта и также массы тела, возраста, здоровья, диеты и пола пациента. Таким образом, реально используемая схема введения доз может широко варьировать и, таким образом, может отличаться от изложенных здесь схем введения доз.

Для введения могут быть использованы различные композиции антител в соответствии с настоящим изобретением (например, антитела против CD47, антитела против PD-L1, биспецифические антитела против CD47/PD-L1). В некоторых воплощениях антитела могут быть введены чистыми. В некоторых воплощениях антитело и фармацевтически приемлемый эксципиент могут находиться в различных композициях. Фармацевтически приемлемые эксципиенты известны в области техники, и представляют собой относительно инертные вещества, которые облегчают введение фармакологически эффективного вещества. Например, эксципиент может придавать форму или консистенцию, или действует в качестве разбавителя. Подходящие эксципиенты включают без ограничения стабилизирующие агенты, увлажнители и эмульгаторы, соли для изменения осмолярности, инкапсулирующие агенты, буферы и агенты, увеличивающие проницаемость кожи. Эксципиенты, а также композиции для парентеральной и не парентеральной доставки лекарственного средства изложены в Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21st Ed. Mack Publishing, 2005.

В некоторых воплощениях эти агенты приготовлены для введения путем инъекции (например, внутрибрюшинной, внутривенной, подкожной, внутримышечной

и т.п.). Соответственно, эти агенты могут быть комбинированы с фармацевтически приемлемыми разбавителями, такими как физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и т.п. Конкретная схема введения доз, т.е. доза, время и повторность введений будет зависеть от конкретного индивида и его анамнеза.

Описанные здесь антитела (например, антитела против CD47, антитела против PD-L1, биспецифические антитела против CD47/PD-L1) могут быть введены с использованием любого подходящего способа, включающего введение путем инъекции (например, внутривенной, внутримышечной, подкожной, интратекальной и т.п.). Антитело, например, моноклональное антитело или биспецифическое антитело, также может быть введено путем ингаляции, как здесь описано. Как правило, для введения антитела в соответствии с настоящим изобретением доза зависит от хозяина, которого лечат, и конкретного способа введения. В одном из воплощений диапазон доз антитела в соответствии с настоящим изобретением составляет от приблизительно 0,001 мкг/кг массы тела до приблизительно 20000 мкг/кг массы тела. Термин «масса тела» применим при лечении пациента. Когда обрабатывают выделенные клетки, тогда использованный здесь термин «масса» относится к «общей массе клеток». Термин «общая масса» может быть использован для применения как в отношении выделенной клетки, так и лечения пациента. Предполагается, что все концентрации и уровни обработки, выраженные относительно «массы» или просто «кг» в данной заявке на изобретение, также охватывают аналогичные концентрации относительно «общей клеточной массы» и «общей массы тела». Тем не менее, специалисту в данной области техники понятна приемлемость различных диапазонов доз, например, от 0,01 мкг/кг массы тела до 20000 мкг/кг массы тела, от 0,02 мкг/кг массы тела до 15000 мкг/кг массы тела, от 0,03 мкг/кг массы тела до 10000 мкг/кг массы тела, от 0,04 мкг/кг массы тела до 5000 мкг/кг массы тела, от 0,05 мкг/кг массы тела до 2500 мкг/кг массы тела, от 0,06 мкг/кг массы тела до 1000 мкг/кг массы тела, от 0,07 мкг/кг массы тела до 500 мкг/кг массы тела, от 0,08 мкг/кг массы тела до 400 мкг/кг массы тела, от 0,09 мкг/кг массы тела до 200 мкг/кг массы тела или от 0,1 мкг/кг массы тела до 100 мкг/кг массы тела. Дополнительно, специалисту в данной области техники понятно, что применяются различные уровни доз, например, 0,0001 мкг/кг, 0,0002 мкг/кг, 0,0003 мкг/кг, 0,0004 мкг/кг, 0,005 мкг/кг, 0,0007 мкг/кг, 0,001 мкг/кг, 0,1 мкг/кг, 1,0 мкг/кг, 1,5 мкг/кг, 2,0 мкг/кг, 5,0 мкг/кг, 10,0 мкг/кг, 15,0 мкг/кг, 30,0 мкг/кг, 50 мкг/кг, 75 мкг/кг, 80 мкг/кг, 90 мкг/кг, 100 мкг/кг, 120 мкг/кг, 140 мкг/кг, 150 мкг/кг, 160 мкг/кг, 180 мкг/кг, 200 мкг/кг, 225 мкг/кг, 250 мкг/кг, 275 мкг/кг,

300 мкг/кг, 325 мкг/кг, 350 мкг/кг, 375 мкг/кг, 400 мкг/кг, 450 мкг/кг, 500 мкг/кг, 550 мкг/кг, 600 мкг/кг, 700 мкг/кг, 750 мкг/кг, 800 мкг/кг, 900 мкг/кг, 1 мкг/кг, 5 мкг/кг, 10 мкг/кг, 12 мкг/кг, 15 мг/кг, 20 мг/кг и/или 30 мг/кг. Все эти дозы приведены в качестве примера, и предполагается, что любая доза между этими значениями также применима в изобретении. Любой из вышеприведенных диапазонов доз или уровней доз может быть использован для антитела в соответствии с настоящим изобретением. Для повторных введений в течение только нескольких суток или более, в зависимости от состояния, лечение продолжают до проявления желаемого подавления симптомов или до достижения достаточных терапевтических уровней, например, для подавления или задержки роста/прогресса опухоли или метастаза раковых клеток.

В целом применительно для введения предложенных здесь антител предполагаемую дозу можно вводить ежедневно, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в пять недель, один раз в шесть недель, один раз в семь недель, один раз в восемь недель, один раз в десять недель, один раз в двенадцать недель или более чем один раз в двенадцать недель.

В некоторых воплощениях предполагаемую дозу вводят один раз в сутки, и доза находится в любом диапазоне от приблизительно 1 мкг/кг до 30 мкг/кг, до 300 мкг/кг, до 3 мг/кг, до 30 мг/кг, до 100 мг/кг или более в зависимости от упомянутых выше факторов. Например, может быть использована суточная доза приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,03 мг/кг, приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2,5 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг и приблизительно 25 мг/кг.

В некоторых воплощениях предполагаемую дозу вводят один раз в неделю, и доза находится в любом диапазоне от приблизительно 1 мкг/кг до 30 мкг/кг, до 300 мкг/кг, до 3 мг/кг, до 30 мг/кг, до 100 мг/кг или более в зависимости от упомянутых выше факторов. Например, может быть использована еженедельная доза приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,03 мг/кг, приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2,5 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг и приблизительно 30 мг/кг.

В некоторых воплощениях предполагаемую дозу вводят один раз в две недели, и доза находится в любом диапазоне от приблизительно 1 мкг/кг до 30 мкг/кг, до 300

мкг/кг, до 3 мг/кг, до 30 мг/кг, до 100 мг/кг или более в зависимости от упомянутых выше факторов. Например, может быть использована двухнедельная доза приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2,5 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг и приблизительно 30 мг/кг.

В некоторых воплощениях предполагаемую дозу вводят один раз в три недели, и доза находится в любом диапазоне от приблизительно 1 мкг/кг до 30 мкг/кг, до 300 мкг/кг, до 3 мг/кг, до 30 мг/кг, до 100 мг/кг или более в зависимости от упомянутых выше факторов. Например, может быть использована трехнедельная доза приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2,5 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 35 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг, приблизительно 45 мг/кг и приблизительно 50 мг/кг.

В некоторых воплощениях предполагаемую дозу вводят один раз в месяц или один раз в четыре недели, и доза находится в любом диапазоне от приблизительно 1 мкг/кг до 30 мкг/кг, до 300 мкг/кг, до 3 мг/кг, до 30 мг/кг, до 100 мг/кг или более в зависимости от упомянутых выше факторов. Например, может быть использована месячная доза приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2,5 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 35 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг, приблизительно 45 мг/кг и приблизительно 50 мг/кг.

В других воплощениях предполагаемую дозу вводят ежедневно, и доза находится в диапазоне от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 1200 мг или более в зависимости от упомянутых выше факторов. Например, может быть использована суточная доза приблизительно 0,01 мг, приблизительно 0,1 мг, приблизительно 1 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 200 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 700 мг, приблизительно 800 мг, приблизительно 900 мг, приблизительно 1000 мг, приблизительно 1100 мг или приблизительно 1200 мг.

В других воплощениях предполагаемую дозу вводят один раз в неделю, и доза находится в диапазоне от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 2000 мг или более

в зависимости от упомянутых выше факторов. Например, может быть использована еженедельная доза приблизительно 0,01 мг, приблизительно 0,1 мг, приблизительно 1 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 200 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 700 мг, приблизительно 800 мг, приблизительно 900 мг, приблизительно 1000 мг, приблизительно 1100 мг, приблизительно 1200 мг, приблизительно 1300 мг, приблизительно 1400 мг, приблизительно 1500 мг, приблизительно 1600 мг, приблизительно 1700 мг, приблизительно 1800 мг, приблизительно 1900 мг или приблизительно 2000 мг.

В других воплощениях предполагаемую дозу вводят один раз в две недели, и доза находится в диапазоне от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 2000 мг или более в зависимости от упомянутых выше факторов. Например, может быть использована двухнедельная доза приблизительно 0,01 мг, приблизительно 0,1 мг, приблизительно 1 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 200 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 700 мг, приблизительно 800 мг, приблизительно 900 мг, приблизительно 1000 мг, приблизительно 1100 мг, приблизительно 1200 мг, приблизительно 1300 мг, приблизительно 1400 мг, приблизительно 1500 мг, приблизительно 1600 мг, приблизительно 1700 мг, приблизительно 1800 мг, приблизительно 1900 мг или приблизительно 2000 мг.

В других воплощениях предполагаемую дозу вводят один раз в три недели, и доза находится в диапазоне от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 2500 мг или более в зависимости от упомянутых выше факторов. Например, может быть использована трехнедельная доза приблизительно 0,01 мг, приблизительно 0,1 мг, приблизительно 1 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 200 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 700 мг, приблизительно 800 мг, приблизительно 900 мг, приблизительно 1000 мг, приблизительно 1100 мг, приблизительно 1200 мг, приблизительно 1300 мг, приблизительно 1400 мг, приблизительно 1500 мг, приблизительно 1600 мг, приблизительно 1700 мг, приблизительно 1800 мг, приблизительно 1900 мг, приблизительно 2000 мг, приблизительно 2100 мг, приблизительно 2200 мг, приблизительно 2300 мг, приблизительно 2400 мг или приблизительно 2500 мг.

В других воплощениях предполагаемую дозу вводят один раз в четыре недели или месяц, и доза находится в диапазоне от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 3000 мг или более в зависимости от упомянутых выше факторов. Например, может быть использована месячная доза приблизительно 0,01 мг, приблизительно 0,1 мг, приблизительно 1 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 200 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 700 мг, приблизительно 800 мг, приблизительно 900 мг, приблизительно 1000 мг, приблизительно 1100 мг, приблизительно 1200 мг, приблизительно 1300 мг, приблизительно 1400 мг, приблизительно 1500 мг, приблизительно 1600 мг, приблизительно 1700 мг, приблизительно 1800 мг, приблизительно 1900 мг, приблизительно 2000 мг, приблизительно 2100 мг, приблизительно 2200 мг, приблизительно 2300 мг, приблизительно 2400 мг, приблизительно 2500, приблизительно 2600 мг, приблизительно 2700 мг, приблизительно 2800 мг, приблизительно 2900 мг или приблизительно 3000 мг.

Также могут быть полезны другие схемы введения доз в зависимости от фармакокинетического профиля, которого желает достичь практикующий специалист. В одном из воплощений антитело в соответствии с настоящим изобретением вводят в исходной усиленной дозе с последующей более высокой и/или непрерывной, по существу постоянной дозой. В некоторых воплощениях рассматривается введение доз от одного до четырех раз в неделю. В других воплощениях рассматривается введение дозы один раз в месяц или один раз в два месяца, или один раз в три месяца. Прогресс этого лечения легко отслеживать при помощи обычных способов и анализов. Схема введения доз может варьировать с течением времени.

Для задачи в соответствии с настоящим изобретением подходящая доза антитела (например, антител против CD47, антител против PD-L1, биспецифических антител против CD47/PD-L1) будет зависеть от используемого антитела или его композиции, типа и тяжести симптомов, которые лечат, в зависимости от того, вводят ли агент для терапевтических задач, предшествующей терапии, клинического анамнеза пациента и ответа на агент, скорости выведения у пациента введенного агента и усмотрения лечащего врача. Как правило, лечащий специалист вводит антитело до достижения дозы, которая позволяет достичь желаемый результат. Доза и/или частота может варьировать в курсе лечения. Эмпирические факторы, такие как период полувыведения из сыворотки

крови, как правило вносят вклад в определение дозы. Например, антитела, которые являются совместимыми с иммунной системой человека, такие как гуманизированные антитела или полностью человеческие антитела, могут быть использованы для удлинения периода полувыведения из сыворотки крови антитела и для предупреждения атаки на антитело со стороны иммунной системы хозяина. Частота введения может быть определена и скорректирована в курсе лечения, и, как правило, но не обязательно, основана на лечении и/или подавлении, и/или уменьшении интенсивности, и/или замедлении появления симптомов, например, ингибирование или замедление опухолевого роста и т.п. Альтернативно, могут быть подходящими композиции для непрерывного длительного высвобождения антитела. Различные композиции и устройства для достижения непрерывного высвобождения известны в области техники.

В одном из воплощений дозы антитела (например, антител против CD47, антител против PD-L1, биспецифических антител против CD47/PD-L1) могут быть определены эмпирически у индивидов, которым осуществляют одно или более чем одно введение антитела. Индивидам вводят увеличивающиеся дозы антитела. Для оценки эффективности можно отслеживать показатель заболевания.

В некоторых воплощениях предложенное здесь антитело (например, антитела против CD47, антитела против PD-L1, биспецифические антитела против CD47/PD-L1) могут быть введены субъекту, который ранее получал терапевтические антитела против PD-1 или против PD-L1 для лечения заболевания (например, рака). В некоторых воплощениях предложенное здесь антитело может быть введено субъекту, который ранее получал терапевтические антитела против PD-1 или против PD-L1 для лечения заболевания, и в отношении которого ранее вводимые терапевтические антитела против PD-1 или против PD-L1 обладают ограниченной эффективностью или не обладают эффективностью в отношении субъекта (например, у которого заболевание устойчиво к лечению терапевтическими антителами против PD-1 или против PD-L1 в соответствии с предшествующим образом техники).

В некоторых воплощениях предложенное здесь антитело (например, антитела против CD47, антитела против PD-L1, биспецифические антитела против CD47/PD-L1) могут быть введены субъекту, который страдает от рака с положительными в отношении экспрессии PD-L1 тестами. В некоторых воплощениях предложенное здесь антитело может быть введено субъекту, который страдает от рака, при котором тесты являются отрицательными в отношении экспрессии PD-L1.

Использованная здесь «экспрессия PD-L1» относится к любому обнаруживаемому уровню экспрессии белка PD-L1 на клеточной поверхности или мРНК PD-L1 в клетке или ткани. Экспрессия белка PD-L1 может быть обнаружена при помощи диагностического антитела против PD-L1 в иммуногистохимическом (ИHC) анализе среза опухолевой ткани или при помощи проточной цитометрии. Экспрессия PD-L1 клетками также может быть обнаружена путем визуализации при помощи PET (позитронно-эмиссионной томографии) с использованием связывающего агента (например, антитела), который специфически связывается с PD-L1. Способы обнаружения и измерения экспрессии мРНК PD-L1 включают, например, RT-PCR (полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией) и количественную RT-PCR в режиме реального времени.

Несколько подходов описаны для количественного измерения экспрессии PD-L1 в ИHC (иммуногистохимических) анализах срезов опухолевой ткани. Смотри, например, Thompson, R. H., et al., PNAS 101 (49): 17174-17179 (2004); Thompson, R. H. et al., Cancer Res. 66:3381-3385 (2006); Gadiot, J., et al., Cancer 117:2192-2201 (2011); Taube, J. M. et al., Sci Transl Med 4, 127ra37 (2012); и Toplian, S. L. et al., New Eng. JAed 366 (26): 2443-2454 (2012).

В одном из подходов используется простая бинарная конечная точка положительной или отрицательной экспрессии PD-L1, причем положительный результат определяется процентной долей опухолевых клеток, которые демонстрируют гистологическое доказательство окрашивания мембраны клеточной поверхности. Срез опухолевой ткани может определяться как положительный в отношении экспрессии PD-L1, если определенная процентная доля опухолевых клеток положительна в отношении экспрессии PD-L1. Например, срез опухолевой ткани может быть определен как положительный в отношении экспрессии PD-L1, если по меньшей мере 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 75%, 90% или 95% опухолевых клеток являются положительными в отношении экспрессии PD-L1.

В еще одном подходе экспрессия PD-L1 на срезе опухолевой ткани количественно определяется в опухолевых клетках, а также в инфильтрирующих опухоль иммунных клетках, которые преимущественно содержат лимфоциты. Процентная доля опухолевых клеток и инфильтрирующих опухоль иммунных клеток, которые демонстрируют окрашивание мембраны, могут быть количественно определены по отдельности, как менее 5%, от 5 до 9%, и затем с 10% увеличением до 100%. Для опухолевых клеток

экспрессия PD-L1 может быть определена как отрицательная, если оценка составляет менее, например, 1%, 2, или 5%, и положительная, если оценка более 1%, 2, или 5%, соответственно. Экспрессия PD-L1 в инфильтрирующих опухоль иммунных клетках может быть представлена как полуколичественное измерение, называемое скорректированной оценкой воспаления (AIS), которая определяется путем умножения процентной доли клеток с окрашенной мембраной на интенсивность инфильтрации, которая ранжируется как отсутствие (0), слабая (оценка 1, редкие лимфоциты), умеренная (оценка 2, фокальная инфильтрация опухоли лимфогистиоцитарными агрегатами) или тяжелая (оценка 3, диффузная инфильтрация). Срез опухолевой ткани может быть определен как положительный в отношении экспрессии PD-L1 инфильтрирующими опухоль иммунными клетками, если AIS более 5.

Уровень экспрессии мРНК PD-L1 может быть сравнен с уровнями экспрессии мРНК одного или более чем одного референсного гена, который часто используется в количественной RT-PCR, такого как убиквитин С.

В некоторых воплощениях уровень экспрессии PD-L1 (белка и/или мРНК) опухолевыми клетками и/или инфильтрирующими опухоль иммунными клетками в опухоли определен на уровне «сверхэкспрессии» или «увеличенной» на основе сравнения уровня экспрессии PD-L1 (белка и/или мРНК) с соответствующим контролем. Например, уровень экспрессии контрольного белка PD-L1 или мРНК может представлять собой уровень, количественно определенный в незлокачественных клетках того же самого типа, или на срезе подходящей нормальной ткани. В некоторых воплощениях определенная в опухолевом образце экспрессия PD-L1 увеличена в том случае, если белок PD-L1 белок (и/или мРНК PD-L1) в образце по меньшей мере на 10%, 20% или 30% больше чем в контроле.

В некоторых воплощениях экспрессию PD-L1 при раке обнаруживают с использованием диагностических антител против PD-L1, в иммуногистохимическом (ИНС) анализе на тканевом срезе опухолевого образца, взятого у пациента. Как правило, образец опухоли тестируют для определения экспрессии PD-L1 перед обработкой предложенным здесь антителом, но его также тестируют после начала лечения.

Конкретные примеры диагностических mAb против человеческого PD-L1, полезных в качестве диагностических mAb для ИНС обнаружения экспрессии PD-L1 в срезах опухолевой ткани представляет собой антитело 20C3 и антитело 22C3, которые

описаны в WO2014/100079. Примеры ИHC тестов в отношении PD-L1 включают анализ PD-L1 ИHC 22C3 PharmDx (Daco) и Ventana PD-L1 SP263.

В некоторых воплощениях введение антитела (например, антител против CD47, антител против PD-L1, биспецифических антител против CD47/PD-L1) приводит по меньшей мере к одному эффекту, выбранному из группы, состоящей из ингибирования опухолевого роста, регрессии опухоли, уменьшения размера опухоли, уменьшения количества опухолевых клеток, замедления опухолевого роста, абскопального эффекта, ингибирования опухолевого метастаза, уменьшения метастатических повреждений со временем, уменьшенного применения химиотерапевтических или цитотоксических агентов, уменьшения опухолевой массы, увеличения продолжительности жизни без прогрессирования опухоли, увеличения общего уровня выживаемости, полного ответа, частичного ответа и стабильного заболевания.

Введение антитела (например, антител против CD47, антител против PD-L1, биспецифических антител против CD47/PD-L1) в соответствии со способом настоящего изобретения может быть непрерывным или прерывистым, в зависимости от, например, физиологического состояния пациента, в зависимости от того, является ли цель введения терапевтической или профилактической, и других факторов, известных практикующим врачам. Введение антитела может быть по существу непрерывным в течение предварительно выбранного периода времени или может быть осуществлено в сериях разделенных доз.

Терапевтические препараты антитела (например, антител против CD47, антител против PD-L1, биспецифических антител против CD47/PD-L1), используемые в соответствии с данным изобретением, готовят для хранения путем смешивания антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с возможными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington, The Science и Practice of Pharmacy 21st Ed. Mack Publishing, 2005), в форме лиофилизированных композиций или водных растворов. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях, и включают в себя буферы, например фосфатный, цитратный, и содержащий другие органические кислоты; соли, такие как хлорид натрия; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты, такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин;

резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включающую глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота); сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEENTM, PLURONICSTM или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В некоторых воплощениях предложенное здесь антитело против CD47, антитело против PD-L1 или биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 может быть введено в комбинации с введением одного или более чем одного дополнительного терапевтического агента. Возможно, что дополнительный терапевтический агент может включать дополнительный противоопухолевый агент. Это включает, без ограничения введение биотерапевтического агента и/или химиотерапевтического агента, такого как без ограничения вакцина, основанная на CAR-T клеточная терапия, радиотерапия, цитокиновая терапия, биспецифическое антитело против CD3, ингибитор других иммуносупрессивных путей, ингибитор ангиогенеза, Т-клеточный активатор, ингибитор метаболического пути, ингибитор mTOR, ингибитор аденозинового пути, тирозинкиназный ингибитор, включающий без ограничения Inlyta, ингибиторы ALK и сунитиниб, ингибитор BRAF, эпигенетический модификатор, ингибитор IDO1, ингибитор JAK, ингибитор STAT, циклин-зависимый киназный ингибитор, биотерапевтический агент (включающий без ограничения антитела против VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), VEGFR (рецептор фактора роста эндотелия сосудов), EGFR (рецептор эпидермального фактора роста), Her2/neu, другие рецепторы факторов роста CD40, CD-40L, CTLA-4, OX-40, 4-1BB, TIGIT и ICOS), иммуногенный агент (например, ослабленные раковые клетки, опухолевые антигены, антигенпрезентирующие клетки, такие как дендритные клетки, стимулированные опухолевым антигеном или нуклеиновыми кислотами, иммуностимулирующие цитокины (например, IL-2, IFN α 2 (интерферон альфа 2), GM-CSF (колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов)), и клетки,

трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины, такие как без ограничения GM-CSF).

Примеры биотерапевтических агентов включают терапевтические антитела, иммуномодулирующие агенты и терапевтические иммунные клетки.

Терапевтический антитела могут обладать специфичностью против различных антигенов. Например, терапевтические антитела могут быть направлены против опухолеассоциированного антигена, такого, что связывание антитела с антигеном способствует гибели клеток, экспрессирующих антиген. В другом примере терапевтические антитела могут быть направлены против антигена (например PD-1) на иммунной клетке, таким образом, что связывание антитела препятствует понижающей регуляции активности клетки, экспрессирующей антиген (и, таким образом, способствует активности клетки, экспрессирующей антиген). В некоторых ситуациях терапевтическое антитело может действовать путем множества отличающихся механизмов (например, они могут как 1) способствовать гибели клетки, экспрессирующей антиген, так и 2) предупреждать вызванную антигеном понижающую регуляцию активности иммунных клеток в контакте с клеткой, экспрессирующей антиген).

Терапевтические антитела могут быть направлены против, например, следующих антигенов. Для некоторых антигенов примеры антител, направленных против антигена, также включены ниже (в квадратных/круглых скобках после антигена). Следующие антигены также могут быть названы здесь как «антигены-мишени» и т.п. Антигены-мишени для терапевтических антител здесь включают, например: 4-1BB (например, утомилумаб); 5T4; A33; альфа-фолатный рецептор 1 (например, мирветуксимаб соравтанзин); Alk-1; BCMA [например, PF-06863135 (смотри US9969809)]; BTN1A1 (например, смотри WO2018222689); CA-125 (например, абаговомаб); карбоангидраза IX; CCR2; CCR4 (например, могамулизумаб); CCR5 (например, леронлимаб); CCR8; CD3 [например, блинатумомаб (биспецифическое антитело против CD3/CD19), PF-06671008 (биспецифическое антитело против CD3/P-кадгерина), PF-06863135 (биспецифическое антитело против CD3/BCMA), CD19 (например, блинатумомаб, MOR208); CD20 (например, ибритумомаб тиуксетан, обинутузумаб, офатумумаб, ритуксимаб, ублитуксимаб); CD22 (инотузумаб озогамидин, моксетумомаб пасудотокс); CD25; CD28; CD30 (например, брентуксимаб ведотин); CD33 (например гемтузумаб озогамидин); CD38 (например, даратумумаб, изатуксимаб), CD40; CD-40L; CD44v6;

CD47; CD52 (например, алемтузумаб); CD63; CD79 (например, полатузумаб ведотин); CD80; CD123; CD276/B7-H3 (например, омбуртамаб); CDH17; CEA; ClhCG; CTLA-4 (например, ипилимумаб, тремелиумаб); CXCR4; десмоглеин 4; DLL3 (например, ровалпитузумаб теzipин); DLL4; E-кадгерин; EDA; EDB; EFNA4; EGFR (например, цетуксимаб, депатуксизумаб мафодотин, нецитумумаб, панитумумаб); EGFRvIII; эндосиалин; EpCAM (например, опортузумаб монатокс); FAP; фетальный ацетилхолиновый рецептор; FLT3 (например, смотри WO2018/220584); GD2 (например, динутуксимаб, 3F8); GD3; GITR; GloboH; GM1; GM2; GUCY2C (например, PF-07062119); HER2/neu [например, маргетуксимаб, пертузумаб, трастузумаб; адо-трастузумаб эмтанзин, трастузумаб дуокармазин, PF-06804103 (смотри US8828401)]; HER3; HER4; ICOS; IL-10; ITG-AvB6; LAG-3 (например, релатлимаб); Lewis-Y; LG; Ly-6; M-CSF [например, PD-0360324 (смотри US7326414)]; MCSP; мезотелин; MUC1; MUC2; MUC3; MUC4; MUC5AC; MUC5B; MUC7; MUC16; Notch1; Notch3; нектин-4 (например, энфортумаб ведотин); OX40 [например, PF-04518600 (смотри US7960515)]; P-кадгерин [например, PF-06671008 (смотри WO2016/001810)]; PCDHB2; PD-1 [например, BCD-100, камрелизумаб, цемиплимаб, генолимзумаб (CBT-501), MEDI0680, ниволумаб, пембролизумаб, RN888 (смотри WO2016/092419), синтилимаб, спартализумаб, STI-A1110, тизлелизумаб, TSR-042]; PD-L1 (например, атезолизумаб, дурвалумаб, BMS-936559 (MDX-1105) или LY3300054); PDGFRA (например, оларатумаб); антиген плазматической клетки; PolySA; PSCA; PSMA; PTK7 [например, PF-06647020 (смотри US9409995)]; Ror1; SAS; SCRх6; SLAMF7 (например, элотузумаб); SHH; SIRPa (например, ED9, Effi-DEM); STEAP; TGF-бета; TIGIT; TIM-3; TMPRSS3; предшественник TNF-альфа; TROP-2 (например, сацитузумаб говитекан); TSPAN8; VEGF (например, бевацизумаб, бролуцизумаб); VEGFR1 (например, ранибизумаб); VEGFR2 (например, рамуцизумаб, ранибизумаб); Wue-1.

Терапевтический антитела, вводимые в комбинации с предложенными здесь антителами, могут иметь любой подходящий формат. Например, терапевтические антитела могут иметь любой описанный здесь формат. В некоторых воплощениях терапевтическое антитело может представлять собой голое антитело. В некоторых воплощениях терапевтическое антитело может быть связано с лекарственным средством или другим агентом (также известным как «конъюгат антитело-лекарственное средство» (ADC)). В некоторых воплощениях терапевтическое антитело против конкретного

антигена может быть включено в мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело).

В некоторых воплощениях предложенное здесь антитело против CD47, антитело против PD-L1 или биспецифическое антитело CD47/PD-L1 могут быть введены в комбинации с агонистами паттерн-распознающих рецепторов (PRR), иммуностимулирующими цитокинами и противораковыми вакцинами. Существует множество классов молекул PRR, включающих toll-подобные рецепторы (TLR), RIG-I-подобные рецепторы (RLR), рецепторы, подобные нуклеотидсвязывающему домену олигомеризации (NOD) (NLR), рецепторы лектина C-типа (CLR) и белок стимулятора генов интерферона (STING). Другие PRR включают, например, ДНК-зависимый активатор регуляторных факторов IFN (DAI) и белок Absent in Melanoma 2 (AIM2).

В некоторых воплощениях предложенные здесь антитело против CD47, антитело против PD-L1 или биспецифическое антитело CD47/PD-L1 могут быть введены в комбинации с молекулой, которая активирует один или более чем один TLR, также называемый здесь как «агонисты TLR». Агонисты TLR могут включать, например, небольшие молекулы (например органическую молекулу, имеющую молекулярную массу менее приблизительно 1000 Дальтон), а также крупные молекулы (например олигонуклеотиды и белки). Некоторые агонисты TLR являются специфическими в отношении одиночного типа TLR (например TLR3 или TLR9), тогда как некоторые агонисты TLR активируют два или более чем два типа TLR (например, как TLR7, так и TLR8). Предложенные здесь агонисты TLR включают агонисты TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 и TLR9. Примеры низкомолекулярных агонистов TLR включают агонисты, раскрытые, например, в патентах США №№ 4689338; 4929624; 5266575; 5268376; 5346905; 5352784; 5389640; 5446153; 5482936; 5756747; 6110929; 6194425; 6331539; 6376669; 6451810; 6525064; 6541485; 6545016; 6545017; 6573273; 6656938; 6660735; 6660747; 6664260; 6664264; 6664265; 6667312; 6670372; 6677347; 6677348; 6677349; 6683088; 6756382; 6797718; 6818650; и 77091214; публикациях патентов США №№ 2004/0091491, 2004/0176367 и 2006/0100229; и публикациях международных патентов №№ WO 2005/18551, WO 2005/18556, WO 2005/20999, WO 2005/032484, WO 2005/048933, WO 2005/048945, WO 2005/051317, WO 2005/051324, WO 2005/066169, WO 2005/066170, WO 2005/066172, WO 2005/076783, WO 2005/079195, WO 2005/094531, WO 2005/123079, WO 2005/123080, WO 2006/009826, WO 2006/009832, WO 2006/026760, WO 2006/028451, WO 2006/028545, WO 2006/028962, WO 2006/029115, WO

2006/038923, WO 2006/065280, WO 2006/074003, WO 2006/083440, WO 2006/086449, WO 2006/091394, WO 2006/086633, WO 2006/086634, WO 2006/091567, WO 2006/091568, WO 2006/091647, WO 2006/093514 и WO 2006/098852. Дополнительные примеры низкомолекулярных агонистов TLR включают некоторые пуриновые производные (такие как производные, описанные в патентах США №№ 6376501 и 6028076), некоторые имидазохинолиновые амидные производные (такие как описанные в патенте США № 6069149), некоторые имидазопиридиновые производные (такие как описанные в патенте США № 6518265), некоторые бензимидазольные производные (такие как описанные в патенте США № 6387938), некоторые производные 4-аминопиримидина, конденсированные с пятичленным азотсодержащим гетероциклическим кольцом (таким как адениновые производные, описанные в патентах США №№ 6376501; 6028076 и 6329381; и в WO 02/08905), и некоторые 3-бета-D-рибофуранозилтиазоло[4,5-d]пиримидиновые производные (такие как описанные в публикации патента США № 2003/0199461), и некоторые низкомолекулярные иммуно-потенцирующие соединения, такие как описанные, например, в публикации патента США № 2005/0136065. Примеры крупномолекулярных агонистов TLR включены в виде олигонуклеотидных последовательностей. Некоторые олигонуклеотидные последовательности агониста TLR содержат цитозин-гуаниновые динуклеотиды (CpG) и описаны, например, в патентах США №№ 6194388; 6207646; 6239116; 6339068; и 6406705. Некоторые CpG-содержащие олигонуклеотиды могут включать синтетические иммуномодулирующие структурные мотивы, такие как описанные, например, в патентах США №№ 6426334 и 6476000. Другие нуклеотидные последовательности агониста TLR лишены последовательности CpG и описаны, например, в международной заявке на патент № WO 00/75304. Другие нуклеотидные последовательности агониста TLR включают гуанозин- и уридинбогатые одноцепочечные РНК (оцРНК), такие как описанные, например, в Heil et al, Science, vol. 303, pp. 1526-1529, Mar. 5, 2004. Другие агонисты TLR включают биологические молекулы, такие как аминокислоты (AGP) и описаны, например, в патентах США №№ 6113918; 6303347; 6525028; и 6649172. Агонисты TLR также включают инактивированные патогены или их фракции, которые могут активировать множество различных типов рецептора TLR. Примеры полученных у патогенов агонистов TLR включают BCG (БЦЖ), экстракт *Mycobacterium obuense*, талимоген лагерпарепвек (T-Vec) (полученный из HSV-1) и Реха-Vec (полученный из вируса оспы). В некоторых воплощениях предложенное здесь антитело против CD47, антитело против

PD-L1 или биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 могут быть введены в комбинации с SPM-105 (полученным из автоклавированных микобактерий), OM-174 (производное липида A), OmpS1 (порин из *Salmonella typhi*), OmpS1 (порин из *Salmonella typhi*), OspA (из *Borrelia burgdorferi*), MALP-2 (микоплазменный макрофаг-активирующий липопептид 2 кДа), STF (растворимый туберкулезный фактор), CU-T12-9, дипровацим и липопептиды, полученные из компонентов клеточной стенки, такие как PAM2CSK4, PAM3CSK4 и PAM3Cys. Примеры агонистов TLR2, которые полезны в способах лечения, лекарственных средствах и применениях в соответствии с настоящим изобретением, включают, например, бактериальные липопротеины (например диацилированные липопротеины) и их производные такие как SPM-105 (полученные из автоклавированных микобактерий), OM-174 (производное липида A), OmpS1 (порин из *Salmonella typhi*), OmpS1 (порин из *Salmonella typhi*), OspA (из *Borrelia burgdorferi*), MALP-2 (микоплазменный макрофаг-активирующий липопептид 2 кДа), STF (растворимый противотуберкулезный фактор), CU-T12-9, дипровацим, ампливант и липопептиды, полученные из компонентов клеточной стенки, таких как PAM2CSK4, PAM3CSK4 и PAM3Cys. Примеры агонистов TLR3, которые полезны в способах лечения, лекарственных средствах и применениях в соответствии с настоящим изобретением, включают лиганды TLR3, таких как синтетические дцПНК, полиинозиновая-полицитидиловая кислота [«poly(I:C)»] (доступный, например из InvivoGen препараты с высокой молекулярной массой (HMW) и низкой молекулярной массой (LMW)), полиадениловая-полиуридиловая кислота [«poly(A:U)»] (доступная, например из InvivoGen), polyICLC (смотри Levy et al., Journal of Infectious Diseases, vol. 132, no. 4, pp. 434-439, 1975), Ampligen (смотри Jasani et al., Vaccine, vol. 27, no. 25-26, pp. 3401-3404, 2009), хилтонол, ринтатолимоб и RGC100 (смотри Naumann et al., Clinical and Developmental Immunology, vol. 2013, article ID 283649). Примеры агонистов TLR4, полезных в способах лечения, лекарственных средствах и применениях в соответствии с настоящим изобретением, включают, например, бактериальные липополисахариды (LPS) и их производные, такие как B:0111 (Sigma), монофосфорилилипид A (MPLA), 3DMPL (3-O-деацетилованный MPL), GLA-AQ, G100, AS15, ASO2, GSK1572932A (GlaxoSmithKline, UK). Примеры агонистов TLR5, полезных в способах лечения, лекарственных средствах и применениях в соответствии с настоящим изобретением, включают, например, бактериальный флагеллин, очищенный из *B. subtilis*, флагеллин, очищенный из *P. aeruginosa*, флагеллин, очищенный из *S. typhimurium*, и

рекомбинантный флагеллин (все доступны из InvivoGen), эндтолимод (CBLB502; фармакологически оптимизированное производное флагеллина). Примеры агонистов TLR6, которые полезны в способах лечения, лекарственных средствах и применениях в соответствии с настоящим изобретением, включают, например, множество из агонистов TLR2, предложенных выше, поскольку TLR2 и TLR6 может образовывать гетеродимер. TLR6 также может образовывать гетеродимер с TLR4, и агонисты TLR6 могут включать различные агонисты TLR4, предложенные выше. Примеры агонистов TLR7, которые полезны в способах лечения, лекарственных средствах и применениях в соответствии с настоящим изобретением, включают рекомбинантные одноцепочечные («оц»)ПНК, имидазохинолиновые соединения, такие как имиквимод (R837), гардиквимод и резиквимод (R848); локсорибин (7-аллил-7,8-дигидро-8-оксо-гуанозин) и родственные соединения; 7-тиа-8-оксогуанозин, 7-деазагуанозин и родственные аналоги гуанозина; ANA975 (Anadys Pharmaceuticals) и родственные соединения; SM-360320 (Sumimoto); 3M-01, 3M-03, 3M-852, и 3M-S-34240 (3M Pharmaceuticals); GSK2245035 (GlaxoSmithKline; молекула 8-оксоаденина), AZD8848 (AstraZeneca; молекула 8-оксоаденина), MEDI9197 (Medimmune; ранее 3M-052), ssRNA40 и аденозиновые аналоги, такие как UC-1V150 (Jin et al., Bioorganic Medicinal Chem Lett (2006) 16:4559-4563, compound 4). Множество агонистов TLR7 также представляют собой агонисты TLR8.

Примеры агонистов TLR8, полезных в способах лечения, лекарственных средствах и применениях в соответствии с настоящим изобретением, включают рекомбинантные одноцепочечные оцПНК, имиквимод (R837), гардиквимод, резиквимод (R848), 3M-01, 3M-03, 3M-852, и 3M-S-34240 (3M Pharmaceuticals); GSK2245035 (GlaxoSmithKline; молекула 8-оксоаденина), AZD8848 (AstraZeneca; молекула 8-оксоаденина), MEDI9197 (Medimmune; ранее 3M-052), Poly-G10, мотолимод, и различные агонисты TLR7, предложенные выше (как указано ранее, множество агонистов TLR7 также представляют собой агонисты TLR8). Примеры агонистов TLR9, которые полезны в способах лечения, лекарственных средствах и применениях в соответствии с настоящим изобретением, включают неметилованную CpG-содержащую ДНК, иммуностимулирующие олигодезоксинуклеотиды (ODN), такие как CpG-содержащие ODN, такие как CpG24555, CpG10103, CpG7909 (PF-3512676/агатолимоб), CpG1018, AZD1419, ODN2216, MGN1703, SD-101, 1018ISS, и CMP-001. Агонисты TLR9 также включают нуклеотидные последовательности,

содержащие синтетический цитозин-фосфат-2'-дезоксидеазагуанозин динуклеотид (CpR) (Hybridon, Inc.), dSLIM-30L1 и комплексы иммуноглобулин-ДНК. Примеры агонистов TLR9 раскрыты в WO2003/015711, WO2004/016805, WO2009/022215, PCT/US95/01570, PCT/US97/19791 и патентах США №№ 8552165, 6194388 и 6239116, которые включены для всех случаев путем ссылки.

Примеры агонистов RLR, которые полезны в способах лечения, лекарственных средствах и применениях в соответствии с настоящим изобретением, включают, например, короткую двухцепочечную РНК с не экзистированным 5' трифосфатом (агонист RIG-I); поли I:C (агонист MDA-5) и BO-112 (агонист MDA-A).

Примеры агонистов NLR, которые полезны в способах лечения, лекарственных средствах и применениях в соответствии с настоящим изобретением, включают, например, липосомальный мурамилтрипептид/мифамуртид (агонист NOD2).

CLR включают различные PRR, которые обнаруживают, например углеводы и гликопротеины. CLR включают трансмембранные CLR и секретированные CLR. Примеры CLR включают, например, DEC-205/CD205, маннозный рецептор макрофагов (MMR), дектин-1, дектин-2, mincle, DC-SIGN, DNGR-1 и маннозо-связывающий лектин (MBL).

Примеры агонистов CLR, полезных в способах лечения, лекарственных средствах и применениях в соответствии с настоящим изобретением, включают, например, фракцию MD (очищенный растворимый бета-глюкановый экстракт из *Grifola frondosa*) и imprime PGG (бета 1,3/1,6-глюкан PAMP, полученный из дрожжей).

Примеры агонистов STING, которые полезны в способах лечения, лекарственных средствах и применениях в соответствии с настоящим изобретением, включают различные иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты, такие как синтетические двухцепочечные ДНК, циклические ди-GMP (гуанозинмонофосфат), циклический-GMP-AMP (cGAMP), синтетические циклические динуклеотиды (CDN), такие как МК-1454 и ADU-S100 (MIW815), и небольшие молекулы, такие как P0-424.

Примеры иммуностимулирующих цитокинов, которые полезны в способах лечения, лекарственных средствах и применениях в соответствии с настоящим изобретением, включают GM-CSF, G-CSF, IFN-альфа, IFN-гамма; IL-2 (например денилейкин дифитокс), IL-6, IL-7, IL-11, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 и TNF-альфа.

Примеры противораковых вакцин, которые полезны в способах лечения, лекарственных средствах и применениях в соответствии с настоящим изобретением, включают, например, сипулейцел-Т и талимоген лагерпарепвек (T-VEC).

Примеры терапий при помощи иммунных клеток, которые полезны в способах лечения, лекарственных средствах и применениях в соответствии с настоящим изобретением, включают, например, инфильтрирующие опухоли лимфоциты (TIL) и Т-клетки с химерным рецептором антигена (CAR-Т клетки).

Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включающие альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (в особенности буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включающий синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включающий его адозелезин, карзелезин и синтетические аналоги бизелезина); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включающий синтетические аналоги KW-2189 и CBI-TMI); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамину оксида хлоргидрат, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как эндииновые антибиотики (например, калихеамицин, в частности, калихеамицин гамма 1I и калихеамицин phi1I, смотри, например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994); дайнемицин, включающий дайнемицин А; бифосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также неокарциностатиновый хромофор и родственные хромопротеиновые эндииновые антибиотические хромофоры), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, каминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включающий морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), ПЭГилированный липосомальный доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин,

оливомицины, пепломицин, потфиروмицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-флуоролоурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепитиостан, тестолактон; антиадренергические вещества, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; заменитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминолевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; юисантрен; эдатрексат; дефофамин; демекольцин; диазиквон; эльформитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; майтансиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; разоксан; ризоксин; сизофуран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотецены (в особенности Т-2 токсин, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ага-С»); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, пацитаксел и доцетаксел; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; авинбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифлуорометилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; и фармацевтически приемлемый соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных. Также включены антигормональные агенты, которые действуют в отношении регулирования или подавления действия гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены и избирательные модуляторы эстрогенового рецептора (SERM), включающие, например, тамоксифен, ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Fareston); ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, которая

регулирует продукцию эстрогена в надпочечных железах, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоглутетимид, мегестрол ацетат, экземестан, форместан, фадрозол, ворозол, летрозол и анастрозол; и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; ингибиторы KRAS; ингибиторы MCT4; ингибиторы MAT2a; ингибиторы тирозинкиназы, такие как сунитиниб, акситиниб; ингибиторы alk/c-Met/ROS, такие как кризотиниб, лорлатиниб; ингибиторы mTOR, такие как темсиролимус, гедатолизиб; ингибиторы src/abl, такие как босутиниб; ингибиторы циклин-зависимой киназы (CDK), такие как палбоциклиб, PF-06873600; ингибиторы erb, такие как дакомитиниб; ингибиторы PARP, такие как талазопариб; ингибиторы SMO, такие как гласдегиб, PF-5274857; ингибиторы EGFR T790M, такие как PF-06747775; ингибиторы EZH2, такие как PF-06821497; ингибиторы PRMT5, такие как PF-06939999; ингибиторы TGF β r1, такие как PF-06952229; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных. В конкретных воплощениях такой дополнительный терапевтический агент представляет собой бевацизумаб, цетуксимаб, сиролимус, панитумумаб, 5-фторурацил (5-FU), капецитабин, тивозаниб, иринотекан, оксалиплатин, цисплатин, трифлуридин, типирацил, лейковорин, гемцитабин, регорафиниб или эрлотиниба хлоргидрат.

В некоторых воплощениях терапия при помощи антитела против CD47, антитела против PD-L1 или биспецифического антитела против CD47/PD-L1 может быть осуществлена вместе с или путем последовательного введения до или после лечения другим агентом с интервалами, находящимися в диапазоне от минут до недель. В воплощениях, в которых другие агенты и/или белки, или полинуклеотиды вводят по отдельности, можно как правило обеспечить, чтобы значительный период времени не разделял каждое введение, таким образом, что агент и композиция в соответствии с настоящим изобретением может все еще обладать способностью вызывать благоприятно комбинированное действие в отношении субъекта. В таких случаях предполагается, что можно вводить оба агента в пределах приблизительно 12-24 ч друг относительно друга и, более предпочтительно, в течение приблизительно 6-12 ч друг относительно друга. В некоторых ситуациях может быть желательно существенно увеличивать период введения, тем не менее, когда от нескольких суток (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких суток (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) проходит между соответствующими введениями.

В некоторых воплощениях композицию для лечения на основе антитела против CD47, антитела против PD-L1 или биспецифического антитела против CD47/PD-L1

комбинируют со схемой лечения, дополнительно включающей традиционную терапию, выбранную из группы, состоящей из: хирургии, радиационной терапии, химиотерапии, таргетной терапии, иммунотерапии, гормональной терапии, ингибирования ангиогенеза и паллиативного лечения.

Наборы

Дополнительный аспект изобретения представляет собой набор, содержащий раскрытое выше антитело против CD47, антитело против PD-L1 или биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 и указания для применения в соответствии с любым из описанных здесь способов в соответствии с изобретением. Как правило, эти указания содержат описание введения антитела против CD47, антитела против PD-L1 или биспецифического антитела против CD47/PD-L1 для вышеописанных терапевтических лечений. Этот набор содержит любую раскрытую здесь фармацевтическую композицию. Фармацевтические композиции и другие реактивы могут быть представлены в наборах в любой удобной форме, такой как, например, раствор или порошкообразная форма.

В еще одном аспекте набор дополнительно содержит один или более чем один из других профилактических или терапевтических агентов, полезных в лечении рака, в одном или более чем одном контейнере. В одном из воплощений другой профилактический или терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. В других аспектах профилактический или терапевтический агент представляет собой биологический или гормональный терапевтический агент.

Несколько аспектов фармацевтических композиций, профилактических или терапевтических агентов в соответствии с изобретением предпочтительно тестируют *in vitro* в системе клеточной культуры, и в животной модели, такой как животная модель грызуна, в отношении желаемой терапевтической активности перед применением у людей.

Токсичность и эффективность профилактических и/или терапевтических протоколов в соответствии с данным изобретением может быть определена при помощи стандартных фармацевтических процедур в клеточных культурах или экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (доза, смертельная для 50% популяции) и ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная в 50% популяции). Отношение доз между токсическими и терапевтическими действиями представляет собой терапевтический индекс, и он может быть выражен как отношение LD₅₀/ED₅₀.

Предпочтительны профилактические и/или терапевтические агенты, которые демонстрируют значительные терапевтические индексы.

Дополнительно, любые анализы, известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы для оценки профилактической и/или терапевтической пригодности раскрытых здесь терапий или комбинированных терапий для лечения или предупреждения рака.

Инструкции, относящиеся к применению описанного здесь антитела против CD47, антитела против PD-L1 или биспецифического антитела против CD47/PD-L1, как правило включают информацию о дозе, о схеме введения дозы и пути введения для предполагаемого введения. Контейнеры могут представлять собой стандартные дозы, многодозовые упаковки (например, мультидозовые упаковки) или субъединичные дозы. Инструкции, поставляемые с наборами в соответствии с изобретением, как правило представляют собой печатные инструкции на этикетке или на вкладыше в упаковку (например, бумажный формуляр, включенный в набор), но также приемлемы машиночитаемые инструкции (например, инструкции, нанесенные на магнитный или оптический диск для хранения).

Наборы в соответствии с данным изобретением находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает без ограничения виалы, ампулы, пробирки, флаконы, сосуды, гибкую упаковку (например, Майлар-пленочные или пластиковые контейнеры) и т.п. для каждой фармацевтической композиции и других включенных ингредиентов, например, буферов, сбалансированных солевых растворов и т.п., для применения в введении фармацевтических композиций субъектам. Также рассмотрены упаковки для применения в комбинации со специфическим устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения (например, распылитель) или устройство для инфузии, такое как мининасос. Набор может иметь стерильный порт доступа (например контейнер может представлять собой контейнер для введения внутривенного раствора или виал, имеющий пробку, которую протыкают иглой для подкожной инъекции). Контейнер также может иметь порт для стерильного доступа (например контейнер может представлять собой контейнер для внутривенного раствора или виал, имеющий пробку, которую протыкают иглой для подкожной инъекции). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой антитело против CD47, антитело против PD-L1 или биспецифическое антитело против CD47/PD-L1. Контейнер может дополнительно содержать второй фармацевтически активный агент.

Как правило, набор включает контейнер и этикетку на контейнере или вкладыш в контейнер, находящийся в или соединенный с контейнером.

Здесь включено путем ссылки для всех задач содержание предварительных заявок на патенты США № 62/949120 (поданной 17 декабря 2019 года) и 63/110693 (поданной 6 ноября 2020 года).

Биологические коллекции

Типичные материалы в соответствии с настоящим изобретением депонированы в Американской коллекции типовых культур 10801 Университета Boulevard, Манассас, Va. 20110-2209, USA, 8 декабря 2020 года. Вектор «CD47_P01A11_75 Heavy chain», имеющий регистрационный номер ATCC PTA-126910, содержит вставку ДНК, кодирующую тяжелую цепь антитела против CD47, обозначенную «CD47_P01A11_75 Heavy chain», вектор «PDL1_P06B05_245 Heavy chain», имеющий регистрационный номер ATCC PTA-126911, содержит вставку ДНК, кодирующую тяжелую цепь антитела против PD-L1, обозначенную «PDL1_P06B05_245 Heavy chain», и вектор «Common Light Chain 1 Full Light Chain», имеющий регистрационный номер ATCC PTA-126912, содержит вставку ДНК, кодирующую общую цепь антитела против CD47 и против PD-L1, обозначенный «Common Light Chain 1 Full Light Chain».

Депонирование производили под руководством Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры и подзаконных актов (Будапештский Договор). Они обеспечивают поддержание жизнеспособной культуры коллекции в течение 30 лет, начиная с даты депонирования. Коллекцию делали доступной в соответствии с ATCC и правилами Будапештского Договора, и субъектом соглашения между Pfizer Inc. и ATCC, который гарантирует непрерывную и не ограниченную доступность потомства культуры коллекции для публичного использования после публикации релевантного патента США или после выкладывания для публичного использования любой заявки на патент США или иностранной заявки на патент, в зависимости от того, что наступит раньше, и гарантирует доступность потомства для любого лица, определенного руководителем бюро по патентам и товарным знакам США, уполномоченным в соответствии с 35 U.S.C. раздел 122 и правилами для руководителя в связи с этим (включающий 37 C.F.R. раздел 1.14 с особенной ссылкой на 886 OG 638).

Патентообладатель настоящей заявки на изобретение согласен с тем, что, если культура материалов для депонирования погибнет или будет утрачена, или разрушена

при выращивании в подходящих условиях; то материалы будут незамедлительно заменены на аналогичные. Разнообразие депонированного материала не следует рассматривать как лицензию для практической реализации изобретения в нарушение прав, обеспечиваемых под руководством любого правительства в соответствии с его патентными правами.

Следующие примеры специфических аспектов для реализации настоящего изобретения предложены исключительно для иллюстративных задач и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения каким-либо образом.

Примеры

Пример 1: Примеры антител против CD47

Ниже приведена информация об антителах против CD47, имеющих общую легкую цепь (CLC), P14D04, P01A11, P01A08 и их вариантах. P14D04 имеет аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 6. P01A11 и P01A08 имеют аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 2.

Таблица 9: Обобщение свойств последовательности примеров антител CLC против CD47

Антитело	Зародышевая линия VH	Зародышевая линия VL	Последовательность			
			VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	Длина VH CDR3
P14D04	IGHV3-23	IGKV 1-39	GFSFST FTMN (SEQ ID NO: 33)	TISGTGG NTYYAD SVKG (SEQ ID NO: 35)	RRSTVGS NGHSYW FDY (SEQ ID NO: 36)	16
P01A11	IGHV1-69	IGLV 1-47	GYTFT NYAIS (SEQ ID NO: 27)	GISPLFG TANYAQ KFQG (SEQ ID NO: 29)	DGGRSS DVGWYV GAMDV (SEQ ID NO: 30)	17

P01A08	IGHV1-69	IGLV1-47	GYTFS NYAIT (SEQ ID NO: 39)	GISPIFG TANYAQ KFQG (SEQ ID NO: 17)	DGGRSS DGGWRG AGMDY (SEQ ID NO: 40)	17
--------	----------	----------	-----------------------------------	--	--	----

Таблица 10 Обобщение связывающих свойств примеров антител CLC против

CD47

Антите ло	K _D (человечес кое), нМ	T _{1/2} (человечес кое), мин	K _D (макак а), нМ	T _{1/2} (макак а), мин	Перекрестна я реакция с мышинным	Блокирова ние SIRPα
P14D04	6,39	3,6	9,7	2,52	Нет	Да
P01A11	0,817	24,1	1,02	21,15	Да (более 6,8 мкМ)	Да
P01A08	1,72	21,31	2,08	20,16	Нет	Да

В таблице 11А ниже обобщены свойства двух дополнительных антител CLC против CD47.

Таблица 11А: Обобщение свойств примеров антител CLC против CD47

Образец	CDR H1	CDR H2	CDR H3	T _{1/2} человеческое, мин	K _D человеческое, нМ	T _{1/2} макака, мин	K _D макака, нМ
P01A11_49 7	GGTFT SYAIS (SEQ ID NO: 23)	GISPIF GTANY AQKFQ G (SEQ ID NO: 17)	DAGRSSDV GWYVGAL DV (SEQ ID NO: 24)	Н.Д.	497,0	Н.Д.	704,0
P01A11_75	GYTFS SYAIS	GISPIF GTANY AQKFQ G	DAGRSSDV GWYVGAI DV	0,49	75,0	0,48	104,8

	(SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 17)	(SEQ ID NO: 18)				
--	-----------------	-----------------	-----------------	--	--	--	--

Н.Д. – нет данных

В таблице 11В приведены варианты родительского антитела P01A11, и данные K_D для связывания вариантов с человеческими белками CD47 («hCD47») и белками макака CD47 («cyCD47»). Нумерация аминокислот в таблице 11В производилась со ссылкой на аминокислотную последовательность CD47_P01A11_parent VH (SEQ ID NO: 7). Например, «Y27G» относится к остатку «Y» в положении 27 в SEQ ID NO: 7, и указывает на то, что остаток Y претерпел мутацию в остаток «G». В соответствии с представленным в таблице 11В различные варианты P01A11, которые имеют мутации в положениях 27, 30, 31, 53, 54, 55, 100, 105, 108, связываются с hCD47 с K_D менее чем 50 нМ, и мутации во множестве позиций также могут быть комбинированы. Положения 27, 30 и 31 находятся в CDR1, положения 50, 52, 53, 54 и 55 находятся в CDR2, и положения 99, 100, 105, 108, 113 и 114 находятся в CDR3.

Таблица 11В: Мутации P01A11

Антитела против CD47	hCD47 K_D (нМ)	cyCD47 K_D (нМ)
P01A11_wt	1,3	1,3
P1A11_Y27G	20	23
P1A11_T30S	1,8	2,5
P1A11_N31S	7,0	9,3
P1A11_G50R	более 1500	более 1500
P1A11_S52I	1311	более 1500
P01A11_P53G	5,6	7,6
P1A11_L54I	0,69	1,3
P1A11_F55L	2,7	3,3
P1A11_D99E	1196	более 1500
P1A11_G100A	8,5	11

P1A11_G100S	28	36
P1A11_G100Q	более 1500	более 1500
P01A11_G100V	более 1500	более 1500
P01A11_D105E	48	62
P1A11_W108Y	25	32
P1A11_W108F	103	117
P01A11_W108A	608	773
P1A11_M113L	0,86	1,2
P1A11_M113I	2,9	3,7
Варианты антител против CD47 с комбинациями вариантов		
P01A11_P53G_D105E	241,0	351,0
P01A11_P53G_D114E	300	520
P01A11_L54A_D114E	31	46
P01A11_L54A_R102A	38	45
P01A11_L54A_S104E	19	16
P01A11_Y27G_L54I_G100A	132	180
P01A11_Y27G_L54I_G100A_M113L	154	198
P01A11_Y27G_L54I_G100A_M113I	263	371
P01A11_Y27G_N31S_L54I_G100A_M113L	497	704
P01A11_T30S_N31S_L54I_G100A	97	138
P01A11_T30S_N31S_L54I_G100A_M113L	106	120
P01A11_T30S_N31S_L54I_G100A_M113I	75	105
P01A11_T30S_N31S_L54I_G100A_W108Y_M113L	более 1500	более 1500

Пример 2: Примеры антител против PD-L1

Ниже приведена информация об антителах против PD-L1, имеющих общую легкую цепь (CLC), P04D09, P06B05 и P06A09, и их вариантах. P04D09 имеет аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 6.

P06B05 и P06A09 имеет аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 2.

Таблица 13: Обобщение свойств последовательности примеров антител CLC против PD-L1

Анти- тело	Зародышевая линия VH	Зародышевая линия VL	Последовательность			
			VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	Длина VH CDR3
P04D09	IGHV3-23	IGKV1-39	GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 49)	AIGVRGGITYYADSVKGG (SEQ ID NO: 51)	ERSVGELVGIDWMDH (SEQ ID NO: 56)	15
P06B05	IGHV3-15	IGLV1-47	GFTFSNAWMN (SEQ ID NO: 43)	RIKTKADGGTTDYAAPVKG (SEQ ID NO: 45)	DPGSYWD SVYGGM DY (SEQ ID NO: 57)	15
P06A09	IGHV3-15	IGLV1-47	GFTFSNAWMN (SEQ ID NO: 43)	RIKSESDGGTTDYAAPVKG (SEQ ID NO: 59)	DYRIDDW GYPYPGM DY (SEQ ID NO: 60)	16

Антите- ло	K _D (человеческое), нМ	T _{1/2} (человеческое), мин	K _D (макака), нМ	T _{1/2} (макака), мин	Перекрестная реакция с мышинным?	Блокирование PD-1?
P04D09	0,56	43,6	1,15	20,1	Да (20,4 нМ)	Да
P06B05	4,42	28,2	8,07	10,2	Да (207 нМ)	Да

P06A09	2,97	5,13	5,75	2,79	Да (113 нМ)	Да
--------	------	------	------	------	-------------	----

Таблица 14: Обобщение связывающих свойств примеров антител CLC против PD-L1

Свойства двух дополнительных антител против PD-L1 P04D09_113 и P06B05_245 обобщены в таблице 15А ниже.

Таблица 15А: Обобщение свойств примеров антител CLC против PD-L1

Образец	CDR H1	CDR H2	CDR H3	T _{1/2} человеческое, мин	K _D человеческое, нМ	T _{1/2} макака, мин	K _D макака, нМ
P04D09_113	GFTFS SYAM S (SEQ ID NO: 49)	AIGVR GGITY YADSV KG (SEQ ID NO: 51)	ERSVGELV GIDWMDH (SEQ ID NO: 56)	22,2	1,7	23,4	1,7
P06B05_245	GFTFS NAW MN (SEQ ID NO: 43)	RIKTK ADGGT TDYAA PVKG (SEQ ID NO: 45)	DPGEYWD SVYGGMD Y (SEQ ID NO: 46)	23,4	1,6	23,7	1,6

В таблице 15В приведены варианты родительского клона P06B05 и данные K_D для связывания мутеинов с человеческими белками PD-L1 («hPD-L1»), белками макака PD-L1 («суPD-L1») и мышинными белками PD-L1 («mPD-L1»). Нумерация аминокислот в таблице 15В производилась со ссылкой на аминокислотную последовательность PDL1_P06B05_parent VH (SEQ ID NO: 11). Например, «S104A» относится к остатку «S» в положении 104 в SEQ ID NO: 11 и указывает на то, что остаток «S» претерпел мутацию в остаток «A». В соответствии с представленным в таблице 15В различные варианты P06B05, которые имеют мутации в положениях 103, 104, 105, 107, 112, 113, 61 и 62, связывающиеся с hPD-L1 с K_D менее чем 50 нМ, и мутации во множестве положений

также могут быть комбинированы. Положения 56, 57, 61 и 62 находятся в CDR2, и положения 103, 104, 105, 107, 109, 112 и 113 находятся в CDR3.

Вариант антитела против PD-L1	hPD-L1 K_D (нМ)	cyPD-L1 K_D (нМ)	mPD-L1 K_D (нМ)
P06B05_parent	2,36	3,11	Н.Д.
P06B05_G103I	8,06	8,11	Н.Д.
P06B05_S104A	3,50	3,93	Н.Д.
P06B05_S104H	7,90	6,11	Н.Д.
P06B05_S104Y	9,75	5,79	Н.Д.
P06B05_S104E	0,80	0,45	23,1
P06B05_S104I	менее 0,74	0,99	Н.Д.
P06B05_Y105H	12,8	6,58	Н.Д.
P06B05_D107S	23,9	26,3	Н.Д.
P06B05_D107L	90,2	83,0	Н.Д.
P06B05_D107Y	3,03	3,23	Н.Д.
P06B05_V109S	76,5	более 100	Н.Д.
P06B05_G112A	3,71	3,72	131
P06B05_G112S	1,69	1,74	77,7
P06B05_M113L	6,82	6,55	Н.Д.
P06B05_D56E_G57E	69,7	60,6	Н.Д.
P06B05_D56E_G57A	95,5	92,2	более 1500
P06B05_D61Q_Y62E	5,81	4,43	Н.Д.
P06B05_D61Q_Y62S	5,02	5,54	Н.Д.
P06B05_D61E_Y62E	9,49	8,39	Н.Д.
P06B05_D61A_Y62Q	5,97	4,96	Н.Д.
P06B05_D61A_Y62E	3,28	3,17	Н.Д.
P06B05_D61A_Y62A	4,01	3,67	Н.Д.
P06B05_D61A_Y62S	5,37	2,75	Н.Д.
P06B05_D61S_Y62Q	5,98	3,73	Н.Д.
P06B05_D61S_Y62A	6,71	более 1,19	Н.Д.
P06B05_D61S_Y62S	6,10	2,15	Н.Д.

Н.Д. – нет данных

Пример 3: Получение примера биспецифических антител против CD47/PD-L1

Различные биспецифические антитела против CD47/PD-L1 получали путем комбинирования некоторых антител против CD47 и антител против PD-L1, описанных выше, в формате биспецифического антитела.

Биспецифическое антитело 1 против CD47/PD-L1 (также названное здесь как «BsAb1») получали путем комбинирования антител против CD47 P01A11_75 (аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 1) с антителами против PD-L1 P06B05_245 (аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 4) в формате биспецифического антитела. Два этих антитела обладают одной и той же аминокислотной последовательностью VL легкой цепи (представленной в SEQ ID NO: 2), и соответственно BsAb1 против CD47/против PD-L1 обладает одной и той же аминокислотной последовательностью легкой цепи как для вариабельной области антитела против CD47, так и для вариабельной области антитела против PD-L1 (т.е. общая легкая цепь). BsAb1 имеет домен Fc человеческого IgG1 с мутациями выступ во впадину. IgG1 отобрали из-за надежной эффекторной функции, включающей ADCP и ADCC как часть механизма действия антитела, способствующего противоопухолевой эффективности (дополнительно к блокировке иммунных точек врожденного и приобретенного иммунитета). Аминокислотные последовательности тяжелой цепи антитела против CD47, тяжелой цепи антитела против PD-L1 и общей легкой цепи BsAb1 представлены в таблице 16 ниже. Мутации в Fc в каждой цепи для формирования структуры «выступа» или «впадины» подчеркнуты.

Также получали биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, которое идентично BsAb1, за исключением добавления линкера «GGGGS» (SEQ ID NO: 75) с последующей 6х гистидиновой маркерной концевой последовательностью по С-концу выступа тяжелой цепи антитела против PD-L1 («GGGGSНННННН»)(SEQ ID NO: 76). Это антитело обладало по существу такой же аффинностью связывания с CD47 и PD-L1 и другими свойствами, как вариант BsAb1 без маркерной концевой последовательности, и использовалось для большинства экспериментов, включающих предложенное здесь BsAb1.

Таблица 16: Аминокислотные последовательности BsAb1

Полипептид	Аминокислотная последовательность
------------	-----------------------------------

Тяжелая цепь антитела против CD47 (с мутацией «впадины» в Fc-цепи)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYAISWVRQAPGGGLE WMGGISPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVY YCARDAGRSSDVGWYVGAIQVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLSCA VKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 61)
Тяжелая цепь антитела против PD- L1 (с мутациями «выступа» в Fc-цепи)	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWVRQAPGKGLE WVGRIKTKADGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED TAVYYCTTDPGEYWDSVYGGMDYWGGQGTLLTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSL WCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 64)
Общая легкая цепь	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLI YRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSL SGVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY PGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 62)

Биспецифическое антитело 2 против CD47/PD-L1 (также названное здесь как «BsAb2») получали путем комбинирования антитела против CD47 P01A11_497 (аминокислотная последовательность VH, представленная в SEQ ID NO: 3) с антителом против PD-L1 P06B05_245 (аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 4). Эти две антитела обладали одной и той же аминокислотной последовательностью VL легкой цепи (представленной в SEQ ID NO: 2), и соответственно BsAb2 обладало одной и той же аминокислотной последовательностью легкой цепи как в вариабельной области антитела против CD47, так и в вариабельной

области антитела PD-L1 (т.е. имело общую легкую цепь). BsAb2 имеет домен Fc человеческого IgG1 с мутацией выступ во впадину. Аминокислотные последовательности тяжелой цепи антитела против CD47, тяжелой цепи антитела против PD-L1 и общей легкой цепи BsAb2 представлены в таблице 17 ниже. Мутации в цепи Fc для формирования структуры «выступа» или «впадины» подчеркнуты.

Также получали биспецифическое антитело против CD47/PD-L1, которое идентично BsAb2, за исключением добавления линкера «GGGGS» (SEQ ID NO: 75) с последующей 6х гистидиновой маркерной концевой последовательностью по С-концу выступа тяжелой цепи антитела против PD-L1 («GGGGSHHHHHH»)(SEQ ID NO: 76). Это антитело обладало по существу такой же аффинностью связывания с CD47 и PD-L1 и другими свойствами, как вариант BsAb2 без маркерной концевой последовательности, и использовалось для большинства экспериментов, включающих предложенное здесь BsAb2.

Таблица 17: Аминокислотные последовательности BsAb2

Полипептид	Аминокислотная последовательность
Тяжелая цепь антитела против CD47 (с мутациями «впадины» в Fc-цепи)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFTSYAISWVRQAPGQGLE WMGGISPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVY YCARDAGRSSDVGWYVGALDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLSCA VKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 63)
Тяжелая цепь антитела против PD-L1 (с мутациями «выступа» в Fc-цепи)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWRQAPGKGLE WVGRIKTKADGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED TAVYYCTTDPGEYWDSVYGGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK

	EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 64)
Общая легкая цепь	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLI YRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSL SGVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY PGAFTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 62)

Каждое из биспецифических антител против CD47/PD-L1 BsAb1 и BsAb2 получали путем трансфекции клеток CHO (яичника китайского хомячка) полинуклеотидами, содержащими последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие 3 отдельных полипептида: соответствующую тяжелую цепь антитела против CD47; соответствующую тяжелую цепь антитела против PD-L1 и общую легкую цепь. Соответствующие биспецифические антитела против CD47/PD-L1 экспрессировали в этих клетках и очищали путем колоночной хроматографии. Таким образом, безусловно биспецифические антитела против CD47/PD-L1 значительно легче получать, чем множество других типов и форматов биспецифического антитела, поскольку предложенные здесь биспецифические антитела против CD47/PD-L1 могут быть продуцированы и очищены по аналогии со стандартными IgG mAb. Основное различие между предложенным здесь биспецифическим антителом по сравнению со стандартным IgG mAb заключается в том, что в случае стандартного IgG mAb клетку-хозяина трансфицируют полинуклеотидами, кодирующими две полипептидные цепи [т.е. 1) тяжелую цепь mAb и 2) легкую цепь mAb], тогда как для предложенного здесь биспецифического mAb CD47/PD-L1 клетку-хозяина трансфицируют полинуклеотидами, кодирующими три полипептидные цепи [т.е. 1) тяжелую цепь антитела против CD47, 2) тяжелую цепь антитела против PD-L1 и 3) общую легкую цепь].

Мышиное суррогатное биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 получали с использованием антител, выбранных для связывания с мышинным белком CD47 и мышинным белком PD-L1, названное здесь как «BsAb3».

Пример 4: Аффинность связывания биспецифических антител против CD47/PD-L1 с белками CD47 и PD-L1

CD47/PD-L1 BsAb1, BsAb2, и BsAb3 (описанные в примере 3 выше) оценивали в отношении аффинностей связывания с белками человеческих CD47 и PD-L1, белками CD47 и PD-L1 яванского макака и белками мышиных CD47 и PD-L1. Аффинности обобщены в таблице 18 ниже.

Таблица 18: Аффинность связывания BsAb1, BsAb2 и BsAb3 с различными белками

Биспецифические mAb против CD47/PD-L1:	Человеческий CD47 K _D (нМ)	CD47 яванского макака K _D (нМ)	Мышиный CD47 K _D (нМ)	Человеческий PD-L1 K _D (нМ)	PD-L1 яванского макака K _D (нМ)	Мышиный PD-L1 K _D (нМ)
BsAb1	75, 82*	99	более 6800	0,21	0,21	Н.Д.
BsAb2	496	638	более 6800	0,21	0,21	Н.Д.
BsAb3	Н.Д.	Н.Д.	14	Н.Д.	Н.Д.	1,84

* два независимых измерения; «Н.Д.» - нет данных.

Связывание BsAb1, BsAb2, антитела в качестве положительного контроля (антитела против CD47 P01A11_75) и антитела в качестве отрицательного контроля (антитела против PD-L1 P06B05_245) с человеческим CD47 на клеточной поверхности оценивали путем проточной цитометрии с использованием клеток CHO, полученных для стабильной сверхэкспрессии человеческого CD47. Полученные в результате величины EC₅₀ (т.е. концентрация, при которой 50% белков CD47 связаны с антителом) составляли: BsAb1: 11,8 нМ; BsAb2: 101,2 нМ; антитело P01A11_75: 0,98 нМ; и антитело P06B05_245: не применимо (н.п.).

Связывание BsAb1 и BsAb2 с человеческим PD-L1 на клеточной поверхности оценивали путем проточной цитометрии с использованием клеток CHO, полученных для эктопической сверхэкспрессии человеческого PD-L1. Полученные в результате величины EC₅₀ (т.е. концентрация, при которой 50% белков PD-L1 связаны с антителом) составляли: BsAb1: 0,38 нМ и BsAb2: 0,24 нМ.

Пример 5: Связывание биспецифических антител против CD47/PD-L1 с опухолевыми клетками и эритроцитами

Потенциальное преимущество биспецифического антитела против CD47/PD-L1 по сравнению с моноспецифическим антителом против CD47 заключается в том, что биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 потенциально обладает большей избирательностью в отношении опухолевых клеток и/или иммунных клеток в опухолевом микроокружении (обе из которых могут экспрессировать как CD47, так и PD-L1) по сравнению с клетками крови (например эритроцитами), которые экспрессируют только CD47. Потенциально обладая большей селективностью, чем моноспецифическое антитело против CD47, в отношении клеток в опухолевом микроокружении биспецифическое антитело против CD47/PD-L1 обладает уменьшенной токсичностью по сравнению с моноспецифическим антителом против CD47.

Связывание BsAb1 и BsAb2 с человеческим CD47 сравнивали со связыванием моноспецифических mAb 5F9 против CD47 [Liu, J et al., PLoS One. 2015; 10(9)] и 2A1 (публикация патента США № 20140140989) в смеси, состоящей из опухолевых клеток (т.е. клетки HT1080, которые обладают экспрессией как CD47, так и PD-L1) с эритроцитами (RBC) (экспрессия только CD47) в отношении 1:10. EC₅₀ для связывания антител 5F9 и 2A1 против CD47 с опухолевыми клетками и RBC составляют меньше чем 0,1 нМ при отсутствии избирательности. Наоборот, как BsAb1, так и BsAb2 связываются со 100% опухолевых клеток при менее 0,1 нМ, но EC₅₀ для связывания RBC составляло более 10 нМ, свидетельствуя о, по меньшей мере, 100-кратной избирательности в отношении опухолевых клеток по сравнению с RBC.

Пример 6: Блокирующая активность биспецифических антител против CD47/PD-L1 в отношении взаимодействия CD47 – SIRPα и PD-L1 – PD-1

В этом примере проиллюстрирована блокирующая способность BsAb1 и BsAb2.

Проводили клеточный блокирующий анализ IC₅₀ в отношении SIRPα для тестирования влияния BsAb1 и BsAb2 на связывание белка SIRPα с человеческим CD47, сверхэкспрессирующимся клетками CHO («CHO-hCD47»). Аналогично, проводили клеточный блокирующий анализ IC₅₀ в отношении SIRPα для тестирования влияния BsAb3 на связывание белка SIRPα с мышинным CD47, сверхэкспрессирующимся клетками CHO («CHO-mouseCD47»). Результаты этого анализа представлены в таблице 19 ниже.

Кроме того, проводили клеточный блокирующий анализ IC₅₀ в отношении PD-1 для тестирования влияния BsAb1 и BsAb2 на связывание белка PD-1 с человеческим PD-

L1, сверхэкспрессирующимся клетками CHO («CHO-hPD-L1»). Конкретно, в отношении блокирующей активности PD-L1 взаимодействие PD-1/PD-L1 ингибирует опосредованную TCR люминесценцию при совместном культивировании PD-L1 аAPC/CHO-K1 с эффекторными клетками PD-1 при помощи набора (Promega #J1250). Когда взаимодействие PD-1/PD-L1 прекращается при помощи блокирующих mAb против PD-1, тогда активация TCR вызывает люминесценцию путем активации пути NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток). Также проводили похожий клеточный блокирующий анализ IC₅₀ в отношении PD-1 для тестирования влияния биспецифического BsAb3 на связывание белка PD-1 с мышиным PD-L1, сверхэкспрессирующимся клетками CHO («CHO-mousePD-L1»). Результаты этого анализа также представлены в таблице 19 ниже.

Таблица 19: Блокирующая активность биспецифических антител против CD47/PD-L1

Биспецифическое mAb против CD47/PD-L1:	Блокирующие/ не блокирующие SIRPα	Блокирующие/ не блокирующие PD-1
BsAb1	блокирование, IC ₅₀ =114 нМ	блокирование
BsAb2	блокирование, IC ₅₀ =3693 нМ	блокирование
BsAb3	блокирование, IC ₅₀ =115,2 нМ	блокирование

В соответствии с представленным в таблице 19, каждое из BsAb1, BsAb2 и BsAb3 блокировало взаимодействие между SIRPα и CD47. Дополнительно, каждое из BsAb1, BsAb2 и BsAb3 блокировало взаимодействие между PD-1 и PD-L1.

Пример 7: Активность биспецифических антител против CD47/PD-L1, стимулирующая антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP)

Анализ ADCP

Для тестирования активности антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) человеческие макрофаги дифференцировали от моноцитов, выделенных из PBMC от двух доноров и выращивали вместе с опухолевыми клетками, экспрессирующими как CD47, так и PD-L1 (клетки NCI-H292; легочная

мукоэпидермоидная карцинома) в присутствии биспецифических BsAb1 против CD47/PD-L1. В соответствии с представленным на Фиг. 1, обработка BsAb1 усиливала фагоцитоз макрофагами в отношении человеческих клеток-мишеней NCI-H292, которые экспрессировали как CD47, так и PD-L1. Кроме того, как представлено на Фиг. 1, BsAb1 более эффективно, чем любое из моноспецифического антитела против CD47 (P01A11_75) или моноспецифического антитела против PD-L1 (P06B05_245) в отношении усиления фагоцитоза опухолевых клеток. Например, в концентрации 0,32 нМ % фагоцитоза общих опухолевых клеток в отношении BsAb1 составляет почти 60%, тогда как для моноспецифического антитела против CD47 (P01A11_75) и моноспецифического антитела против PD-L1 (P06B05_245) составляет только приблизительно 30% (Фиг. 1).

Пример 8: Исследования эффективности *in vivo* мышинового суррогатного биспецифического антитела против CD47/PD-L1

В этом примере проиллюстрирована противоопухолевая эффективность биспецифических антител против CD47/PD-L1 в трех синергетических мышинных моделях опухоли [CT26 – модель прогрессирующей опухоли (клетки рака толстой кишки мышей); MC38 – модель умеренной опухоли (клетки рака толстой кишки мышей); B16F10 – модель слабой опухоли (клетки меланомы мышей)].

В модели опухоли CT26 изменения эффективности и массы тела после обработки биспецифическим антителом BsAb3 против CD47/PD-L1 сравнивали с каждым из моноспецифического антитела mAb против mCD47 и моноспецифического антитела mAb против mPD-L1 и в комбинации (Фиг. 2A, 2B и 2C). Кроме того, получали нулевой вариант Fc BsAb3 и включали в эксперимент для оценки вклада опосредованной Fc эффекторной функции в активность BsAb3. После внутрибрюшинного (IP) введения в количестве 100 мкг (приблизительно 5 мг/кг) тремя дозами, вводимыми через трое или четверо суток, эффективность биспецифического антитела BsAb3 против CD47/PD-L1 была статистически лучше, чем самого по себе антитела против CD47 или самого по себе антитела против PD-L1 [Фиг. 2A; обработка BsAb3 (сплошной ромб) приводила в результате к наименьшему объему опухоли для любого из протестированных антител или комбинаций антител]. Кроме того, mAb против CD47 не переносилось в этой дозе, о чем свидетельствует утрата массы тела (Фиг. 2B), тогда как BsAb3 хорошо переносилось в процессе обработки. На Фиг. 2B данные для моноспецифического антитела против CD47 (пустой квадрат) и для моноспецифического антитела против CD47 в комбинации

с моноспецифическим антителом против PD-L1 (инвертированный пустой треугольник) значительно перекрывались. Также, данные для моноспецифического антитела против PD-L1 (сплошной треугольник) и биспецифического BsAb3 против CD47/PD-L1 (сплошной ромб) значительно перекрывались. Данные для нулевого Fc биспецифического BsAb3 против CD47/PD-L1 (пустые окружности) не представлены на Фиг. 2B.] Обработка BsAb3 приводила в результате к ингибированию опухолевого роста, похожего на достигаемое при помощи комбинации mAb против CD47 и против PD-L1, тем не менее, комбинация моноспецифического антитела приводила к более 10% утрате массы тела. Сравнение эффективности BsAb3 с эффекторной функцией IgG и без нее продемонстрировало уменьшенную эффективность для mG2a с нулевым Fc по сравнению с mG2a дикого типа (Фиг. 2A и Фиг. 2C). Среди протестированных соединений обработка BsAb3 с эффекторной функцией mG2a дикого типа (сплошной ромб) приводила в результате к наилучшим исходам выживаемости (Фиг. 2C). Как представлено на Фиг. 2C, животные, обработанные BsAb3 с эффекторной функцией mG2a дикого типа (сплошной черный ромб), обладали приблизительно 75% выживаемостью через 28 суток после обработки. Наоборот, животные, обработанные моноспецифическим антителом против CD47 в комбинации с моноспецифическим антителом против PD-L1 (инвертированный пустой треугольник), обладали приблизительно 65% выживаемостью через 28 суток после обработки. Животные, обработанные BsAb3 с mG2a с нулевым Fc (пустые окружности) обладали приблизительно 25% выживаемостью через 28 суток после обработки.

В модели опухоли MC38 различные дозы биспецифических BsAb3 оценивали в отношении эффективности ингибирования роста опухоли. Мышам, несущим опухоли MC38, внутрибрюшинно вводили 10, 20 или 40 мг/кг BsAb3 два раза в неделю в течение трех недель, в общей сложности 6 доз. В этой модели обнаруженная эффективность обработки 10, 20 или 40 мг/кг составила соответственно приблизительно 25,7%, 52,6% и 75,8% ингибирования опухолевого роста (т.е. по сравнению с изотипическим контрольным антителом) (Фиг. 3A). Все из этих доз хорошо переносились без утраты массы тела (Фиг. 3B).

В модели опухоли B16F19 20 мг/кг BsAb3 оценивали в отношении противоопухолевой эффективности. Мышам, несущим опухоли B16F19, трижды внутрибрюшинно вводили 20 мг/кг биспецифического BsAb3 в неделю в течение трех недель, в общей сложности 9 доз. В этой модели обнаруженная эффективность

обработки 20 мг/кг составила приблизительно 68% ингибирования опухолевого роста (т.е. по сравнению с изотипическим контрольным антителом) (Фиг. 4А). Эта доза хорошо переносилась без значительной утраты массы тела (Фиг. 4В).

Пример 9: Исследования механизма действия мышинового суррогатного биспецифического антитела CD47/PD-L1

В этом эксперименте анализы осуществляли для определения того, какой(ие) тип(ы) иммунных клеток требуются для противоопухолевой эффективности мышинового суррогатного биспецифического антитела против CD47/PD-L1.

Антитела, для которых известно, что они истощают CD8 Т-клетки (антитело против CD8: 2,43), CD4 Т-клетки (антитело против CD4: GK1,5), NK-клетки (антитело против NK1,1: PK136) и опухолеассоциированные клетки (антитело против CSF1R) вводили вместе с мышинным биспецифическим BsAb3 против CD47/PD-L1 (40 мг/кг, дважды в неделю в течение трех недель) мышам, несущим опухоли MC38. Как представлено на Фиг. 5А, 5С и 5D, данные свидетельствуют о том, что эффективность нарушается в отсутствие только самих CD8 Т-клеток (Фиг. 5А) и комбинации CD8 и CD4 Т-клеток (Фиг. 5А), но не в отсутствие только CD4 Т-клеток (Фиг. 5А), в отсутствие NK-клеток (Фиг. 5D), или в отсутствие опухолеассоциированных макрофагов (Фиг. 5С). Кроме того, это исследование также провели на мышах BATF3^{-/-}, лишенных классических субпопуляций дендритных клеток 1 типа (DC1) (CD8α⁺ и CD103⁺) по сравнению мышами C57BL/6 дикого типа (Hildner, K., et al., Science, 2008. 322(5904): p. 1097-100.). В соответствии с представленным на Фиг. 5В эффективность утрачивалась в отсутствие cDC1. [На Фиг. 5В данные для мышей дикого типа, обработанных контрольным антителом (сплошная окружность), мышей BATF3^{-/-}, обработанных контрольным антителом (пустой квадрат), и мышей BATF3^{-/-}, обработанных BsAb3 (сплошной треугольник), тесно перекрывались, в особенности на 25 сутки].

Пример 10: Фармакодинамические эффекты биспецифического антитела против CD47/PD-L1

Задача этого эксперимента заключалась в понимании фармакодинамического эффекта биспецифического антитела против CD47/PD-L1 *in vivo*.

Мышей, несущих опухоли MC38, обрабатывали 5 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг биспецифических BsAb3 на 11, 14 и 18 сутки после трансплантации опухоли. Через три недели после имплантации опухоли у мышей отбирали опухоли и селезенки, и анализировали в отношении различных типов клеток. В соответствии с представленным

в таблицах 20а – 20е существовало дозозависимое увеличение в некоторых субпопуляциях дендритных клеток селезенки (DC), таких как CD8+CD11c+ DCs (таблица 20а). Кроме того, процентная доля DEC205+CD8+CD103+DCs среди CD11c+ значительно увеличивалась в селезенке (таблица 20b). В отношении опухолей существует увеличение Т-клеток (Thy1,2+) (таблица 20с) и CD8+ Т-клеток (таблица 20d), но не CD4+Т-клеток (таблица 20е), свидетельствуя о том, что иммунные клетки как врожденного, так и приобретенного иммунитета, были модулированы после обработки биспецифическимиBsAb3.

Таблица 20а:

CD8+DC (%CD11c) в селезенке		
Группа	Среднее значение	Стандартная ошибка среднего
Контроль	29,84	4,80
BsAb3_5 мг/кг	26,32	3,50
BsAb3_10 мг/кг	52,50	4,02
BsAb3_20 мг/кг	60,80	1,53

Таблица 20b:

CD103+DC (%CD11c) в селезенке		
Группа	Среднее значение	Стандартная ошибка среднего
Контроль	8,76	3,21
BsAb3_5 мг/кг	9,17	2,09
BsAb3_10 мг/кг	17,23	5,22
BsAb3_20 мг/кг	31,16	1,69

Таблица 20с:

Т-клетки (%CD45) в опухоли		
Группа	Среднее значение	Стандартная ошибка среднего
Контроль	19,08	2,49

BsAb3_5 мг/кг	33,02	2,57
BsAb3_10 мг/кг	39,12	3,83
BsAb3_20 мг/кг	41,02	3,19

Таблица 20d:

CD8 Т-клетки (%CD45) в опухоли		
Группа	Среднее значение	Стандартная ошибка среднего
Контроль	6,44	0,77
BsAb3_5 мг/кг	14,48	1,68
BsAb3_10 мг/кг	19,52	1,71
BsAb3_20 мг/кг	19,40	1,61

Таблица 20e:

CD4 Т-клетки (%CD45) в опухоли		
Группа	Среднее значение	Стандартная ошибка среднего
Контроль	8,79	1,46
BsAb3_5 мг/кг	14,00	0,78
BsAb3_10 мг/кг	14,61	2,63
BsAb3_20 мг/кг	15,15	1,90

Пример 11: Исследования эффективности BsAb1 против CD47/PD-L1 *in vivo*

Задача этого эксперимента заключалась в том, чтобы протестировать эффективность BsAb1 и BsAb2 против CD47/PD-L1 *in vivo*.

Иммунодефицитных мышей NSG подкожно инокулировали в правый бок 2×10^6 клеток MDA-MB-231 трижды негативного рака молочной железы человека. Эти клетки эндогенно сверхэкспрессировали как CD47, так и PD-L1. Когда опухоли достигали желаемого размера, мышей случайным образом распределяли по группам для обработки. Обработку начинали в те же сутки, как и случайное распределение. Мышей обрабатывали 10 мг/кг mAb изотипа hIgG1 (контроль) или 1, 5 или 10 мг/кг BsAb1 или BsAb2 против CD47/PD-L1 один раз в неделю в течение 6 недель. Размер опухоли измеряли с различными интервалами в 2 измерениях с использованием штангенциркуля,

и объем рассчитывали в кубических миллиметрах с использованием формулы: $V = 0,5 L \times W^2$, где L представляет собой самый длинный диаметр опухоли и W представляет собой диаметр, перпендикулярный L.

Результаты представлены на Фиг. 6. В соответствии с представленным на Фиг. 6, обработка 5 или 10 мг/кг BsAb1 или BsAb2 против CD47/PD-L1 с гистидиновой концевой маркерной последовательностью существенно замедляла рост опухоли MDA-MB-231 по сравнению с изотипическим контролем. Конкретно, для BsAb1 ингибирование опухолевого роста (TGI) по сравнению с изотипом антитела составило 16,8%, 68,4% и 78,7% соответственно для доз 1 мг/кг, 5 мг/кг и 10 мг/кг. Для BsAb2 ингибирование опухолевого роста (TGI) по сравнению с изотипом антитела составило 6,9%, 62,8% и 74,1% соответственно для доз 1 мг/кг, 5 мг/кг и 10 мг/кг. [На Фиг. 6 точки данных для антитела в качестве изотипического контроля (сплошная окружность), 1 мг/кг BsAb1 (сплошной треугольник) и 1 мг/кг BsAb2 (пустые окружности) как правило близки друг к другу или перекрываются. Аналогично, точки данных для 5 мг/кг BsAb1 (пустой ромб), 10 мг/кг BsAb1 (пустой треугольник), 5 мг/кг BsAb2 (сплошной ромб) и 10 мг/кг BsAb2 (сплошной квадрат) как правило близки друг к другу, причем 10 мг/кг BsAb1 обладает самыми низкими значениями.]

Пример 11: Исследования токсичности BsAb1 и BsAb2 против CD47 / против PD-L1 у яванского макака

Задача этого эксперимента заключалась в осуществлении поисковых исследований токсичности (ETS) с BsAb1 с гистидиновой концевой маркерной последовательностью и BsAb2 с гистидиновой концевой маркерной последовательностью у яванского макака. BsAb1 и BsAb2 обладают похожими аффинностями связывания в отношении группировок человеческих CD47 и PD-L1 и группировок CD47 и PD-L1 яванского макака, и связываются с эритроцитами и тромбоцитами яванского макака с аффинностью, похожей на аффинность человеческих эритроцитов и тромбоцитов. Соответственно, эти данные поддерживают применение яванского макака в качестве вида, который пригоден для определения токсичности BsAb1 и BsAb2 против CD47/PD-L1.

Для каждого из BsAb1 и BsAb2 одной обезьяне вводили дозы 10 мг/кг, одной обезьяне вводили дозы 30 мг/кг и 3 обезьянам вводили 100 мг/кг. mAb вводили внутривенно на 1 и 8 сутки. На 15 сутки образцы от каждой обезьяны анализировали в отношении различных субпопуляций иммунных клеток и цитокинов, как представлено

в таблицах 21-24 ниже. В таблицах 21 и 23 приведены данные относительно активации и/или пролиферации различных субпопуляций иммунных клеток после введения обезьянам различных доз BsAb1 или BsAb2. В таблицах 22 и 24 приведены данные относительно увеличения уровня различных цитокинов после введения обезьянам различных доз BsAb1 или BsAb2.

В нижеприведенных таблицах НИ = нет изменений; IL = интерлейкин; IFN = интерферон; MCP = белок-хемоаттрактант моноцитов; IP = белок, индуцируемый интерфероном. Отношения (например «1/1» или «2/3») относятся к количеству обезьян, которые испытывают изменение параметра, по сравнению с общим количеством обезьян в обрабатываемой группе. Например «2/3» указывает на то, что две из трех обезьян при обработке демонстрируют изменения соответствующего параметра. Величины, приведенные в скобках [например «(4,9х)»] представляют кратность изменений по сравнению с базовым уровнем; диапазон величин приведен в скобках тогда, когда приведены данные для двух или более чем двух обезьян [например «(4,0х-9,2х)»].

Таблица 21: Активация/пролиферация иммунных клеток посредством BsAb1 против CD47/PD-L1

	Разбавитель	Доза 10 мг/кг	Доза 30 мг/кг	Доза 100 мг/кг
% активированных (CD69+) CD4+ Т- клеток	(0,42х-1,63х)	1/1 (2,64х)	1/1 (3,20х)	2/3 (2,86х-3,07х)
% активированных (CD25+) CD8+ Т- клеток	(0,52х-1,96х)	НИ	1/1 (3,61х)	2/3 (4,01х-6,47х)
% пролиферирующих (Ki-67+) CD4+ Т- клеток	(1,00х-1,76х)	НИ	НИ	3/3 (2,56х-3,28х)
% пролиферирующих (Ki-67+) CD8+ Т- клеток	(0,62х-2,94х)	НИ	НИ	1/3 (6,46х)

% активированных (CD83+) моноцитов	(0,36х-1,82х)	НИ	1/1 (21,94х)	3/3 (4,40х- 39,40х)
--	---------------	----	---------------------	-------------------------------

Таблица 22: Действие BsAb1 против CD47/PD-L1 на уровни цитокинов

	Разбавитель	Доза 10 мг/кг	Доза 30 мг/кг	Доза 100 мг/кг
IL-6	(менее 1,0х- 1,9х)	НИ	1/1 (4,9х)	3/3 (4,0х-9,2х)
IFN- γ	(менее 1,0)	НИ	НИ	1/3 (4,9х)
MCP-1/CCL2	(0,9х-2,7х)	НИ	1/1 (более 4,8х)	3/3 (4,4х-5,6х)
IP-10/CXCL10	(0,4х-1,0х)	НИ	1/1 (5,6х)	2/3 (5,7х-7,2х)

Таблица 23 Активация/пролиферация иммунных клеток посредством BsAb2 против CD47/PD-L1

	Разбавитель	Доза 10 мг/кг	Доза 30 мг/кг	Доза 100 мг/кг
% активированных (CD69+) CD4+ Т- клеток	(0,42х-1,63х)	1/1 (4,07х)	НИ	3/3 (2,44х-6,21х)
% активированных (CD25+) CD8+ Т- клеток	(0,52х-1,96х)	НИ	1/1 (3,40х)	1/3 (12,75х)
% пролиферирующих (Ki-67+) CD4+ Т- клеток	(1,00х-1,76х)	НИ	1/1 (3,29х)	2/3 (2,26х-4,23х)
% пролиферирующих (Ki-67+) CD8+ Т- клеток	(0,62х-2,94х)	НИ	1/1 (4,68х)	НИ

% активированных (CD83+) моноцитов	(0,36х-1,82х)	1/1 (4,58х)	1/1 (12,80х)	2/3 (4,66х-6,80х)
--	---------------	--------------------	---------------------	--------------------------

Таблица 24: Действие BsAb2 против CD47/PD-L1 на уровне цитокинов

	Разбавитель	Доза 10 мг/кг	Доза 30 мг/кг	Доза 100 мг/кг
IL-6	(менее 1,0х- 1,9х)	НИ	1/1 (4,4х)	2/3 (7,8х-13,3х)
MCP-1/CCL2	(0,9х-2,7х)	НИ	1/1 (более 3,6х)	3/3 (3,3х- более 7,1х)
IP- 10/CXCL10	(0,4х-1,0х)	НИ	1/1 (4,4х)	1/3 (9,8х)

В соответствии с указанным в таблицах 21 и 23, существовало свидетельство активации и/или пролиферации Т-клеток и активации моноцитов у яванских макаков, которым вводили BsAb1 и BsAb2. Кроме того, существовало свидетельство слабого временного увеличения уровня цитокинов, связанных с моноцитами/макрофагами/DC (дендритными клетками) или Т-клетками, включающих IL6, INFg, CCL2, CXCL10, как представлено в таблицах 22 и 24. В совокупности эти данные поддерживают фармакологическую активность и активацию иммунной системы у яванского макака путем введения BsAb1 и BsAb2 против CD47/против PD-L1.

Пример 12: Комбинированная обработка: биспецифическое mAb против CD47/PD-L1 с агонистом TLR9

Данный пример демонстрирует терапевтическую активность mAb против CD47/против PD-L1 в комбинации с агонистом TLR9.

Мышинное суррогатное биспецифическое BsAb3 против CD47/PD-L1 описано выше. Биспецифическое BsAb3 вводили в субэффективной дозе 10 мг/кг в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) дважды в неделю на протяжении двух недель (в общей сложности 4 дозы).

Агонист TLR9 представлял собой CpG24555, который представлял собой олигонуклеотид (ODN) CpG класса В. CpG ODN представляет собой синтетические ODN, которые содержат неметилованные динуклеотиды CpG в специфических контекстах последовательности (мотивы CpG). CpG24555 описан, например, в патенте

США № 8552165, который включен здесь для всех задач. CpG24555 внутриопухолево (в.о.) вводили в одной дозе 5 мг/кг в физиологическом растворе, забуференном фосфатом (PBS) (Life Technologies), через 11 суток после инокуляции опухоли.

Самок мышей C57BL/6 в возрасте от шести до восьми недель приобретали в Jackson Laboratories. Всех животных содержали в виварии без патогенов в Pfizer, и эксперименты проводили в соответствии с протоколами, удовлетворяющими указаниям Комитета по содержанию и использованию лабораторных животных (IACUC).

Клеточную линию клеток рака толстой кишки MC38 приобретали в Американской коллекции типовых культур (ATCC). Клетки без патогенов, растущие в экспоненциальной фазе, собирали и использовали для инокуляции опухоли.

Мышам C57BL/6 подкожно инокулировали в правый бок $0,5 \times 10^5$ клеток MC38 в 0,1 мл PBS. Когда опухоли достигали желаемого размера, мышей случайным образом распределяли между обрабатываемыми группами. Обработку начинали в те же самые сутки, как случайное распределение. Размер опухоли измеряли с различными интервалами в 2 измерениях с использованием штангенциркуля, и объем рассчитывали в кубических миллиметрах с использованием формулы: $V = 0,5 L \times W^2$, где L представляет собой самый длинный диаметр опухоли и W представляет собой диаметр, перпендикулярный L. Массы тела также регистрировали.

Результаты представлены на Фиг. 7. В соответствии с представленным на Фиг. 7, обработка как биспецифическим BsAb3 против CD47/PD-L1 (пустой квадрат), так и агонистом TLR9 (сплошной инвертированный треугольник) замедляла опухолевый рост рака прямой кишки MC38 по сравнению с изотипическим контролем (сплошная окружность), и комбинация биспецифического BsAb3 против CD47/PD-L1 с агонистом TLR9 (пустой треугольник) обладала большей эффективностью, чем агентами биспецифическим BsAb3 против CD47/PD-L1 и TLR9 по отдельности. [на Фиг. 7 точки данных для биспецифического BsAb3 против CD47/PD-L1 (пустой квадрат) и агониста TLR9 (сплошной инвертированный треугольник) в значительной степени перекрываются.]

Увеличенная эффективность, обнаруженная при комбинированной обработке биспецифическим mAb против CD47/PD-L1 и агонистом TLR9, согласуется с совокупными данными по секвенированию опухолевой РНК, которые демонстрировали увеличение экспрессии CD47 и PD-L1 в опухолевых клетках B16F10 в ответ на

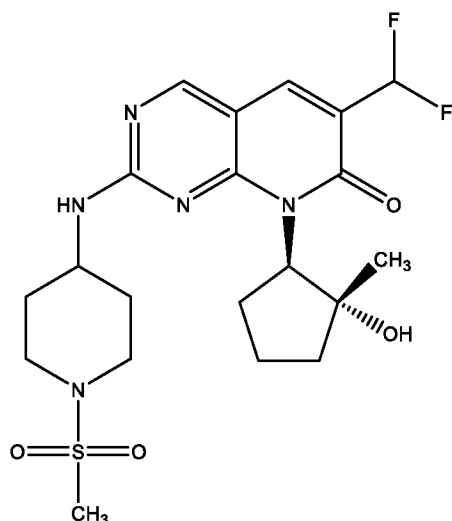
внутриопухолевое введение агонистов TLR3, TLR7/8, TLR9 или STING (данные не представлены).

Пример 13: Комбинированная обработка: биспецифическое mAb против CD47/PD-L1 с ингибитором CDK 2/4/6

Данный пример иллюстрирует терапевтическую активность mAb против CD47/PD-L1 в комбинации с ингибитором циклинзависимой киназы (CDK) 2/4/6.

Мышиное суррогатное биспецифическое BsAb3 против CD47/PD-L1 описано выше. Биспецифическое BsAb3 вводили в дозе 20 мг/кг в физиологическом растворе, забуференном фосфатом (PBS), три раза в неделю на протяжении трех недель.

Ингибитор CDK 2/4/6 представлял собой PF-06873600. PF-06873600 или 6-(дифторметил)-8-((1R,2R)-2-гидрокси-2-метилциклопентил)-2-(1-(метилсульфонил)пиперидин-4-иламино)пиродо[2,3-d]пиримидин-7(8H)-он, являлся сильным и избирательным ингибитором CDK2, CDK4 и CDK6, имеющим структуру:



PF-06873600 и его фармацевтически приемлемые соли раскрыты в Международной заявке на патент WO 2018/033815, опубликованной 22 февраля 2018 года. Содержимое этого источника включено здесь путем ссылки.

Самок мышей C57BL/6 в возрасте от шести до восьми недель приобретали в Jackson Laboratories. Всех животных содержали в виварии без патогенов в Pfizer, и эксперименты проводили в соответствии с протоколами, удовлетворяющими указаниям Комитета по содержанию и использованию лабораторных животных (IACUC).

Клеточную линию клеток меланомы B16F10 приобретали в Американской коллекции типовых культур (ATCC). Клетки без патогенов, растущие в экспоненциальной фазе, собирали и использовали для инокуляции опухоли.

Мышам C57BL/6 подкожно инокулировали в правый бок $0,5 \times 10^5$ клеток B16F10 в 0,1 мл PBS. Когда опухоли достигали желаемого размера, мышей случайным образом распределяли между обрабатываемыми группами. Обработку начинали в те же самые сутки, как случайное распределение. Размер опухоли измеряли с различными интервалами в 2 измерениях с использованием штангенциркуля, и объем рассчитывали в кубических миллиметрах с использованием формулы: $V = 0,5 L \times W^2$, где L представляет собой самый длинный диаметр опухоли и W представляет собой диаметр, перпендикулярный L . Массы тела также регистрировали.

Результаты представлено на Фиг. 8. В соответствии с представленным на Фиг. 8, обработка как биспецифическим BsAb3 против CD47/PD-L1 (сплошной треугольник) и ингибитором PF-06873600 CDK 2/4/6 (пустой квадрат) замедляла опухолевый рост меланомы B16F10 по сравнению с изотипическим контролем (сплошная окружность), и комбинация биспецифического mAb против CD47/PD-L1 и PF-06873600 (пустой ромб) обладала большей эффективностью, чем агенты биспецифического mAb против CD47/PD-L1 и PF-06873600 по отдельности.

Увеличенная эффективность, обнаруженная для комбинированной обработки биспецифическим mAb против CD47/PD-L1 и ингибитором CDK2/4/6, согласуется с данными, которые при помощи проточной цитометрии демонстрируют увеличение экспрессии CD47 и PD-L1 на опухолевых клетках B16F10 в ответ на введение PF-06873600 (данные не представлены).

Хотя раскрытые идеи описаны со ссылкой на различные применения, способы, наборы и композиции, понятно, что различные изменения и модификации могут быть осуществлены без отступления от изложенных здесь идей и формулы изобретения ниже. Вышеприведенные примеры предложены для того, чтобы лучше проиллюстрировать раскрытые идеи, и не предназначены для ограничения объема представленных здесь идей. Хотя идеи в настоящем изобретении описаны с точки зрения этих примеров воплощений, специалисту в данной области техники понятно, что многочисленные вариации и модификации этих примеров воплощений возможны без излишнего экспериментирования. Все такие вариации и модификации находятся в объеме настоящего изобретения.

Все цитируемые здесь ссылки, включая патенты, заявки на патенты, статьи, учебные пособия и т.п., и цитируемые в них ссылки включены здесь в полном объеме. В случае, когда один или более чем один из включенных литературных и подобных

материалов отличается от или противоречит данной заявке на изобретение, включая без ограничения определенные термины, используемые термины, описанные способы и т.п., следует придерживаться данной заявки на изобретение.

Предшествующее описание изобретения и примеры детализируют некоторые конкретные воплощения изобретения и описывают лучший способ, рассмотренный авторами изобретения. Тем не менее, понятно, что, не важно, насколько детализированное предшествующее описание может быть представлено в тексте, изобретение может быть практически реализовано множеством путей, и изобретение должно быть истолковано в соответствии с формулой изобретения и любым ее эквивалентом.

Понятно, что везде, где воплощения описаны здесь с термином «содержащим», также предложены другие аналогичные воплощения, описанные с термином «состоящий из» и/или «по существу состоящий из».

Когда аспекты или воплощения изобретения описаны в терминах группы Маркуша или другой группировки альтернатив, настоящее изобретение охватывает не только всю группу, перечисленную в целом, но каждый член группы индивидуально и все возможные подгруппы основной группы, а также основную группу, в которой отсутствует один или более чем один член группы. Настоящее изобретение также предусматривает явное исключение одного или более чем одного из любых членов группы в заявленном изобретении.

В воплощениях, которые относятся к описанному здесь способу лечения, такие воплощения также дополнительно относятся к воплощениям для применения при данном лечении, или альтернативно для изготовления лекарственного средства для применения при таком лечении.

Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же самое значение, которое обычно понимает специалист в области техники, к которой относится данное изобретение. В случае конфликта следует придерживаться настоящего описания изобретения, включающего определения. В этом описании изобретения и формуле изобретения, слово «содержат» или вариации, такие как «содержит» или «содержащую», как будет понятно, подразумевают включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключения любого другого целого числа или группы целых чисел. Если иное не требуется в соответствии с контекстом, то термины единственного числа включают множественные числа, и

термины множественного числа включают единственное число. Любой(ые) пример(ы), следующий(е) за термином «к примеру» или «например», не является(ются) исчерпывающим(и) или ограничивающим(и). Термин «или», когда он используется в контексте перечня нескольких вариантов (например «А, В, или С») следует интерпретировать таким образом, чтобы включать любой один или более чем один из вариантов, если из контекста явно не следует иное.

Здесь описаны примеры способов и материалов, хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным здесь, также могут быть использованы на практике или при тестировании в соответствии с настоящим изобретением. Материалы, способы и примеры приведены исключительно для иллюстрации и не предполагаются как ограничивающие.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое специфически связывается с CD47 и содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), где VH содержит (1) определяющую комплементарность область (CDR) 1 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, 14, 15, 22, 23, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 37, 38 или 39; (2) VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, 17, 28, 29, 34 или 35; (3) VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, 24, 30, 36 или 40; (4) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 53; (5) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или 54; и (6) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или 55.

2. Антитело по п. 1, где VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8 или 9.

3. Антитело по любому из пп. 1-2, где VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 6.

4. Выделенное антитело, которое специфически связывается с CD47, где антитело содержит: переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

5. Выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-L1 и содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), где VH содержит (1), определяющую комплементарность область (CDR) 1 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, 42, 43, 47, 48 или 49; (2) VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, 45, 50, 51, 58 или 59; и (3) VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, 52, 56, 57 или 60; (4) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 53; (5) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или 54; и (6) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или 55.

6. Антитело по п. 5, где VH содержит последовательность SEQ ID NO: 4, 5, 10, 11 или 12.

7. Антитело по любому из пп. 5-6, где VL содержит последовательность SEQ ID NO: 2 или 6.

8. Выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-L1, где антитело содержит: переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

9. Антитело по любому из пп. 1-8, которое представляет собой биспецифическое антитело.

10. Антитело по п. 9, где биспецифическое антитело специфически связывается с CD47 и PD-L1.

11. Антитело по п. 10, которое содержит первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, где первый антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с CD47 и второй антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с PD-L1, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и VL, где второй антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и VL, и где аминокислотная последовательность VL первого антигенсвязывающего фрагмента и аминокислотная последовательность VL второго антигенсвязывающего фрагмента имеют одну и ту же аминокислотную последовательность.

12. Антитело по п. 11, где аминокислотная последовательность VL первого антигенсвязывающего фрагмента и аминокислотная последовательность VL второго антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

13. Выделенное биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD47, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-L1, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и VL, где второй антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и VL, и где выполняются одно, два, три или все четыре из условий:

а) первый антигенсвязывающий фрагмент VH содержит (1) VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, 14, 15, 22, 23, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 37, 38 или 39; (2) VH CDR2, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 16, 17, 28, 29, 34 или 35; и (3) VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, 24, 30, 36 или 40;

б) первый антигенсвязывающий фрагмент VL содержит (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 53; (ii) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или 54; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или 55;

в) второй антигенсвязывающий фрагмент VH содержит (1) VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, 42, 43, 47, 48 или 49; (2) VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, 45, 50, 51, 58 или 59; и (3) VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, 52, 56, 57 или 60; и

г) второй антигенсвязывающий фрагмент VL содержит (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 53; (2) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или 54; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или 55.

14. Биспецифическое антитело по п. 13, где выполняются одно, два, три или все четыре из условий:

а) первый антигенсвязывающий фрагмент VH содержит (1) VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, 14 или 15; (2) VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 17; и (3) VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;

б) первый антигенсвязывающий фрагмент VL содержит (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; (2) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;

в) второй антигенсвязывающий фрагмент VH содержит (1) VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, 42 или 43; (2) VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44 или 45; и (3) VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; и

г) второй антигенсвязывающий фрагмент VL содержит (1) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; (2) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и (3) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

15. Биспецифическое антитело по любому из пп. 13-14, где выполняются одно, два, три или все четыре из условий:

- а) первый антигенсвязывающий фрагмент VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 3;
- б) первый антигенсвязывающий фрагмент VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;
- в) второй антигенсвязывающий фрагмент VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; и
- г) второй антигенсвязывающий фрагмент VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

16. Выделенное биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD47, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-L1, где антитело содержит первый антигенсвязывающий фрагмент VH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, первый антигенсвязывающий фрагмент VL, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, второй антигенсвязывающий фрагмент VH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и второй антигенсвязывающий фрагмент VL, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

17. Биспецифическое антитело по любому из пп. 9-16, содержащее домен Fc.

18. Биспецифическое антитело по п. 17, где домен Fc представляет собой домен Fc IgG1, домен Fc IgG2 или домен Fc IgG4.

19. Биспецифическое антитело по любому из пп. 17-18, где первая цепь Fc и вторая цепь Fc домена Fc содержат одну или более чем одну модификацию, способствующую ассоциации первой цепи Fc со второй цепью Fc.

20. Биспецифическое антитело по любому из пп. 17-19, содержащее тяжелую цепь против CD47, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 или 63, и содержащее тяжелую цепь против PD-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.

21. Биспецифическое антитело по любому из пп. 17-20, дополнительно содержащее легкую цепь против CD47, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 62, и легкую цепь против PD-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62.

22. Выделенное биспецифическое антитело, специфически связывающееся с CD47 и PD-L1,

где антитело содержит первую тяжелую цепь антитела, вторую тяжелую цепь антитела, первую легкую цепь антитела и вторую легкую цепь антитела;

где первая тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 и вторая тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; и

где как первая легкая цепь антитела, так и вторая легкая цепь антитела содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62.

23. Биспецифическое антитело по любому из пп. 9-22, где аффинность антигенсвязывающего фрагмента антитела против PD-L1 в отношении PD-L1 больше, чем аффинность антигенсвязывающего фрагмента антитела против CD47 в отношении CD47.

24. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антитела по любому из пп. 1-8 или биспецифического антитела по любому из пп. 9-23 и фармацевтически приемлемый носитель.

25. Выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, предложенную в любом из пп. 1-22.

26. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 25.

27. Клетка-хозяин, которая содержит рекомбинантный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, предложенную в любом из пп. 1-22.

28. Способ продуцирования антитела или биспецифического антитела, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 27 в условиях, которые приводят к продуцированию антитела по любому из пп. 1-8 или биспецифического антитела по любому из пп. 9-23, и очистку продуцируемого антитела или биспецифического антитела.

29. Применение антитела по любому из пп. 1-8, биспецифического антитела по любому из пп. 9-23, фармацевтической композиции по п. 24, полинуклеотида по п.

25, вектора по п. 26 или клетки-хозяина по п. 27 для изготовления лекарственного средства для применения в лечении рака.

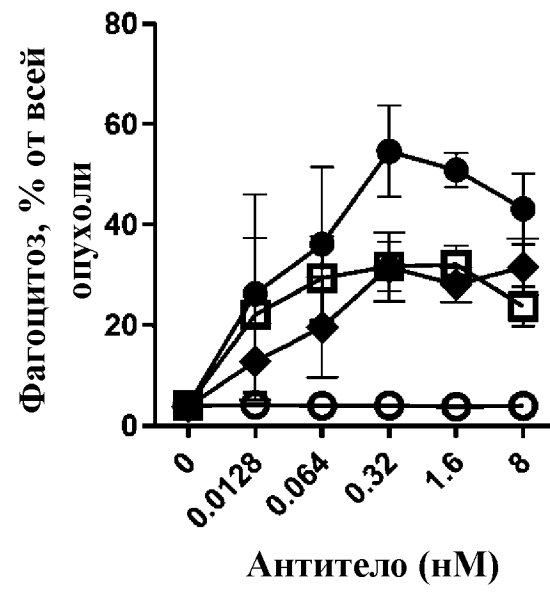
30. Антитело по любому из пп. 1-8, биспецифическое антитело по любому из пп. 9-23 или фармацевтическая композиция по п. 24 для применения в качестве лекарственного средства.

31. Антитело, биспецифические антитело или фармацевтическая композиция для применения по п. 30, где лекарственное средство предназначено для применения в лечении рака.

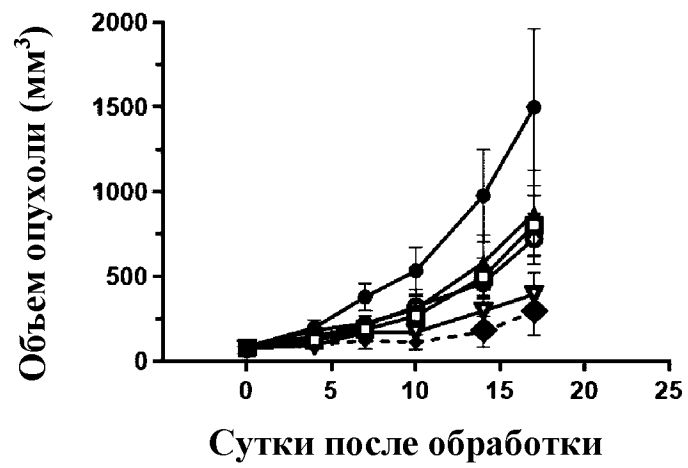
32. Способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в таком лечении, где способ включает введение субъекту эффективного количества антитела по любому из пп. 1-8, биспецифического антитела по любому из пп. 9-23 или фармацевтической композиции по п. 24.

33. Способ по п. 32, дополнительно включающий введение субъекту второго терапевтического агента.

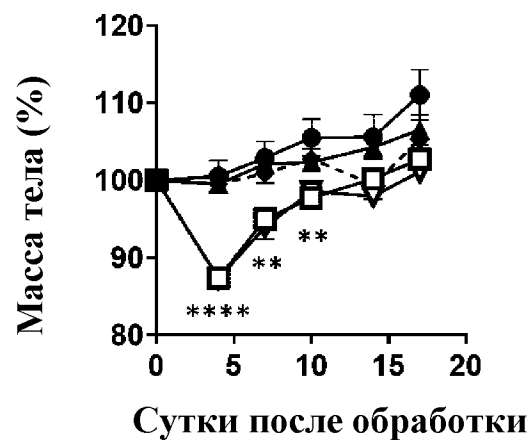
34. Способ по п. 32, или антитело, биспецифические антитело или фармацевтическая композиция для применения по п. 31, где рак представляет собой рак желудка, саркому, лимфому, Ходжкинскую лимфому, лейкоз, рак головы и шеи, рак вилочковой железы, эпителиальный рак, рак слюнных желез, рак печени, рак желудка, рак щитовидной железы, рак легкого (включающий, например, немелкоклеточный рак легкого), рак яичников, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак пищевода, рак поджелудочной железы, глиому, лейкоз, множественную миелому, почечно-клеточную карциному, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, хориокарциному, рак толстой кишки, рак ротовой полости, глиобластому, рак кожи или меланому.



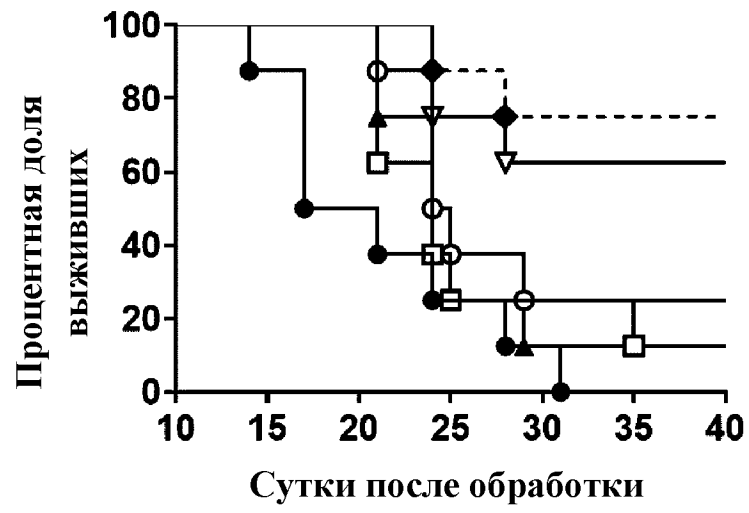
Фиг. 1



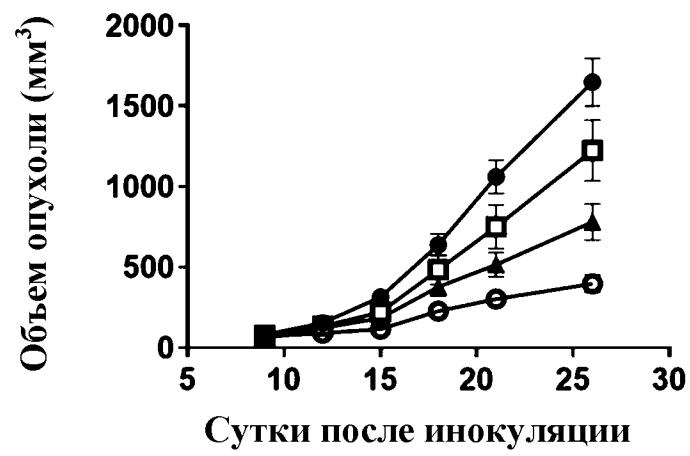
Фиг. 2А



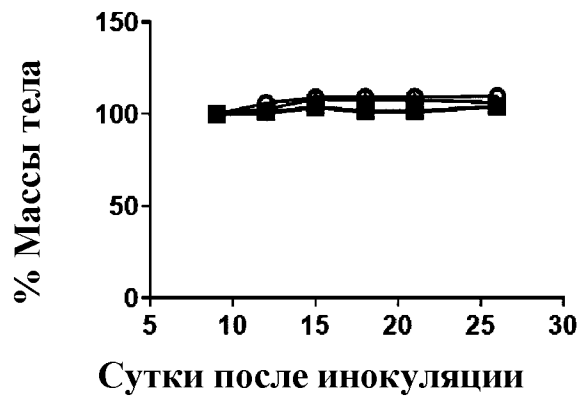
Фиг. 2В



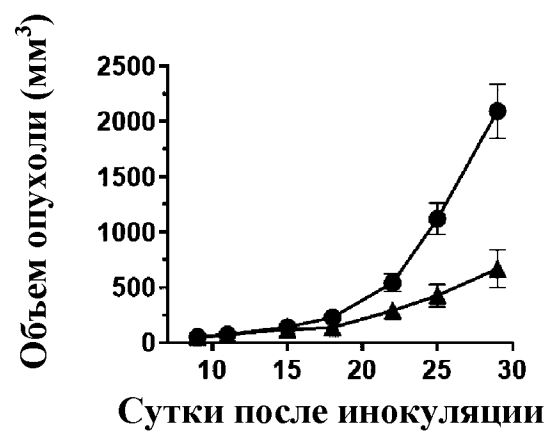
Фиг. 2С



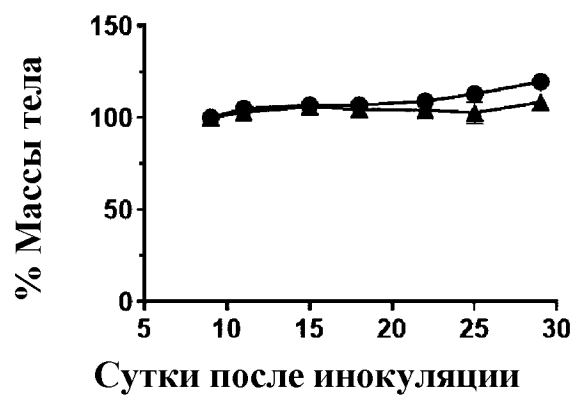
Фиг. 3А



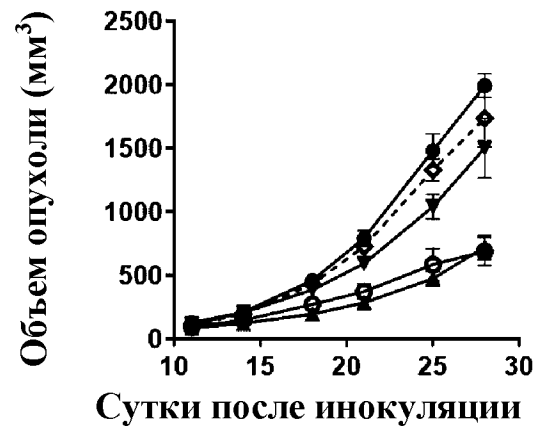
Фиг. 3В



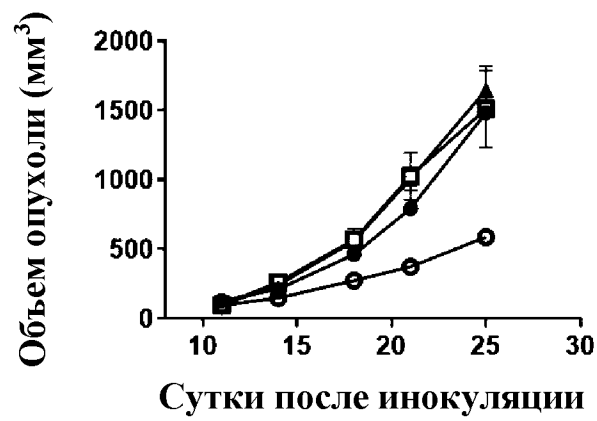
Фиг. 4А



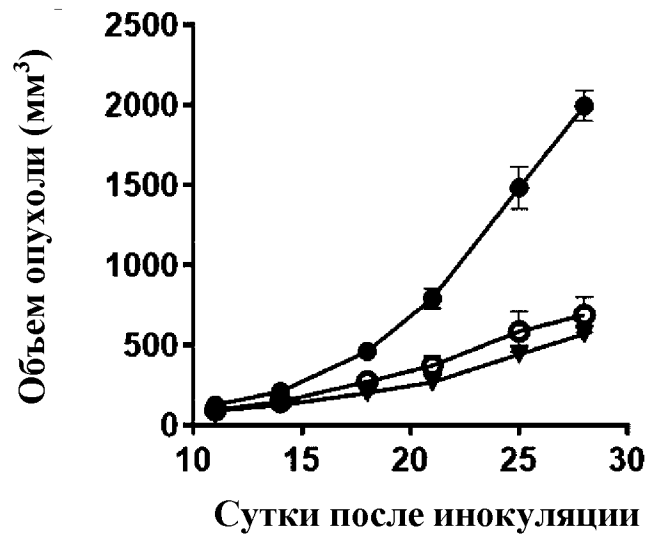
Фиг. 4В



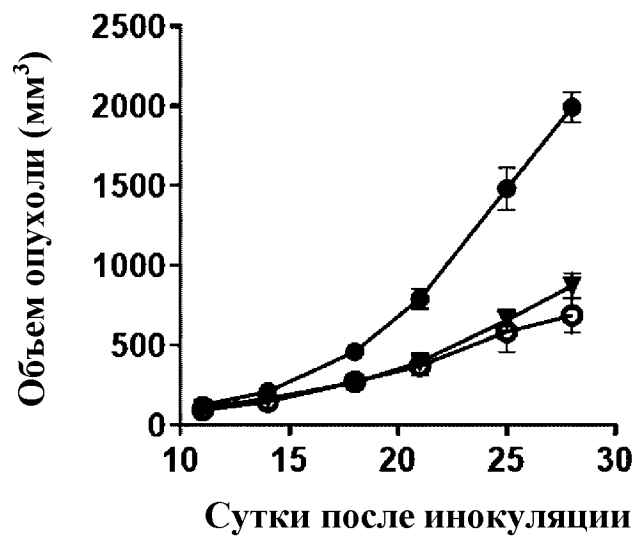
Фиг. 5А



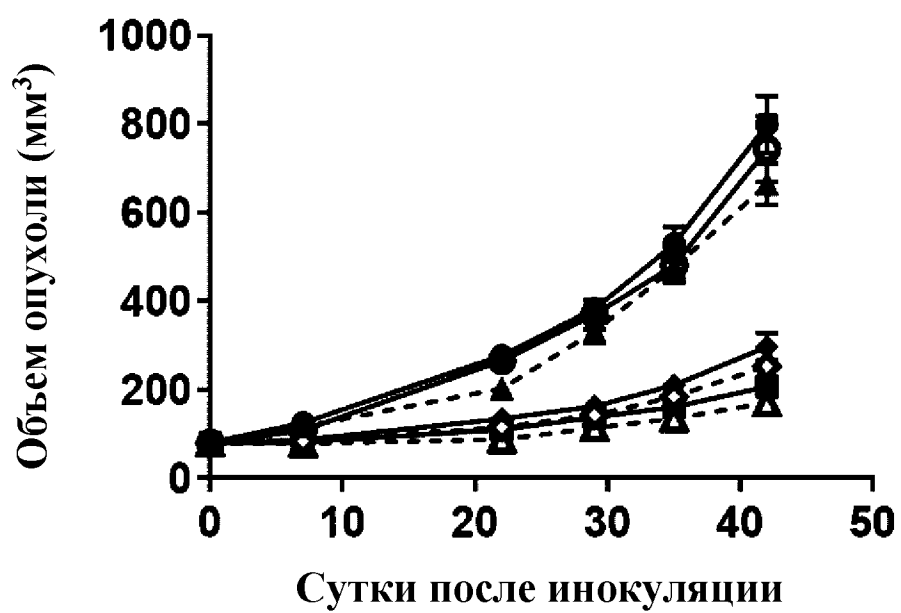
Фиг. 5В



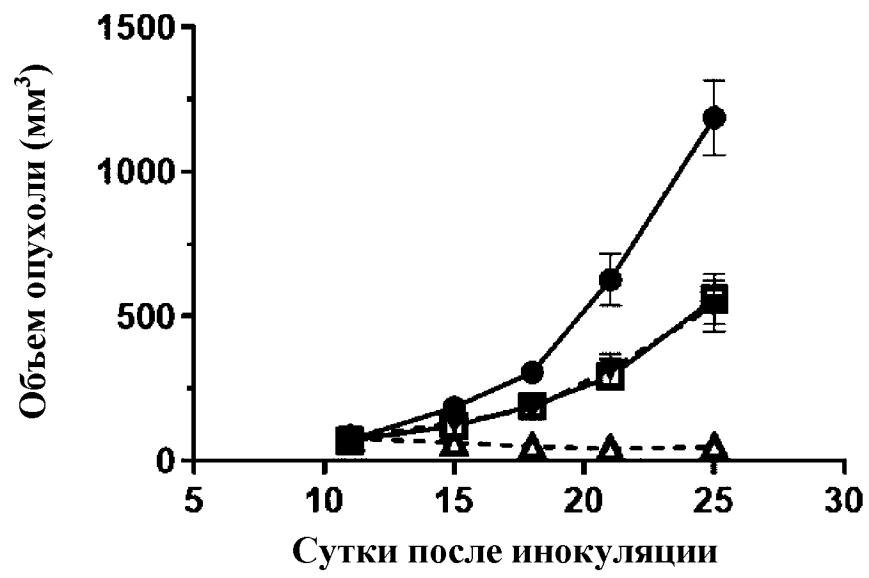
Фиг. 5С



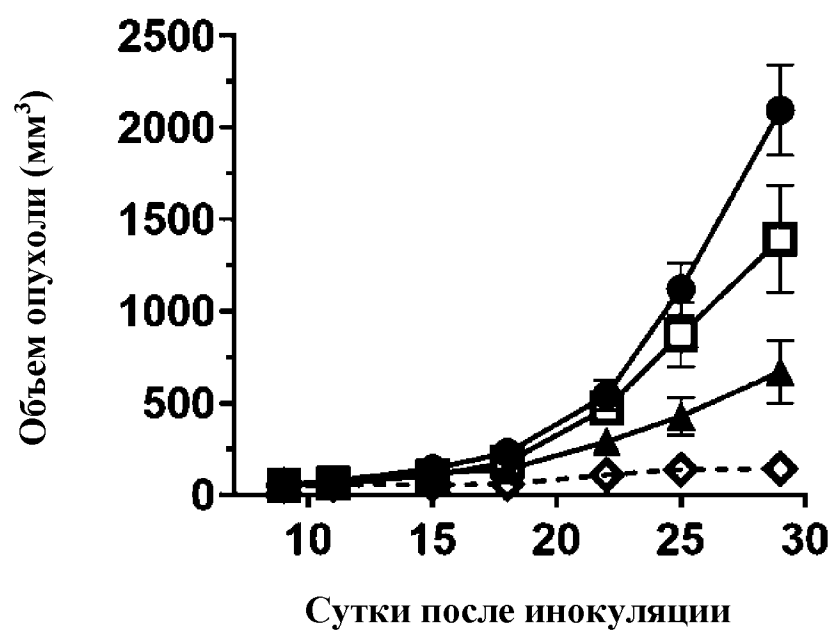
Фиг. 5D



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8