

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 043281

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.05

(21) Номер заявки
202090415

(22) Дата подачи заявки
2018.07.30

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

(54) АНТИ-CD47 АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/540,118; 62/657,094

(32) 2017.08.02; 2018.04.13

(33) US

(43) 2020.06.02

(86) PCT/US2018/044384

(87) WO 2019/027903 2019.02.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФЕЙНЗ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ван Минхань, Цзоу Хой, Оукс
Джошуа, Цзя Хайцюнь (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A2-2012031273
WO-A1-2014078373
WO-A1-2011042548
WO-A2-2013104918

(57) Описаны анти-CD47 антитела и антигенсвязывающие фрагменты. Также описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие эти антитела, композиции, содержащие антитела, и способы получения антител и применения антител для лечения или профилактики заболеваний, таких как злокачественная опухоль, воспалительное заболевание, инфекционное заболевание, артериосклероз, сердечно-сосудистое заболевание, нарушения метаболизма, радиационное поражение и/или аутоиммунное заболевание.

043281

B1

043281

B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США 62/540118, поданной 2 августа 2017 г., и предварительной заявке на патент США 62/657094, поданной 13 апреля 2018 г., каждая из которых включена в настоящее описание во всей полноте в качестве ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к моноклональным анти-CD47 антителам, нуклеиновым кислотам и векторам экспрессии, кодирующим эти антитела, рекомбинантным клеткам, содержащим эти векторы, и композициям, содержащим указанные антитела. Также предложены способы получения антител и способы применения этих антител для лечения заболеваний, включая злокачественную опухоль, воспалительные заболевания, инфекционные заболевания, артериосклероз, сердечно-сосудистое заболевание, нарушения метаболизма, радиационное поражение, и/или аутоиммунные заболевания.

Ссылка на список последовательностей, представленный в электронной версии

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который представлен в электронном виде через EFS-Web в виде списка последовательностей в формате ASCII с названием файла "689204.2WO Sequence Listing" и датой создания файла 05 июля 2018 г. размером 95 кБ. Список последовательностей, представленный через EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки.

Уровень техники

Злокачественные клетки могут развивать различные защитные способности, позволяющие избежать атаку со стороны хозяина, в том числе со стороны иммунной системы. Они либо придают своей клеточной поверхности естественный внешний вид, соответствующий клеточной поверхности нормальной клетки человека, либо прерывают иммунную атаку при захвате иммунными клетками. В пользу последнего механизма однозначно свидетельствуют неожиданные успехи, полученные при использовании терапевтических моноклональных антител, нацеленных на иммуносупрессоры CTLA-4, PD-1 и PD-L1. Эти антитела инактивируют контрольные точки иммунитета и позволяют Т-клеткам эффективно атаковать раковые клетки, обеспечивая таким образом длительную эффективность у некоторых пациентов. Этот недавно полученный успех, обусловленный этими антителами, омолодил область иммуноонкологии и вдохновил на проведение исследований и на разработку большого количества терапевтических средств, позволяющих мобилизовать иммунную систему человека на борьбу с раком.

Иммунная система человека состоит из адаптивного (приобретенного) и врожденного иммунитета. Современные блокаторы контрольных точек и модуляторы микроокружения опухоли, используемые в клинической практике или находящиеся в фармацевтической разработке, направлены на адаптивный иммунитет. Блокаторы контрольных точек и модуляторы микроокружения опухоли мобилизуют Т-клетки, спасая Т-хелперы и Т-киллеры от истощения, истощая иммуносупрессивные регуляторные Т-клетки или блокируя формирование иммуносупрессивного микроокружения опухоли. Совсем недавно появились новые данные, свидетельствующие о том, что опухолевые клетки также подавляют врожденный иммунитет, и ослабление такого подавления продемонстрировало *in vitro* и *in vivo* огромный терапевтический потенциал при лечении злокачественных опухолей.

Врожденный иммунитет является первой линией защиты от вторжения патогенов. Он состоит из защитных механизмов и поглощающих антигены лейкоцитов. Среди них имеются макрофаги, которые удаляют нефункциональные старые и инфицированные клетки-хозяева путем фагоцитоза. Опухолевые клетки также избегают атаку макрофагов путем сверхэкспрессии кластера дифференцировки 47 (CD47) (также известного как интегрин-ассоциированный белок), маркера, который также повсеместно экспрессируется на поверхности нормальных клеток. Примечательно, что в присутствии антител, которые специфически блокируют CD47, макрофаги атакуют опухолевые клетки *in vitro* в анализе на фагоцитоз и уничтожают опухоли *in vivo* на моделях ксенотрансплантата. В настоящее время несколько терапевтических агентов, нацеленных на CD47, вступили в фазу клинической разработки лекарственных средств.

CD47, впервые идентифицированный как белок, связанный с интегрином, является лигандом-рецептором и взаимодействует со многими белками. CD47 является рецептором тромбоспондина-1 (TSP1), одного из наиболее охарактеризованных секретируемых лигандов. С другой стороны, CD47 является лигандом, участвующим в передаче сигнала регуляторного белка альфа (SIRPα), ингибиторного рецептора, экспрессируемого на поверхности макрофагов. Именно связывание последнего предотвращает попадание макрофагов в раковые клетки.

Что касается всех видов иммунотерапии рака, блокирование CD47 может вызывать непреднамеренную иммунную атаку на нормальные клетки, обуславливающую дозозаменяющую токсичность. Действительно, антитело B6H12, блокирующее CD47, вызывает гемагглютинацию, предположительно, связываясь с CD47 на эритроцитах. Примечательно, что это антитело блокирует связывание TSP1 и SIRPα с CD47. Однако остается неясным, является ли блокирование взаимодействия TSP1 с B6H12 причиной гемагглютинации. Кроме того, предполагается, что макрофаги могут атаковать нормальные клетки, когда их поверхностные молекулы CD47 маскируются систематически вводимыми анти-CD47 антителами. Поэтому очень важно разработать анти-CD47 антитела, которые обладают повышенной специфичностью

к опухолевым клеткам и сниженной токсичностью по отношению к нормальным клеткам.

Сущность изобретения

Согласно одному общему аспекту, изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с CD47.

Предлагаются выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 177, 46, 47, 178, 112 и 179, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 51, 52, 53, 117, 118 и 119, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 54, 55, 56, 120, 121 и 122, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 57, 58, 59, 123, 124 и 125, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 60, 61, 62, 126, 127 и 128, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 180, 181, 182, 129, 130 и 131, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 72, 73, 74, 138, 139 и 140, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 78, 79, 80, 144, 145 и 146, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 81, 82, 83, 147, 148 и 149, соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 84, 85, 86, 150, 151 и 152, соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 87, 88, 89, 153, 154 и 155, соответственно;
- (12) SEQ ID NO: 90, 91, 92, 156, 157 и 158, соответственно;
- (13) SEQ ID NO: 93, 94, 95, 159, 160 и 161, соответственно;
- (14) SEQ ID NO: 96, 97, 98, 162, 163 и 164, соответственно;
- (15) SEQ ID NO: 99, 100, 101, 165, 166 и 167, соответственно;
- (16) SEQ ID NO: 102, 103, 104, 168, 169 и 170, соответственно;
- (17) SEQ ID NO: 105, 106, 107, 171, 172 и 173, соответственно;
- (18) SEQ ID NO: 108, 109, 110, 174, 175 и 176, соответственно; или
- (19) SEQ ID NO: 201, 202, 203, 204, 205 и 206, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с CD47, предпочтительно человеческим CD47. SEQ ID NO: 177 представлена аминокислотной последовательностью GYTFTX₁YY, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из D или A. SEQ ID NO: 178 представлена аминокислотной последовательностью X₁NVGTY, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из D или E. SEQ ID NO: 179 представлена аминокислотной последовательностью GQX₁YSYPLT, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из S или T. SEQ ID NO: 180 представлена аминокислотной последовательностью GYTFTSX₁W, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из S или Y. SEQ ID NO: 181 представлена аминокислотной последовательностью IDPSDSEX₁, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из T или A. SEQ ID NO: 182 представлена аминокислотной последовательностью X₁RWGYGKSAX₂DY, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из A или S, и X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из I или M.

В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 или 43, или вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 или 44.

В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- (a) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 1 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 2;
- (b) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 3 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 4;
- (c) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 5 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 6;
- (d) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 7 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 8;
- (e) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 9 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 10;
- (f) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 11 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 12;
- (g) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 13 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 14;
- (h) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 15 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 16;

- [illegible]

В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- [illegible]

вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 200.

В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно блокировать связывание CD47 с тромбоспондином-1 (TSP1) и/или сигнально-регуляторным белком альфа (SIRP α).

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно индуцировать опосредованный макрофагами фагоцитоз раковых клеток.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно связываться с раковыми клетками, при этом связывание с эритроцитами происходит на уровне от минимального до недетектируемого.

Также предлагаются выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Также предлагаются векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Также предлагаются клетки-хозяева, содержащие векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления предлагается фармацевтическая композиция, содержащая указанное выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Также предлагаются способы блокирования связывания CD47 с тромбоспондином-1 (TSP1) и/или CD47 с сигнально-регуляторным белком альфа (SIRP α) у больного, включающие введение индивиду фармацевтических композиций по изобретению.

Также предлагаются способы лечения злокачественной опухоли у больного, включающие введение индивиду фармацевтических композиций по изобретению. Злокачественная опухоль может представлять собой любой вид гемобластоза или солидного рака, например, он может быть выбран, без ограничения, из рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточного рака, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелоидного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других видов гемобластоза.

Также предлагаются способы лечения воспалительного заболевания у больного, включающие введение индивиду фармацевтических композиций по изобретению.

Также предлагаются способы лечения инфекционного заболевания у больного, включающие введение индивиду фармацевтической композиции по изобретению.

Также предлагаются способы лечения артериосклероза у больного, включающие введение индивиду фармацевтической композиции по изобретению.

Также предлагаются способы лечения сердечно-сосудистого заболевания у больного, включающие введение индивиду фармацевтической композиции по изобретению.

Также предлагаются способы лечения нарушения метаболизма у больного, включающие введение индивиду фармацевтических композиций по изобретению.

Также предлагаются способы лечения радиационного поражения у больного, включающие введение индивиду фармацевтической композиции по изобретению.

Также предлагаются способы лечения аутоиммунного заболевания у больного, включающие введение индивиду фармацевтических композиций по изобретению.

Также предлагаются способы определения уровня CD47 у индивида. Способы включают (а) получение образца от индивида; (b) приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и (с) определение уровня CD47 у индивида. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец ткани или крови. Образец ткани может представлять собой, например, образец раковой ткани. Образец крови может содержать, например, раковые клетки.

Также предлагаются способы получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающие культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продуцирования моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Также предлагаются способы получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающие объединение моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Краткое описание чертежей

Приведенная выше сущность изобретения, а также приведенное ниже подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения будут лучше поняты при изучении со ссылкой на прилагаемые чертежи. Однако следует понимать, что применение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

Фиг. 1 представлен график связывания анти-CD47 mAb с клетками RAJI согласно результатам анализа FACS. Контрольные группы "CTL Mu 2° Ab" и "CTL Hu 2° Ab" обрабатывали не первичными анти-телами, а конъюгированными с AlexaFluor 488 антимишиным и античеловеческим вторичным Ab IgG, соответственно.

На фиг. 2A-2P приведены графики активности анти-CD47 mAb, блокирующих взаимодействие между CD47(ECD)-HIS и SIRP α -huFc, по результатам анализа с помощью ELISA. Получали кривые, и с помощью Prism GraphPad версии 7 вычисляли значения IC₅₀.

На фиг. 2A представлен график активности анти-CD47 mAb 15G23A.

На фиг. 2B представлен график активности анти-CD47 mAb 17C6A.

На фиг. 2C представлен график активности анти-CD47 mAb 13B18A.

На фиг. 2D представлен график активности анти-CD47 mAb 4M8A.

На фиг. 2E представлен график активности анти-CD47 mAb 14D18A.

На фиг. 2F представлен график активности анти-CD47 mAb 11G2A.

На фиг. 2G представлен график активности анти-CD47 mAb 13C4A.

На фиг. 2H представлен график активности анти-CD47 mAb 5D24A.

На фиг. 2I представлен график активности анти-CD47 mAb 9O23A.

На фиг. 2J представлен график активности анти-CD47 mAb 17N8A.

На фиг. 2K представлен график активности анти-CD47 mAb 14P6A.

На фиг. 2L показывает график активности анти-CD47 mAb 19L14A.

На фиг. 2M представлен график активности анти-CD47 mAb 14O18A.

На фиг. 2N представлен график активности анти-CD47 mAb 1J7A.

На фиг. 2O представлен график активности анти-CD47 mAb 16M17A.

На фиг. 2P представлен график активности анти-CD47 mAb 18M19A (химерного антитела с тяжелой цепью человеческого IgG4 и легкой цепью каппа).

На фиг. 3A-3B показана оценка анти-CD47 mAb в анализе гемагглютинации с использованием свежей донорской крови. Буфер для очистки, B6H12, и PBS использовали в качестве контролей. Концентрации антител указаны над панелью. На фиг. 3A представлены результаты анализа гемагглютинации для анти-CD47 mAb 14P6A, 11F6A, 18M19A, 19L14A, 305A, 10I23A, 14N13A, 14O18A, 13C4A, 16M17A и 17O12A. На фиг. 3B представлены результаты анализа гемагглютинации для анти-CD47 mAb 12B18A, 4M8A, 13B18A, 11G2A, 5D24A, 14D18A, 17C6A, 17N8A, 9O23A, 15G23A и 1J7A и контролей PBS и B6H12.

На фиг. 4A-4C представлены графики противоопухолевой активности *in vivo*, массы тела и концентрация в сыворотке у мышей, обработанных анти-CD47 mAb 13B18A-huIgG1.

На фиг. 4A показана *in vivo* противоопухолевая активность 13B18A-huIgG1 на мышинной модели ксенотрансплантата RAJI; ритуксимаб использовали в качестве положительного контроля.

На фиг. 4B представлены данные по массе тела животных в разных группах, полученные во время исследования.

На фиг. 4C показана концентрация 13B18A-huIgG1 в сыворотке в группах, получавших mAb, через 2 дня после введения последней дозы.

На фиг. 5A и 5B показана активность гуманизированных анти-CD47 mAb H3L9 (фиг. 5A) и H5L5 (фиг. 5B), блокирующая взаимодействие между человеческим CD47(ECD)-HIS и huSIRP α -muFc, согласно результатам анализа с помощью ELISA.

Фиг. 6 показаны результаты анализа гемагглютинации с гуманизированными mAb H3L9, H5L5 и H8L10. Мышиное mAb 15G23A использовали в качестве положительного контроля.

Фиг. 7A-7B показаны результаты анализа связывания эритроцитов (RBC) (фиг. 7A) и RAJI-клеток (фиг. 7B) с гуманизированными mAb H3L9, H5L5 и H8L10.

На фиг. 8 показана активность гуманизированных анти-CD47 mAb H3L9, H5L5 и H8L10, блокирующая связывание huSIRP α -muFc с клетками RAJI. "Только 2-ое Ab" и "без mAb/без контрольного 2-го Ab" являются отрицательными контролями.

На фиг. 9 показана активность гуманизированных анти-CD47 mAb H3L9, H5L5 и H8L10 в отношении индуцированного макрофагом фагоцитоза клеток RAJI.

Подробное описание изобретения

В разделе "Уровень техники" и в описании приведены ссылки или описаны различные публикации, статьи и патенты; каждый из этих документов включен в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей или т.п., включено в настоящее описание для раскрытия контекста настоящего изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что каждый из обсуждаемых вопросов являются частью предшествующего уровня техники, относящегося к любому раскрытому или заявленному изобретению.

Если не указано иное, все технические и научные термины, которые используются в настоящем описании, имеют те же значения, как их обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В противном случае определенные термины, используемые в настоящей заявке, имеют значения, указанные в описании.

Следует отметить, что используемые в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число, если из контекста в явном виде не следует иное.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящей заявке, во всех случаях следует рассматривать как модифицированные термином "примерно". Таким образом, числовое значение обычно включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 до 1,1 мг/мл. Аналогично, диапазон концентраций от 1 до 10% (мас./об.) включает от 0,9 до 11% (мас./об.). В контексте настоящего описания, использование числового диапазона в явном виде включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в этом диапазоне, включая целые числа и дробные значения в таких диапазонах, если из контекста в явном виде не следует иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий серии элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу серии. Специалистам в данной области будет понятно, или они смогут определить при помощи обычных общепринятых экспериментов, множество вариантов осуществления изобретения, эквивалентных раскрытым в настоящем описании. Такие эквиваленты входят в объем настоящего изобретения.

Используемые в настоящем описании термины "содержит", "содержащий", "включает", "включающий", "имеет", "имеющий", "имеет в составе" или "имеющий в составе" или любой другой их вариант, означают включение указанного целого числа или группы целых чисел, а не исключение какого-либо другого целого числа или группы целых чисел, и их следует понимать как неисключающие или открытые. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которое содержит список элементов, не обязательно ограничено только этими элементами, но могут включать другие элементы, не перечисленные в явном виде или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если в явном виде не указано иное, союз "или" относится к включающему "или", а не исключающему "или". Например, условие А или В удовлетворяется любым из следующих условий: А является истинным (или присутствует), а В является ложным (или не присутствует), А является ложным (или не присутствует), а В является истинным (или присутствует), и оба А и В верны (или присутствуют).

Используемый в настоящем описании термин "и/или" между несколькими перечисленными элементами следует понимать как охватывающий как отдельные, так и объединенные варианты. Например, когда два элемента соединены союзом "и/или", первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности применения первого и второго элементов вместе. Все эти варианты входят в объем указанного значения и, следовательно, удовлетворяют требованию термина "и/или", используемого в настоящем описании. Понятно, что возможность одновременного применения более чем одного из указанных вариантов соответствует указанному значению и, следовательно, удовлетворяет требованию термина "и/или".

В контексте настоящего изобретения термин "состоит из" или его варианты, такие как "состоят из" или "состоящий из", используемые в описании и формуле изобретения, указывает на включение любого приведенного целого числа или группы целых чисел, но при этом никакое дополнительное целое число или группа целых чисел не может быть добавлена в указанный метод, структуру или композицию.

В контексте настоящего изобретения термин "по существу состоит из" или его варианты, такие как "по существу состоят из" или "по существу состоящий из", используемый в описании и формуле изобретения, указывает на включение любого приведенного целого числа или группы целых чисел, и необязательное включение любого приведенного целого числа или группы целых чисел, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного метода, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. §2111.03.

В контексте настоящего описания термин "индивид" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека. Используемый в настоящем описании термин "млекопитающее" включает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, без ограничения, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, лю-

дей и т.д., более предпочтительно человека.

Слова "вправо", "влево", "ниже" и "выше" обозначают направления на чертежах, на которые дается ссылка.

Следует также понимать, что термины "примерно", "приблизительно", "в целом", "по существу" и аналогичные термины, используемые в настоящем описании при ссылке на размер или характеристику компонента предпочтительного варианта изобретения, указывают на то, что описанный размер/характеристика не является строгой границей или параметром и не исключает незначительных отклонений от указанных значений, которые являются функционально одинаковыми или аналогичными, что является понятным специалисту в данной области техники. Как минимум, такие ссылки, которые включают числовой параметр, включают разброс значений, который с точки зрения математических и производственных принципов, принятых в данной области техники (например, округление, измерение или другие систематические ошибки, производственные допуски и т.д.), не приведет к изменению наименее значащей цифры.

Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, анти-CD47 антител, полипептидов CD47 и полинуклеотидов, которые их кодируют), относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для определения максимального соответствия, измеренного с помощью одного из приведенных ниже алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального контроля.

Для сравнения последовательностей одна последовательность обычно используется как эталонная последовательность, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемые и эталонные последовательности вводят в компьютер, при необходимости, обозначают координаты подпоследовательности, и назначают параметры программы для алгоритма сравнения последовательностей. Затем с помощью алгоритма сравнения последовательностей вычисляют процент идентичности последовательности для тестируемых последовательностей относительно эталонной последовательности на основе параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть выполнено, например, при помощи алгоритма локальной гомологии Смита-Уотермана (Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)), алгоритма парного выравнивания Нидлмана-Вунша (Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)), методом поиска подобия Липмана-Пирсона, (Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)), путем реализации этих алгоритмов в виде компьютерных программ (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете Wisconsin Genetics Software, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или путем визуальной оценки (см., например, Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Примерами алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны у Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 и Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для анализа BLAST доступно через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм включает сначала идентификацию пар последовательностей с высоким количеством очков (HSP) путем идентификации коротких слов длиной W в запрашиваемой последовательности, которые либо соответствуют, либо удовлетворяют некоторому пороговому положительному количеству очков T при выравнивании со словом той же длины в последовательности из базы данных. T называют порогом количества очков для слов в определенной окрестности (Altschul et al., выше). Указанные исходные совпадения соседних слов в окрестности действуют как начало для инициации поиска для нахождения содержащих их HSP. Поиск совпадения слов продолжают в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока можно увеличивать суммарное количество очков выравнивания.

Суммарное количество очков для нуклеотидных последовательностей вычисляют с помощью параметров M (очки вознаграждения за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафные очки за несовпадающие остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей для подсчета суммарного количества очков используется матрица подсчета очков. Продолжение поиска совпадения слов в каждом направлении прекращают, когда: суммарное количество очков выравнивания уменьшается на количество X по сравнению с его достигнутым максимальным значением; суммарное количество очков опускается до нуля или ниже в результате суммирования одного или нескольких отрицательно оцениваемых выравниваний остатков; или достигается конец какой-либо последовательности. Параметры W , T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLAST (для нуклеотидных последовательностей) по умолчанию используется длина слов (W), равная 11, ожидание (E) -10, $M=5$, $N=-4$, и сравнение обеих нитей. Для аминокислотных последовательностей в программе BLAST по умолчанию используется длина слов (W), равная 3, ожидание (E) -10 и матрица подсчета очков BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

Дополнительно к вычислению процента идентичности последовательности алгоритм BLAST также

выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Одной из мер сходства, предусмотренных алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая является показателем вероятности, с которой случайно может иметь место совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями. Например, последовательность нуклеиновой кислоты считается сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой последовательности нуклеиновой кислоты со второй эталонной нуклеиновой кислотой составляет меньше примерно 0,1, более предпочтительно, меньше примерно 0,01, и наиболее предпочтительно, меньше примерно 0,001.

Дополнительным указанием на то, что две последовательности нуклеиновых кислот или полипептидов являются по существу идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, является иммунологически перекрестно реактивным с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид обычно является по существу идентичным второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим указанием на то, что две последовательности нуклеиновых кислот являются по существу идентичными, является то, что две молекулы гибридизуются друг с другом в жестких условиях.

Используемые в настоящем описании термины "ингибировать", "ингибирующий" и "ингибирование" означают снижение активности, ответа, состояния, заболевания или другого биологического параметра. Эти термины могут включать, без ограничения, полное подавление активности, реакции, состояния или заболевания. Они также могут включать, например, снижение активности, ответа, состояния или заболевания на 10% по сравнению с нативным или контрольным уровнем. Таким образом, снижение может составлять 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%, или снижение может быть любым промежуточным значением между указанными в сравнении с нативным или контрольным уровнем. В качестве неограничивающего примера антитело по изобретению может ингибировать активность белка CD47. Активность белка CD47 может быть снижена или уменьшена относительно нативной активности белка CD47.

Антитела.

Изобретение в целом относится к выделенным анти-CD47 антителам, нуклеиновым кислотам и векторам экспрессии, кодирующим эти антитела, рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и композициям, содержащим указанные антитела. Также предлагаются способы получения антител и способы применения этих антител для лечения заболеваний, включая злокачественную опухоль, воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, артериосклероз, сердечно-сосудистое заболевание, нарушения метаболизма, радиационное поражение и/или инфекционные заболевания. Антитела по изобретению имеют одно или более требуемых функциональных свойств, включая, без ограничения, связывание с высоким сродством с CD47, высокую специфичность к CD47, способность и/или неспособность блокировать связывание CD47 с тромбоспондином-1 (TSP1), способность блокировать связывание CD47 с сигнал-регуляторным белком альфа (SIRP α), способность индуцировать фагоцитоз экспрессирующих CD47 клеток, ассоциированных с заболеванием или нарушением (включая, без ограничения, злокачественную опухоль и артериосклероз), и способность ингибировать рост опухоли на животных моделях и у индивидов при введении отдельно или в комбинации с другими видами противораковой терапии и неспособность индуцировать гемагглютинацию.

В общем аспекте настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с CD47.

В контексте настоящего описания термин "антитело" используется в широком смысле и включает молекулы иммуноглобулина или антитела, включая человеческие, гуманизированные, составные и химерные антитела и фрагменты антител, которые являются моноклональными или поликлональными. Обычно антитела представляют собой белки или пептидные цепи, которые проявляют специфичность связывания к конкретному антигену. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины могут быть отнесены к пяти основным классам (т.е. IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG, дополнительно подразделяют на изотипы IGA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела по изобретению могут быть любым антителом из пяти основных классов или соответствующих подклассов. Предпочтительно антитело по изобретению представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител видов позвоночных можно отнести к одному из двух четко различимых типов, а именно каппа и лямбда, на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов. Соответственно, антитела по изобретению могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитела по изобретению включают константные области тяжелой и/или легкой цепи, полученные от крысы или человеческих антител. В дополнение к тяжелым и легким константным доменам, антитела содержат антигенсвязывающую область, которая состоит из варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи, каждая из которых содержит три домена (т.е. определяющие комплементарность области 1-3; CDR1, CDR2 и CDR3). Домены варибельной области легкой цепи альтернативно обозначают как LCDR1, LCDR2 и LCDR3, а домены варибельной области тяжелой цепи альтернативно обозначают как HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

В контексте настоящего описания термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, обладающих разными антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с CD47, по существу не содержит антител, которые не связываются с CD47). Кроме того, выделенное антитело по существу не содержит других клеточных материалов и/или химических веществ.

В контексте настоящего описания термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены методом гибридомы, с помощью фагового дисплея, методом клонирования гена одного лимфоцита или методами рекомбинантной ДНК. Например, моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного нечеловеческого животного, такого как трансгенная мышь или крыса, имеющую геном, содержащий трансген человеческой тяжелой цепи и трансген легкой цепи.

В контексте настоящего описания термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, фрагмент Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fv-фрагмент, стабилизированный дисульфидными связями (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидными связями ди-антитело (ds-антитело), одноцепочечная молекула антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), scFv-димер (двухвалентное диатело), полиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или более CDR, однодоменное антитело верблюда, нанотело, доменное антитело, бивалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полную структуру антитела. Антигенсвязывающий фрагмент способен связываться с тем же антигеном, с которым связывается родительское антитело или фрагмент родительского антитела. Согласно конкретным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, константную область легкой цепи и Fd-сегмент тяжелой цепи. Согласно другим конкретным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

В контексте настоящего описания термин "одноцепочечное антитело" относится к обычному в данной области одноцепочечному антителу, которое включает вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, соединенную коротким пептидом длиной от примерно 15 до примерно 20 аминокислот. Используемый в настоящем описании термин "однодоменное антитело" относится к обычному в данной области однодоменному антителу, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи или которое содержит только вариабельную область тяжелой цепи.

В контексте настоящего описания термин "человеческое антитело" относится к антителу, продуцируемому человеческим организмом, или антителу, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую антителу, продуцируемому человеческим организмом, полученному с помощью любого метода, известного в данной области. Это определение человеческого антитела включает интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид тяжелой и/или легкой цепи человека.

В контексте настоящего описания термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, не являющемуся человеческим, которое модифицировано для увеличения гомологии последовательности с последовательностью человеческого антитела с сохранением антигенсвязывающих свойств антитела, но с уменьшенной антигенностью в организме человека.

В контексте настоящего описания термин "химерное антитело" относится к антителу, в котором аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина получена из двух или более видов. Вариабельные области как легкой, так и тяжелой цепей часто соответствуют вариабельным областям антитела, полученного из одного вида млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и т.д.), имеющим требуемую специфичность, сродство и способность, в то время как константные области соответствуют последовательностям антитела, полученного от другого вида млекопитающего (например, человека), чтобы избежать инициации иммунного ответа у этого вида.

В контексте настоящего описания термин "полиспецифическое антитело" относится к антителу, которое содержит множество последовательностей вариабельного домена иммуноглобулина, где первая последовательность вариабельного домена иммуноглобулина из этого множества обладает специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу, а вторая последовательность вариабельного домена иммуноглобулина из этого множества обладает специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу. В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы не перекрываются или по существу не перекрываются. В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, например на разных белках (или разных субъединицах мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления полиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый вариабельный до-

мен иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления полиспецифическое антитело представляет собой молекулу биспецифического антитела, триспецифического антитела или молекулу тетраспецифического антитела.

В контексте настоящего описания термин "биспецифическое антитело" относится к полиспецифическому антителу, которое связывается с не более чем двумя эпитопами или двумя антигенами. Биспецифическое антитело характеризуется первой последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу, и второй последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу. В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, например на разных белках (или разных субъединицах мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления биспецифическое антитело содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу, и последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые имеют специфичность связывания по отношению ко второму эпитопу. В одном из вариантов осуществления биспецифическое антитело содержит половинное антитело или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу, и половинное антитело или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу. В одном из вариантов осуществления биспецифическое антитело содержит scFv или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания по отношению к первому эпитопу, и scFv или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания по отношению ко второму эпитопу. В одном из вариантов осуществления первый эпитоп расположен на CD47, а второй эпитоп расположен на PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33, CD73, апелине, DLL3, клаудине 18.2, TIG-1, фолатном рецепторе альфа, CD3 и/или других ассоциированных с опухолью иммуносупрессорах или поверхностных антигенах.

В контексте настоящего описания термин "CD47" относится к трансмембранному рецептору, принадлежащему к суперсемейству иммуноглобулинов, который, как было указано, участвует в многочисленных клеточных процессах, включая миграцию клеток, адгезию и функционирование Т-клеток. CD47, также известный как интегрин-ассоциированный белок (IAP), антиген рака яичников (OA3), Rh-связанный антиген и MER6, был изначально идентифицирован как опухолевый антиген при раке яичника у человека, и впоследствии было показано, что он экспрессируется во многих опухолях человека, включая как гематологические, так и солидные опухоли. Взаимодействие между CD47 и сигнальным регуляторным белком альфа ($\text{SIRP}\alpha$), ингибиторным белком, экспрессируемым на макрофагах, предотвращает фагоцитоз клеток, экспрессирующих CD47. Низкие уровни CD47 также экспрессируются практически во всех незлокачественных клетках. Термин "человеческий CD47" относится к CD47, полученному от человека. Примерная аминокислотная последовательность человеческого CD47 представлена в GenBank под номером NP_001768.1 (SEQ ID NO: 207).

В контексте настоящего описания, антитело, которое "специфически связывается с CD47", относится к антителу, которое связывается с CD47, предпочтительно человеческим CD47, с $KD 1 \times 10^{-7}$ М или менее, предпочтительно 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 5×10^{-9} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 5×10^{-10} М или менее или 1×10^{-10} М или менее. Термин "KD" относится к константе диссоциации, которую получают из отношения K_d к K_a (т.е. K_d/K_a) и выражают в виде молярной концентрации (М). Значения KD для антител могут быть определены с помощью способов, известных в данной области техники с учетом настоящего раскрытия. Например, KD антитела можно определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с помощью биосенсорной системы, такой как система Biacore®, или с помощью технологии интерферометрии биослоя, например с помощью системы Octet RED96.

Чем меньше значение KD антитела, тем выше сродство связывания антитела с целевым антигеном.

Согласно конкретному аспекту изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 177, 46, 47, 178, 112 и 179, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 51, 52, 53, 117, 118 и 119, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 54, 55, 56, 120, 121 и 122, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 57, 58, 59, 123, 124 и 125, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 60, 61, 62, 126, 127 и 128, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 180, 181, 182, 129, 130 и 131, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 72, 73, 74, 138, 139 и 140, соответственно;

- (8) SEQ ID NO: 78, 79, 80, 144, 145 и 146, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 81, 82, 83, 147, 148 и 149, соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 84, 85, 86, 150, 151 и 152, соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 87, 88, 89, 153, 154 и 155, соответственно;
- (12) SEQ ID NO: 90, 91, 92, 156, 157 и 158, соответственно;
- (13) SEQ ID NO: 93, 94, 95, 159, 160 и 161, соответственно;
- (14) SEQ ID NO: 96, 97, 98, 162, 163 и 164, соответственно;
- (15) SEQ ID NO: 99, 100, 101, 165, 166 и 167, соответственно;
- (16) SEQ ID NO: 102, 103, 104, 168, 169 и 170, соответственно;
- (17) SEQ ID NO: 105, 106, 107, 171, 172 и 173, соответственно;
- (18) SEQ ID NO: 108, 109, 110, 174, 175 и 176, соответственно; или
- (19) SEQ ID NO: 201, 202, 203, 204, 205 и 206, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с CD47, предпочтительно человеческим CD47.

SEQ ID NO: 177 представлена аминокислотной последовательностью GYTFTX₁YY, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из D или A.

SEQ ID NO: 178 представлена аминокислотной последовательностью X₁NVGTY, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из D или E.

SEQ ID NO: 179 представлена аминокислотной последовательностью GQX₁YSYPLT, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из S или T.

SEQ ID NO: 180 представлена аминокислотной последовательностью GYTFTSX₁W, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из S или Y.

SEQ ID NO: 181 представлена аминокислотной последовательностью IDPSDSEX₁, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из T или A.

SEQ ID NO: 182 представлена аминокислотной последовательностью X₁RWGYYGKSAX₂DY, где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из A или S, и X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из I или M.

Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную одной из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 или 43, или вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% идентичную одной из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 или 44. Согласно одному из предпочтительных вариантов осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно 95% идентичную SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 или 43, и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно 95% идентичную SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 или 44, соответственно.

Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, содержащему:

- a) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 1 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 2;
- b) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 3 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 4;
- c) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 5 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 6;
- d) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 7 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 8;
- e) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 9 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 10;
- f) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 11 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 12;
- g) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 13 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 14;
- h) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 15 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 16;
- i) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 17 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 18;
- j) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 19 и ва-

- a) переменную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 183 и переменную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 191;
- b) переменную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 183 и переменную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 192;
- c) переменную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 183 и переменную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 193;
- d) переменную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 184 и переменную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 190;
- e) переменную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 184 и переменную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 192;
- f) переменную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 184 и переменную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 193;
- g) переменную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 185 и переменную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 190;
- h) переменную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 185 и переменную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 191;
- i) переменную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 185 и переменную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 193;
- j) переменную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 185 и переменную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 198;
- k) переменную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 187 и переменную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 194;
- l) переменную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 188 и переменную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 194;
- m) переменную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 188 и переменную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 196;
- n) переменную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 188 и переменную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 197; или
- o) переменную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 199 и переменную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 200.

Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно блокировать связывание CD47 с тромбоспондином-1 (TSP1) и/или сигнал-регуляторным белком альфа (SIRP α).

Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно индуцировать опосредованный макрофагами фагоцитоз раковых клеток.

Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно связываться с раковыми клетками, при этом связывание с эритроцитами происходит на уровне от минимального до недетектируемого. Связывание раковых клеток выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению может быть определено способами, известными в данной области техники.

В другом общем аспекте изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Специалистам в данной области будет понятно, что кодирующая последовательность белка может быть изменена (например, путем замены, делеции, вставки и т.д.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалистам в данной области техники будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, можно изменять без изменения аминокислотных последовательностей белков.

В другом общем аспекте изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области с учетом настоящего изобретения, такой как плазмидный, космидный, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный вектор экспрессии, такой как плазида. Вектор может включать любой элемент для обеспечения обычной функции вектора экспрессии, например, промотор, элемент связывания рибосомы, терминатор, энхансер, селективный маркер и точку начала репликации. Промотор может быть конститутивным, индуцибельным или репрессируемым промотором. Ряд векторов экспрессии, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, известны в данной области и могут быть использованы согласно изобретению для продуцирования клеткой антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Для создания рекомбинантного вектора экспрессии в соответствии с вариантами осуществления изобретения могут быть использованы традиционные методы клони-

рования или искусственного синтеза генов.

В другом общем аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Любая клетка-хозяин, известная специалистам в данной области с учетом настоящего раскрытия, может быть использована для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки *E.coli* TG1 или BL21 (для экспрессии, например, антитела scFv или Fab), клетки CHO-DG44 или CHO-K1 или клетки HEK293 (для экспрессии, например, полноразмерного антитела IgG). Согласно конкретным вариантам осуществления рекомбинантный вектор экспрессии трансформируют в клетки-хозяева обычными способами, такими как химическая трансфекция, тепловой шок или электропорация, где он стабильно интегрируется в геном клетки-хозяина таким образом, чтобы обеспечивалась эффективная экспрессия рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продуцирования моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно собирать из клеток и очищать в соответствии с общепринятыми методами, известными в данной области техники и описанными в настоящей заявке.

Фармацевтические композиции.

В другом общем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В контексте настоящего изобретения термин "фармацевтическая композиция" означает продукт, содержащий антитело по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Антитела по изобретению и композиции, содержащие их, также полезны при изготовлении лекарственного средства для терапевтических применений, упомянутых в настоящем описании.

В контексте настоящего описания термин "носитель" относится к любому формообразующему агенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, липидсодержащей везикуле, микросфере, липосомальной оболочке для инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники, для использования в фармацевтических составах. Понятно, что характеристики носителя, формообразующего агента или разбавителя будут зависеть от пути введения, используемого для конкретного применения. Используемый в настоящем описании термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксичному материалу, который не влияет на эффективность композиции по изобретению или биологическую активность композиции по изобретению. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, с учетом настоящего изобретения, в изобретении может быть использован любой фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для использования в фармацевтической композиции антитела.

Состав фармацевтически активных ингредиентов с фармацевтически приемлемыми носителями известен в данной области, см. например, *The Science and Practice of Pharmacy* (например, 21-е издание (2005) и любые более поздние издания). Неограничивающие примеры дополнительных ингредиентов включают: буферы, разбавители, растворители, агенты, регулирующие тоничность, консерванты, стабилизаторы и хелатообразующие агенты. При приготовлении состава фармацевтических композиций по изобретению могут быть использованы один или более фармацевтически приемлемых носителей.

В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция представляет собой жидкую композицию. Предпочтительным примером жидкого состава является водный состав, т.е. состав, содержащий воду. Жидкий состав может содержать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и т.п. Водный состав обычно содержит по меньшей мере 50% мас./мас. воды или по меньшей мере 60, 70, 75, 80, 85, 90 или по меньшей мере 95% мас./мас. воды.

В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция может быть составлена в виде инъекционного раствора, который можно вводить, например, с помощью инъекционного устройства (например, шприца или инфузионного насоса). Инъекция может быть, например, подкожной, внутримышечной, внутривенной, интравитреальной или интравитреальной.

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой твердый состав, например лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно использовать как есть, или в которую врач или пациент перед использованием добавляет растворители и/или разбавители. Твердые лекарственные формы могут включать таблетки, такие как прессованные таблетки и/или таблетки с покрытием и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы). Фармацевтическая композиция также может быть, например, в форме саше, драже, порошков, гранул, пастилок или лиофилизированных порошков.

Лекарственные формы могут быть с немедленным высвобождением, и в этом случае они могут содержать водорастворимый или диспергируемый носитель, или они могут иметь отсроченное высвобождение.

дение, замедленное высвобождение или модифицированное высвобождение, и в этом случае они могут содержать нерастворимые в воде полимеры, которые регулируют скорость растворения лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте или под кожей.

В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть доставлена интраназально, внутривенно или сублингвально.

Значение pH водной композиции может составлять от 3 до 10. В одном из вариантов осуществления изобретения pH композиции составляет от примерно 7,0 до примерно 9,5. В другом варианте осуществления изобретения pH композиции составляет от примерно 3,0 до примерно 7,0.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит буфер. Неограничивающие примеры буферов включают: аргинин, аспарагиновую кислоту, бисин, цитрат, ди-натрия гидрофосфат, фумаровую кислоту, глицин, глицилглицин, гистидин, лизин, малеиновую кислоту, яблочную кислоту, ацетат натрия, карбонат натрия, дигидрофосфат натрия, фосфат натрия, сукцинат, винную кислоту, трицин и трис(гидроксиметил)аминометан и их смеси. Буфер может присутствовать отдельно или в виде смеси в концентрации от примерно 0,01 до примерно 50 мг/мл, например от примерно 0,1 до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных буферов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит консервант. Неограничивающие примеры консервантов включают: бензетония хлорид, бензойную кислоту, бензиловый спирт, бронопол, бутил-4-гидроксibenзоат, хлорбутанол, хлоркрезол, хлоргексидин, хлорфенезин, о-крезол, м-крезол, п-крезол, этил-4-гидроксibenзоат, имидомочевину, метил 4-гидроксibenзоат, фенол, 2-феноксизтанол, 2-фенилэтанол, пропил 4-гидроксibenзоат, дегидроацетат натрия, тиомеросал и их смеси. Консервант может присутствовать отдельно или в виде смеси в концентрации от примерно 0,01 до примерно 50 мг/мл, например от примерно 0,1 до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных консервантов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит регулирующий тоничность агент. Неограничивающие примеры этого варианта осуществления включают соль (такую как хлорид натрия), аминокислоту (такую как глицин, гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновая кислота, триптофан и треонин), альдит (такой как глицерин 1,2-пропандиол, пропиленгликоль, 1,3-пропандиол и 1,3-бутандиол), полиэтиленгликоль (например, ПЭГ400) и их смеси. Другой пример регулирующего тоничность агента включает сахар. Неограничивающими примерами сахаров могут быть моно-, ди- или полисахариды или водорастворимые глюкоканы, включая, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, альфа- и бета-HPCD, растворимый крахмал, гидроксиэтилкрахмал и натрий карбоксиметилцеллюлозу. Другим примером регулирующего тоничность агента является сахарный спирт, где термин "сахарный спирт" определяется как C(4-8)углеводород, имеющий по меньшей мере одну группу -ОН. Неограничивающие примеры сахарных спиртов включают маннит, сорбит, инозит, галактит, дульцит, ксилит и арабит. Фармацевтические композиции, каждая из которых содержит регулирующий тоничность агент, указанный в этом параграфе, являются альтернативными вариантами осуществления. Регулирующий тоничность агент может присутствовать отдельно или в смеси в концентрации от примерно 0,01 до примерно 50 мг/мл, например от примерно 0,1 до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных регулирующих тоничность агентов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит хелатообразующий агент. Неограничивающие примеры хелатообразующих агентов включают лимонную кислоту, аспарагиновую кислоту, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и их смеси. Хелатообразующий агент может присутствовать отдельно или в смеси в концентрации от примерно 0,01 до примерно 50 мг/мл, например от примерно 0,1 до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных хелатообразующих агентов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит стабилизатор. Неограничивающие примеры стабилизаторов включают один или более ингибиторов агрегации, один или более ингибиторов окисления, одно или более поверхностно-активных веществ и/или один или более ингибиторов протеаз.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит стабилизатор, где указанный стабилизатор представляет собой карбокси/гидроксицеллюлозу и ее производные (такие как НРС, НРС-SL, НРС-L и НРМС), циклодекстрины, 2-метилтиоэтанол, полиэтиленгликоль (такой как ПЭГ 3350), поливиниловый спирт (PVA), поливинилпирролидон, соли (такие как хлорид натрия), серосодержащие вещества, такие как монотиоглицерин, или тиогликолевую кислоту. Стабилизатор может присутствовать отдельно или в смеси в концентрации от примерно 0,01 до примерно 50 мг/мл, например от примерно 0,1 до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных стабилизаторов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В других вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит одно или более поверхностно-активных веществ, предпочтительно поверхностно-активное вещество, по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество или два разных поверхностно-активных вещества. Термин "поверхностно-активное вещество" относится к любым молекулам или ионам, которые состоят из водорастворимой (гидрофильной) части и жирорастворимой (липофильной) части. Поверхностно-активное вещество может быть выбрано, например, из группы, состоящей из анионных поверхностно-активных веществ, катионных поверхностно-активных веществ, неионогенных поверхностно-активных веществ и/или цвиттерионных поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активное вещество может присутствовать отдельно или в смеси в концентрации от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных поверхностно-активных веществ, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В дополнительном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит один или более ингибиторов протеаз, таких как, например, ЭДТА, и/или солянокислый бензамидин (HCl). Ингибитор протеаз может присутствовать отдельно или в смеси в концентрации от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих специфических ингибиторов протеаз, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающему объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

Способы применения.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу блокирования связывания CD47 с тромбоспондином-1 (TSP1) или способу блокирования связывания CD47 с сигнально-регуляторным белком альфа (SIRP α), где этот способ включает введение индивиду фармацевтической композиции по изобретению.

Функциональную активность антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с CD47, можно охарактеризовать способами, известными в данной области техники и описанными в настоящей заявке. Способы, позволяющие охарактеризовать антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD47, включают, без ограничения, анализы сродства и специфичности, включая анализ Biacore, ELISA и OctetRed; анализы связывания лигандов с рецепторами для выявления блокирования связывания CD47 с TSP1 и/или SIRP α ; анализы фагоцитоза, в которых клетки, экспрессирующие CD47, метят флуоресцентным красителем и инкубируют с макрофагами для детектирования влияния блокирования связывания CD47 с SIRP α на фагоцитоз клеток, экспрессирующих CD47, макрофагами; анализы гемагглютинации для детектирования влияния анти-CD47 антител на эритроциты и клеточные анализы для детектирования влияния блокирования взаимодействия TSP1-CD47 на передачу сигналов eNOS/NO/cGMP дальше в эндотелиальные клетки. Согласно конкретным вариантам осуществления способы, позволяющие охарактеризовать антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD47, включают описанные ниже способы.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у больного, включающему введение индивиду фармацевтической композиции по изобретению. Злокачественная опухоль может представлять собой любой гемобластоз или солидный рак, например, он может быть выбран, без ограничения, из: рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточного рака, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), хронического лимфобластного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других видов гемобластоза.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения воспалительного заболевания у больного, включающему введение индивиду фармацевтической композиции по изобретению.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения инфекционного заболевания у больного, включающему введение индивиду фармацевтической композиции по изобретению.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения артериосклероза у больного, включающему введение индивиду фармацевтической композиции по изобретению.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения сердечно-сосудистого заболевания у больного, включающему введение индивиду фармацевтической композиции по изобретению.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения нарушения метаболизма у больного, включающему введение индивиду фармацевтической композиции по изобретению.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения радиационного поражения у больного, включающему введение индивиду фармацевтической композиции по изобретению.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения аутоиммунного заболевания у

больного, включающему введение индивиду фармацевтической композиции по изобретению.

Согласно вариантам осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество анти-CD47 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Используемый в настоящем описании термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает требуемый биологический или лекарственный ответ у индивида. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели.

Используемое в настоящем описании терапевтически эффективное количество в отношении анти-CD47 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента означает количество анти-CD47 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое модулирует иммунный ответ у больного. Также, используемое в настоящем описании терапевтически эффективное количество в отношении анти-CD47 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента означает количество анти-CD47 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое приводит к лечению заболевания, расстройства или состояния; предотвращает или замедляет прогрессирование заболевания, расстройства или состояния; или уменьшает или полностью облегчает симптомы, связанные с заболеванием, расстройством или состоянием.

Согласно конкретным вариантам осуществления, заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, представляет собой злокачественную опухоль, предпочтительно злокачественную опухоль, выбранную из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточного рака, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), хронического лимфобластного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других видов гемобластома. Согласно другим конкретным вариантам осуществления заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, представляет собой воспалительное заболевание, инфекционное заболевание, артериосклероз, сердечно-сосудистое заболевание, нарушение метаболизма, радиационное поражение, иммунное заболевание и/или аутоиммунное заболевание.

Согласно конкретным вариантам осуществления терапевтически эффективное количество относится к количеству терапевтического агента, которое является достаточным для достижения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) уменьшения или облегчения тяжести заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ii) сокращения длительности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iii) предотвращения прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iv) индуцирования регрессии заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (v) предотвращения развития или начала заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vi) предотвращения рецидива заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vii) уменьшения частоты госпитализации индивида, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (viii) уменьшения продолжительности госпитализации индивида, страдающего от заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ix) увеличения выживаемости индивида, страдающего от заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (x) ингибирования или облегчения заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома у индивида; и/или (xii) усиления или улучшения профилактического или терапевтического эффекта(ов) другой терапии.

Терапевтически эффективное количество или доза может меняться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, способа введения, целевого сайта, физиологического состояния индивида (включая, например, возраст, массу тела, здоровье), от того, является ли индивид человеком или животным, других вводимых лекарственных средств, и типа лечения: является ли оно профилактическим или терапевтическим. Терапевтические дозы подбирают так, чтобы были достигнуты оптимальные уровни безопасности и эффективности.

Согласно конкретным вариантам осуществления, описанные в настоящей заявке композиции готовят в виде лекарственных форм, подходящих для предполагаемого пути введения индивиду. Например, описанные в настоящей заявке композиции могут быть приготовлены в виде лекарственной формы, подходящей для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

В контексте настоящего описания термины "лечить" и "лечение" обозначают улучшение или реверсию по меньшей мере одного измеримого физического параметра, связанного с раком, иммунным заболеванием, расстройством или состоянием, аутоиммунным заболеванием, расстройством или состоянием, или воспалительным заболеванием, расстройством или состоянием инфекционным заболеванием, расстройством или состоянием, артериосклеротическим заболеванием, расстройством или состоянием, сердечно-сосудистым заболеванием, расстройством или состоянием, связанным с нарушением метаболизма заболеванием, расстройством или состоянием, радиационным поражением, расстройством или состоянием.

ем, которые не обязательно проявлены, но могут быть проявлены у индивида. Термины "лечить" и "лечение" также могут относиться к регрессии, предотвращению прогрессированию или, по меньшей мере, замедлению прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления "лечить" и "лечение" относятся к облегчению, предотвращению развития или появления, или уменьшению продолжительности одного или более симптомов, связанных с заболеванием, расстройством или состоянием, таким как опухоль или более предпочтительно злокачественная опухоль. В конкретном варианте осуществления "лечить" и "лечение" относятся к предотвращению рецидива заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления "лечить" и "лечение" относятся к увеличению выживаемости индивида, страдающего от заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления "лечить" и "лечение" относятся к устранению заболевания, расстройства или состояния у индивида.

Согласно конкретным вариантам осуществления, композицию, используемую при лечении рака, иммунного заболевания, расстройства или состояния, аутоиммунного заболевания, расстройства или состояния, воспалительного заболевания, расстройства или состояния, инфекционного заболевания, расстройства или состояния, артериосклеротического заболевания, расстройства или состояния, сердечно-сосудистого заболевания, расстройства или состояния, связанного с нарушением метаболизма заболевания, расстройства или состояния, радиационного поражения, расстройства или состояния можно использовать в комбинации с другим видом лечения. Для лечения рака композицию можно использовать в комбинации с другим видом лечения, включая, без ограничения, химиотерапию, терапию с помощью анти-CD20 mAb, анти-CTLA-4 антитела, анти-LAG-3 mAb, анти-EGFR mAb, анти-HER-2 mAb, анти-CD19 mAb, анти-CD33 mAb, анти-CD73 mAb, анти-CD47 mAb, анти-DLL-3 mAb, mAb к апелину, анти-TIP-1 mAb, анти-CLDN18.2 mAb, анти-FOLR1 mAb, анти-PD-L1 антител, анти-PD-1 антител, PD-1/PD-L1 терапию, или терапию с помощью других иммуноонкологических лекарственных веществ, таргетную терапию, терапию с помощью антиангиогенных средств, лучевую терапию или терапию с помощью других противораковых лекарственных веществ. Анти-CD47 антитела можно использовать для конструирования биспецифических антител с mAb-партнерами к PD-1, PD-L1, LAG3, TIM-3, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33, CD73, апелину, DLL3, клаудину 18.2, TIP-1, CD3, фолатному альфа-рецептору и/или другим поверхностным опухолевым антигенам для лечения рака/опухолей, которые экспрессируют как CD47, так и специфический антиген, ассоциированный с опухолью.

Используемый в настоящем описании термин "в комбинации" в контексте введения индивиду двух или более терапевтических агентов относится к применению более чем одного вида терапии. Использование термина "в комбинации" не ограничивает порядок введения терапевтических агентов индивиду. Например, первый терапевтический агент (например, описанную в настоящей заявке композицию) можно вводить до (например, за 5, 15, 30, 45 мин; 1, 2, 4, 6, 12, 16, 24, 48, 72, 96 ч; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 или 12 недель), одновременно или после (например, через 5, 15, 30, 45 мин; 1, 2, 4, 6, 12, 16, 24, 48, 72, 96 ч; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 или 12 недель) введения индивиду второго терапевтического агента.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу определения уровня CD47 у индивида. Способ включает (а) получение образца от индивида; (b) приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и (с) определение уровня CD47 у индивида.

В контексте настоящего описания "образец" относится к биологическому образцу, полученному от индивида, и может включать, без ограничения, цельную кровь, сыворотку, плазму, клетки крови, эндотелиальные клетки, биопсию ткани (например, раковую ткань, печеночную ткань и т.д.), лимфатическую жидкость, асцитную жидкость, интерстициальную жидкость, костный мозг, спинномозговую жидкость, слюну, слизистую, мокроту, пот, мочу или любые другие выделения, экскрецию или другие жидкости организма. "Образец крови" относится к цельной крови или любой ее фракции, включая клетки крови, сыворотку и плазму. "Образец крови" может, например, содержать раковые клетки.

В некоторых вариантах осуществления уровень CD47 у индивида может быть определен с помощью анализов, выбранных, без ограничения, из: вестерн-блот анализа, анализа ELISA, анализа FACS и/или иммуногистохимии (IHC). Относительные уровни белка могут быть определены с помощью вестерн-блот анализа, анализа FACS и иммуногистохимии (IHC), а абсолютные уровни белка могут быть определены с помощью анализа ELISA. При определении относительных уровней CD47 уровни CD47 могут быть определены по меньшей мере между двумя образцами, например, между образцами, полученными от одного и того же индивида в разные моменты времени, между образцами, полученными из разных тканей одного и того же индивида, и/или между образцами, полученными от разных индивидов. Альтернативно, при определении абсолютных уровней CD47, например с помощью анализа ELISA, абсолютный уровень CD47 в образце может быть определен путем создания стандарта для анализа ELISA перед тестированием образца. Специалист в данной области поймет, какие аналитические методы использовать для определения уровня CD47 в полученном от индивида образце с помощью антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению.

Использование способов определения уровня CD47 в образце от индивида позволяет диагностировать аномальные (повышенные, пониженные или недостаточные) уровни CD47 при заболевании для принятия соответствующих решений относительно терапии. Такое заболевание может быть выбрано, без

ограничения, из рака, предпочтительно рака, выбранного из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточного рака, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), хронического лимфобластного лейкоза (CLL), хронического миелоидного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других видов гемобластоза, воспалительного заболевания, инфекционного заболевания, артериосклероза, сердечно-сосудистого заболевания, нарушения метаболизма, радиационного поражения, иммунного заболевания и/или аутоиммунного заболевания.

Варианты осуществления

Изобретение также предусматривает следующие неограничивающие варианты осуществления.

Вариант осуществления 1 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 177, 46, 47, 178, 112 и 179, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 51, 52, 53, 117, 118 и 119, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 54, 55, 56, 120, 121 и 122, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 57, 58, 59, 123, 124 и 125, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 60, 61, 62, 126, 127 и 128, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 180, 181, 182, 129, 130 и 131, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 72, 73, 74, 138, 139 и 140, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 78, 79, 80, 144, 145 и 146, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 81, 82, 83, 147, 148 и 149, соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 84, 85, 86, 150, 151 и 152, соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 87, 88, 89, 153, 154 и 155, соответственно;
- (12) SEQ ID NO: 90, 91, 92, 156, 157 и 158, соответственно;
- (13) SEQ ID NO: 93, 94, 95, 159, 160 и 161, соответственно;
- (14) SEQ ID NO: 96, 97, 98, 162, 163 и 164, соответственно;
- (15) SEQ ID NO: 99, 100, 101, 165, 166 и 167, соответственно;
- (16) SEQ ID NO: 102, 103, 104, 168, 169 и 170, соответственно;
- (17) SEQ ID NO: 105, 106, 107, 171, 172 и 173, соответственно;
- (18) SEQ ID NO: 108, 109, 110, 174, 175 и 176, соответственно; или
- (19) SEQ ID NO: 201, 202, 203, 204, 205 и 206, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с CD47, предпочтительно человеческого CD47.

Вариант осуществления 2 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 или 43, или вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 или 44.

Вариант осуществления 3 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, содержащее:

- (a) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 1 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 2;
- (b) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 3 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 4;
- (c) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 5 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 6;
- (d) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 7 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 8;
- (e) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 9 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 10;
- (f) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 11 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 12;
- (g) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 13 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 14;
- (h) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 15 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 16;
- (i) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 17 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 18;

вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 194;

m) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 188 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 196;

n) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 188 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 197; или

o) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 199 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 200.

Вариант осуществления 8 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антиген-связывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-7, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно блокировать связывание CD47 с тромбоспондином-1 (TSP1) и/или сигнал-регуляторным белком альфа SIRP α .

Вариант осуществления 9 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антиген-связывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-7, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно индуцировать опосредованный макрофагами фагоцитоз раковых клеток.

Вариант осуществления 10 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антиген-связывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-7, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно связываться с раковыми клетками, при этом связывание с эритроцитами происходит на уровне от минимального до недетектируемого.

Вариант осуществления 11 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-10.

Вариант осуществления 12 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 11.

Вариант осуществления 13 представляет собой клетку-хозяин, содержащую вектор по варианту осуществления 12.

Вариант осуществления 14 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-10 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 15 представляет собой способ блокирования связывания CD47 с тромбоспондином-1 (TSP1) у больного, включающий введение больному фармацевтической композиции по варианту осуществления 14.

Вариант осуществления 16 представляет собой способ блокирования связывания CD47 с сигнал-регуляторным белком альфа (SIRP α) у больного, включающий введение больному фармацевтической композиции по варианту осуществления 14.

Вариант осуществления 17 представляет собой способ лечения рака у больного, включающий введение больному фармацевтической композиции по варианту осуществления 14.

Вариант осуществления 18 представляет собой способ лечения воспалительного заболевания у больного, включающий введение больному фармацевтической композиции по варианту осуществления 14.

Вариант осуществления 19 представляет собой способ лечения инфекционного заболевания у больного, включающий введение больному фармацевтической композиции по варианту осуществления 14.

Вариант осуществления 20 представляет собой способ лечения артериосклероза у больного, включающий введение больному фармацевтической композиции по варианту осуществления 14.

Вариант осуществления 21 представляет собой способ лечения сердечно-сосудистого заболевания у больного, включающий введение больному фармацевтической композиции по варианту осуществления 14.

Вариант осуществления 22 представляет собой способ лечения нарушения метаболизма у больного, включающий введение больному фармацевтической композиции по варианту осуществления 14.

Вариант осуществления 23 представляет собой способ лечения радиационного поражения у больного, включающий введение больному фармацевтической композиции по варианту осуществления 14.

Вариант осуществления 24 представляет собой способ лечения аутоиммунного заболевания у больного, включающий введение больному фармацевтической композиции по варианту осуществления 14.

Вариант осуществления 25 представляет собой способ определения уровня CD47 у индивида, включающий (a) получение образца от индивида; (b) приведение образца в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому одному из вариантов осуществления 1-10; и (c) определение уровня CD47 у индивида.

Вариант осуществления 26 представляет собой способ по варианту осуществления 25, в котором образец представляет собой образец ткани.

Вариант осуществления 27 представляет собой способ по варианту осуществления 26, в котором образец ткани представляет собой образец раковой ткани.

Вариант осуществления 28 представляет собой способ по варианту осуществления 25, в котором образец представляет собой образец крови.

Вариант осуществления 29 представляет собой способ получения моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому одному из вариантов осуществления 1-10, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продуцирования моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Вариант осуществления 30 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-10, включающий объединение моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

Примеры

Пример 1. Идентификация моноклональных анти-CD47 антител.

Моноклональные анти-CD47 антитела (mAb) получали из мышей, иммунизированных рекомбинантным CD47-HIS человека и яванского мака. Вкратце, после иммунизации титр антител в сыворотке оценивали с помощью ELISA с использованием планшетов, покрытых huCD47-HIS и суCD47-HIS. В-клетки собирали и сливали с клеточной линией миеломы с получением гибридом. Гибридомы высевали в 20×384-луночные планшеты, и супернатанты из каждой лунки подвергали скринингу с помощью ELISA для оценки связывания с CD47 человека и яванского мака. 400 гибридом размножали, и дополнительно анализировали связывание с клетками RAJI с помощью анализа FACS, блокирование взаимодействия CD47/SIRPα, кинетику связывания с рекомбинантным huCD47 с помощью системы Octet, и тестировали на активность гемагглютинации, используя кровь человека. Затем клонировали гибридомы с наилучшими положительными результатами путем посева родительских гибридом по 1 клетке на лунку в 384-луночные планшеты и скрининга клональных супернатантов с помощью ELISA на связывание с huCD47. Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи, полученные из клональных гибридом, амплифицировали с помощью 5'RACE и секвенировали. Супернатанты этих клонов из масштабируемой культуры использовали для очистки антител с белком А для дальнейшей характеристики.

Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей моноклональных CD47 антител представлены в табл. 1 и 2, соответственно, а CDR области моноклональных анти-CD47 антител представлены в табл. 3 и 4. CDR области моноклональных анти-CD47 антител определяли с помощью метода IMGT.

Таблица 1

Последовательности переменных областей тяжелой цепи моноклональных анти-CD47 антител (mAb)

Клоны mAb	VH
9O23A	QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQRPGQGLEWIG WIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTVDSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR RGPWYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:1)
14P6A	QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTAYYINWVKQRPGQGLEWIG WIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTVDTSSTAYIQLSSLTSEDSAVYFCAR RGPWYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:3)
4M8A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKTSGYTFTSYWIHWVNQRPGQGLEWI GNIDPSDSETHYNPKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RWGGWLPLDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:5)
16M17A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYFTNYWMHWVKQRPGQGLE WIGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CARMAFITTVVDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:7)
13C4A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYFTSYWMHWVKQRPGQGLE WIGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CARWGYGRSPLDHWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:9)
14O18A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYFTSYWMHWVKQRPGQGLE WIGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLTLDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CARWYYGGSGAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:11)
5D24A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYFTSSWMHWVKQRPGQGLEW IGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARWGYGKSAIDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:13)
11G2A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYFTSYWMHWVKQRPGQGLE

	WIGNIDPSDSEAHYNQKFRDKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CARWGYGKSAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:15)
13B18A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLE WIGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CSRWGYGKSAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:17)
1J7A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLE WIGNIDPSDSETHYNQKFRDKATLTVDKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYY CARWGLRGAMDYWGQGTSTVTVS (SEQ ID NO:19)
14D18A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLE WIGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CARWGYGGRSPLDHWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:21)
3O5A	EVKLVESGGGLVQSGRSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQAPGKGLEWI AASRNKANDYTTEYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALRAEDTAIYY CARDTAYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO:23)
17C6A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLE WIGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSSTAHMQLSSLTSEDSAVYY CAGTDLAYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO:25)
14N13A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHWVKQRPGQGLEW IGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC AKGFSIDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:27)
10I23A	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDSLMLHWVKQRPEQGLEWI GWIDPEDGETKCAPKFQDKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAIYYCAV ISTVVAPDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:29)
12B18A	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSTGYFMNWVKQSHGKSLEWI GRINPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSSTAHEMLRSLTSEDSAIYYCA RGGVVATDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:31)
17O12A	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSTGYFMHWVKQSHGKSLEWI GRINPYNGDTFNNQKFKGKATLAVDKSSSTAHEMLRSLTSEDSTVYYC ARGGYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:33)
15G23A	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYVIHWWVKQKPGQGLEWI GYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCA KGGTGTGDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:35)
17N8A	EVKLEESGGGMVQPGGSMKVCVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLE WVAQIRLKSDNYATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDTG IYYCTGGGKGGFAYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO:37)
18M19A	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEW IGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYC AKGGYYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:39)
11F6A	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDSLMLHWVKQRPEQGLEWI GWIDPEDGETKCAPKFQDKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAIYYCAR ITTVVATDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:41)
19L14A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPGQGLEWI GNSNPGSSSTNYNEKFKSKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSDSAVYYCA REGLRRFAYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO:43)

VH: варибельная область тяжелой цепи.

Таблица 2
Последовательности переменных областей легкой цепи моноклональных анти-CD47 mAb

Клоны mAb	VL
9O23A	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLSCKASDNVGTYYVSWYQQKPEQSPKLLI YGASNRYTGVPDRFTGSGSARDFTLTITSVQAEDLADYHCGQSYSYPLT FGAGTKLELK (SEQ ID NO:2)
14P6A	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLSCKASENVGTYYVSWYQQKPEQSPNLLIY GASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISVQAEDLADYHCGQTYSYPLTF GAGTKLELK (SEQ ID NO:4)
4M8A	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKNISKYLAWFQKPGKTNKLLIYSG STLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAMYYCQQHNEYPWTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:6)
16M17A	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWYQKPGKTNKLLIYSG STLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAMYYCQQHNEYPWTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:8)
13C4A	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWYQKPGKTNKLLIYSG SSLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAMYYCQQHNEYPWTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:10)
14O18A	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWYQKPGKTNKLLIYSG STLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAMYYCQQHNEYPWTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:12)
5D24A	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWYQKPGKTNKLLIYSG

	STLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPWTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:14)
11G2A	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSG STLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPWTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:16)
13B18A	AVQITQFPSYLAASPGQTITINCRASKSISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSG STLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPWTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:18)
1J7A	DVQITQSPTYLTASPGETITINCRANKSISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSG STLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPWTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:20)
14D18A	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSG STLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPWTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:22)
3O5A	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLHSNGNTYLYWFLQRPQGSPQ LLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGYYCMQHLEY PFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:24)
17C6A	DIQMNQSPSSLSASLGDITITICHASQNINWLSWYQQKPGNIPKLLIYK ASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDIATYYCQQGQSYPWTFGG GTKLEIK (SEQ ID NO:26)
14N13A	DIVMSQSPSSLAHSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQ SPKVLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQY YSYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:28)
10I23A	DVVMQTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSP KLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCSQSTHV PWTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:30)
12B18A	DVVMQTQTPVSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQRPQGSP KLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCSQSTHV PFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:32)
17O12A	DVVMQTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSP KLLIYRVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCFQSTHV PHTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:34)
15G23A	DVVMQTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSP KLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCSQSTHV PPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:36)
17N8A	DVVMQTQTPSLPVS LGDQASISCRSTQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSP KLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCSQSTHV PLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:38)
18M19A	DVVMQTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSP KLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCSQSTHV PWTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:40)
11F6A	DVVMQTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSP KLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCSQSTHV PLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:42)
19L14A	ENVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGASPKLWI YSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPFTF GSGTKLEIK (SEQ ID NO:44)

VL: варибельная область легкой цепи.

Таблица 3
CDR области 1-3 тяжелой цепи анти-CD47 mAb

Клоны mAb	HC		
	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
9O23A	GYTFTDYY (45)	IYPGSGNT (46)	ARRGPWYFDV (47)
14P6A	GYTFTAYY (48)	IYPGSGNT (49)	ARRGPWYFDV (50)
4M8A	GYTFTSYW (51)	IDPSDSET (52)	ARWGGWLPLDY (53)
16M17A	GYTFTNYW (54)	IDPSDSET (55)	ARMAFITTVVDY (56)
13C4A	GYTFTSYW (57)	IDPSDSET (58)	ARWGYYGRSPLDH (59)
14O18A	GYTFTSYW (60)	IDPSDSET (61)	ARWYYGGSGAMDY (62)
5D24A	GYTFTSSW (63)	IDPSDSET (64)	ARWGYYGKSAIDY (65)
11G2A	GYTFTSYW (66)	IDPSDSEA (67)	ARWGYYGKSAMDY (68)
13B18A	GYTFTSYW (69)	IDPSDSET (70)	SRWGYYGKSAMDY (71)
1J7A	GYTFTSYW (72)	IDPSDSET (73)	ARWGLRGAMDY (74)
14D18A	GYTFTSYW (75)	IDPSDSET (76)	ARWGYYGRSPLDH (77)
3O5A	GFTFSDFY (78)	SRNKANDYTT (79)	ARDTAY (80)
17C6A	GYTFTSYW (81)	IDPSDSET (82)	AGTDLAY (83)
14N13A	GYIFTSYW (84)	IDPSDSET (85)	AKGFSDY (86)
10I23A	GFNIKDSL (87)	IDPEDGET (88)	AVISTVVAPDY (89)
12B18A	GYSFTGYF (90)	INPYNGDT (91)	ARGGVVATDY (92)
17O12A	GYSFTGYF (93)	INPYNGDT (94)	ARGGYAMDY (95)
15G23A	GYTFTNYV (96)	INPYNDGT (97)	AKGGTGTGDY (98)
17N8A	GFTFSNYW (99)	IRLKSDNYAT (100)	TGGGKGGFAY (101)
18M19A	GYTFTSYV (102)	INPYNDGT (103)	AKGGYYAMDY (104)
11F6A	GFNIKDSL (105)	IDPEDGET (106)	ARITTVVATDY (107)
19L14A	GYTFTSYW (108)	SNPGSSST (109)	AREGLRRFAY (110)

HC: тяжелая цепь; CDR: определяющая комплементарность область CDR HC анти-CD47 mAb определяли с помощью метода IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27: 209-212).

Таблица 4
CDR области 1-3 легкой цепи анти-CD47 mAb

Клоны mAb	LC		
	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
9O23A	DNVGTY (111)	GAS (112)	GQSYSYPLT (113)
14P6A	ENVGTY (114)	GAS (115)	GQTYSYPLT (116)
4M8A	KNISKY (117)	SGS (118)	QQHNEYPWT (119)
16M17A	KSISKY (120)	SGS (121)	QQHNEYPWT (122)
13C4A	KSISKY (123)	SGS (124)	QQHNEYPWT (125)
14O18A	KSISKY (126)	SGS (127)	QQHNEYPWT (128)
5D24A	KSISKY (129)	SGS (130)	QQHNEYPWT (131)
11G2A	KSISKY (132)	SGS (133)	QQHNEYPWT (134)
13B18A	KSISKY (135)	SGS (136)	QQHNEYPWT (137)
1J7A	KSISKY (138)	SGS (139)	QQHNEYPWT (140)
14D18A	KSISKY (141)	SGS (142)	QQHNEYPWT (143)
3O5A	KSLHSNGNTY (144)	RMS (145)	MQHLEYPFT (146)
17C6A	QNINWV (147)	KAS (148)	QQGQSYPT (149)
14N13A	QSLYSSNQKNY (150)	WAS (151)	QQYYSYPLT (152)
10I23A	QSLVHSNGNTY (153)	KVS (154)	SQSTHVPWT (155)
12B18A	QSLVHSNGNTY (156)	KVS (157)	SQSTHVPFT (158)
17O12A	QSLVHSNGNTY (159)	RVS (160)	FQSTHVPHT (161)
15G23A	QSLVHSNGNTY (162)	KVS (163)	SQSTHVPPLT (164)
17N8A	QSLVHSNGNTY (165)	KVS (166)	SQSTHVPLT (167)
18M19A	QSLVHSNGNTY (168)	KVS (169)	SQSTHVPWT (170)
11F6A	QSLVHSNGNTY (171)	KVS (172)	SQSTHVPLT (173)
19L14A	SSVSSSY (174)	STS (175)	QQYSGYPFT (176)

LC: легкая цепь; CDR: определяющая комплементарность область.

CDR LC анти-CD47 mAb определяли с помощью метода IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27: 209-212).

Пример 2. Детектирование связывания CD47 mAb с RAJI клетками с помощью анализа FACS.

Анти-CD47 mAb анализировали с помощью проточной цитометрии на их способность связываться с CD47 на клеточной поверхности. Клетки RAJI (ATCC # CCL-86) (20000 клеток), культивированные в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS), инкубировали либо с раствором очищенных mAb (1 мкг/мл) в HBSS, либо только в HBSS. Используя вторичное Ab IgG, конъюгированное с AlexaFluor488, измеряли присутствие мышиных анти-CD47 mAb на клетках RAJI с помощью FACS (IntelliCyt iQue® Screener; Albuquerque, NM). Результаты анализа FACS по связыванию анти-CD47 mAb представлены на фиг. 1.

Пример 3. Анализ способности анти-CD47 mAb блокировать взаимодействие CD47/SIRPα.

Активность супернатантов гибридомы или очищенных анти-CD47 mAb в отношении блокирования взаимодействия SIRPα/CD47 измеряли с помощью анализа ELISA. Рекombинантный человеческий CD47(ECD)-HIS (1 мкг/мл) иммобилизовали на 384-луночном планшете для ELISA. Связывание рекombинантного белка huSIRP-huFc-биотин (конечная концентрация 0,5 мкг/мл) оценивали в присутствии возрастающих количеств мышиных анти-CD47-mAb в трех повторах. Связанный SIRPα определяли, используя HRP-конъюгированное вторичное антитело в комплексе со стрептавидином (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA). После добавления CD47, блокирующего раствора, белка SIRPα, вторичного антитела и реагентов для определения выполняли этапы промывки, используя PBS с добавлением 0,1% Tween-20. Результаты анализов ELISA представлены на фиг. 2A-2O. Для химерного антитела 18M19A (IgG4 и основная цепь капа) (фиг. 2P) блокирующую активность измеряли в 96-луночном планшете для ELISA. Рекombинантный человеческий CD47(ECD)-HIS (1 мкг/мл) иммобилизовали на планшете. Связывание рекombинантного huSIRPα-muFc (конечная концентрация 0,5 мкг/мл) измеряли в присутствии возрастающих количеств человеческого анти-CD47 mAb в двух повторах. Связанный SIRPα измеряли с помощью HRP-конъюгированного вторичного анти-muFc антитела (Jackson ImmunoResearch; West Grove,

РА). Планшеты промывали, как описано выше. Детектирование выполняли с использованием субстрата ТМВ для детектирования (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA). Результат анализа ELISA представлен на фиг. 2Р.

Пример 4. Оценка способности анти-CD47 mAb индуцировать гемагглютинацию.

Для оценки гемагглютинирующей способности анти-CD47 mAb очищенные mAb добавляли при двукратном серийном разведении в 96-луночный прозрачный круглодонный планшет и инкубировали с 2,5% суспензией человеческих эритроцитов (huRBC) в PBS (конечная концентрация RBC 0,25%) при комнатной температуре в течение 1 ч. Об отсутствии гемагглютинации свидетельствовало наличие четких пятен в центре круглодонных пластин. Доказательством гемагглютинации служило наличие однородного цвета во всей лунке. Результаты анализа гемагглютинации представлены на фиг. 3А-3В.

Пример 5. Оценка *in vivo* эффективности химерного 13B18A на модели ксенотрансплантата клеток RAJI.

Химерный вариант антитела 13B18A (13B18A-huIgG1) конструировали путем слияния переменных областей (VH и VL) 13B18A с константными областями тяжелой цепи и легкой цепи каппа человека, соответственно. Полученное антитело стабильно экспрессировалось в стабильных пулах CHO, его очищали с помощью аффинной колонки с белком А. Для оценки эффективности 13B18A-huIgG1 клетки RAJI инокулировали подкожно в правый бок каждой мыши NOD/SCID (самки, n=10/группа). Мышей обрабатывали указанными дозами тестируемых антител, когда средний размер опухоли достигал 100 мм³. Дозы вводили внутривенно 3 раза в неделю с 6 по 27 день, и объемы опухолей измеряли в тот же день в двух измерениях, используя штангенциркуль. Для фармакокинетического (ПК) анализа сыворотку собирали через 48 ч после введения конечной дозы, и уровни 13B18A-huIgG1 в сыворотке измеряли путем детектирования человеческого Fc, связанного на планшетах ELISA, покрытых рекомбинантным человеческим CD47(ECD)-HIS. Стандартную кривую строили, используя с в качестве стандарта с известной концентрацией сыворотку, меченную 13B18A-huIgG1. После промывки PBS с добавлением 0,1% Твин-20 связанное антитело детектировали с помощью HRP-конъюгированного вторичного анти-huFc антитела (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) с последующим добавлением субстрата ТМВ для детектирования (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA). Кривые роста опухоли показаны на фиг. 4А. Данные по массе тела приведены на фиг. 4В. Фармакокинетические параметры (ПК) показаны на фиг. 4С.

Пример 6. Гуманизация анти-CD47 mAb.

Мышиные анти-CD47 mAb 13B18A, 14P6A и 17C6A гуманизировали для уменьшения иммуногенности при использовании на пациентах, являющихся людьми. Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей (VH и VL) сравнивали с последовательностями человеческих антител, присутствующих в базе данных Protein Data Bank (PDB), и строили модели гомологии. CDR как тяжелой, так и легкой цепей мышиных mAb прививали на человеческие каркасы, которые имели самую высокую вероятность сохранения надлежащей структуры, вероятно, необходимой для связывания антигена. При необходимости получали обратные мутации от человеческих остатков к мышиным остаткам или другие мутации. Последовательности гуманизированных VH и VL областей приведены в табл. 5 и 6, соответственно. Гуманизированные VH и VL области сливали с константными областями тяжелой цепи и легкой каппа-цепи человеческого IgG4, соответственно. Конструкции, соответствующие последовательностям mAb, использовали для временной трансфекции в клетки 293E, и очищенные mAb анализировали с помощью ELISA на их способность блокировать взаимодействие SIRPα/CD47. Результаты представлены в виде оптической плотности, где более высокая оптическая плотность указывает на более высокий уровень взаимодействия SIRPα/CD47. Значения IC₅₀ для гуманизированных mAb представлены в табл. 7. Кривые IC₅₀ для гуманизированных mAb H3L9 и H5L5 показаны на фиг. 5А-5В. Результаты анализа гемагглютинации представлены на фиг. 6. Области CDR гуманизированного mAb H8L10 представлены в табл. 8.

Таблица 5
Последовательности переменных областей тяжелой цепи гуманизированных анти-CD47 mAb

Конструкция	VH	SEQ ID NO:
H1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMHW VRQAPGQG LEWMGNIDPSDSETHYNQKFKDRVTLTVDTSTSTVYME LSSLRSED AVYYCSRWGYGKSAMDYWGQGLTVTVSS	183
H2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHW VRQAPGQGL EWMGNIDPSDSETHYNQKFKDRVTLTVDTSTSTAYMEL SSLRSEDTA VYYCSRWGYGKSAMDYWGQGLTVTVSS	184
H3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHW	185
	VRQAPGQGL EWIGNIDPSDSETHYNQKFKDRATLTVDSTSTAYMELS SLRSEDTA VYYCSRWGYGKSAMDYWGQGLTVTVSS	
H4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHW VRQAPGQGL EWIGNIDPSDSETHYNQKFKDRATLTVDSTSTAYMELS SLRSEDTA VYYCSRWGYGKSAMDYWGQGLTVTVSS	186
H5	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTAYYINWVR QAPGQRLE WIGWIYPGSGNTKYNEKFKGRVTLTVDTASTAYIELSS LRSEDTAV YYCARRGPWYFDVWGQGTITVTVSS	187
H6	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTAYYINWVR QAPGQRLE WIGWIYPGSGNTKYNEKFKGRVTLTVDTASTAYIELSS LRSEDTAV YFCARRGPWYFDVWGQGTITVTVSS	188
H7	QIQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTAYYINWVR QAPGQGLE WIGWIYPGSGNTKYNEKFKGRATLTVDASTAYIELSS LRSEDTAV YFCARRGPWYFDVWGQGTITVTVSS	189
H8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMHW VRQAPGQG LEWMGNIDPSDSETHYAKFKQGRVTLTVDKSTSTVYME LSSLRSED AVYYCAGTDLAYWGQGLTVTVSS	199

Таблица 6
Последовательности переменных областей легкой цепи гуманизированных анти-CD47 mAb

Конструкция	VL	SEQ ID NO:
L1	AVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKYLAWYQQKP	190
	GKANKLLIYSG STLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFAMYYCQQH NEYPWTFGGGT KVEIK	
L2	AVQLTQSPSFLSASVGQRITINCRASKSISKYLAWYQQKP GKANKLLIYSGS TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFAMYYCQQHN EYPWTFGGGTK VEIK	191
L3	AVQLTQSPSFLSASVGQRITINCRASKSISKYLAWYQEK GKANKLLIYSGS TLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAMYYCQQHN EYPWTFGGGTK VEIK	192
L4	AVQITQSPSFLSASVGQTITINCRASKSISKYLAWYQEKPG KANKLLIYSGST LQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAMYYCQQHNE YPWTFGGGTKVE IK	193
L5	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASENVGTYVSWYQQK PGQAPNLLIYGA SNRYTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYHCGQT YSYPLTFGQGTK LEIK	194
L6	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASENVGTYVSWYQQK PGQSPNLLIYGA SNRYTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYHCGQT YSYPLTFGQGTK LEIK	195
L7	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASENVGTYVSWYQQK PGQSPNLLIYGA SNRYTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYHCGQT YSYPLTFGQGTK LEIK	196
L8	NIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASENVGTYVSWYQQK	197

	PGQSPNLLIYGA SNRYTGVPDRFSGSGSATDFTLTISLQPEDFADYHCGQT YSYPLTFGQGTK LEIK	
L9	DVQLTQSPSFLSASVGDRVITTCRASKSISKYLAWYQQKP GKANKLLIYSG STLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFAMYYCQQH NEYPWTFGGGT KVEIK	198
L10	EIVMTQSPGTLSPGERATLSCHASQNINVWLSWYQQK PGQAPRLLIYKA SNLHTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQG QSYPTFTFGQGTK VEIK	200

Таблица 7

Значения IC₅₀ для анти-CD47 mAb в анализе взаимодействия SIRP α /CD47

ID mAb	IC50 (нМ)
H1L2	6,80
H1L3	7,43
H1L4	8,09
H2L1	4,73
H2L3	9,56
H2L4	6,52
H3L1	5,62
H3L2	7,88
H3L4	5,35
H3L9	9,60
H5L5	15,06
H6L5	9,67
H6L7	39,16
H6L8	13,20
H8L10	1,05

H1L2 относится к mAb с вариабельной областью тяжелой цепи H1 и вариабельной областью легкой цепи L2; этим правилам соответствуют и все другие гуманизированные mAb, приведенные в таблице.

Таблица 8

Области CDR 1-3 тяжелой и легкой цепей гуманизированного mAb H8L10

	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
HC	GYTFTSYW (201)	IDPSDSET (202)	AGTDLAY (203)
LC	QNINW (204)	KAS (205)	QQGQSYPT (206)

Пример 7. Анализы связывания эритроцитов (RBC) и RAJI.

С помощью проточной цитометрии анализировали способность анти-CD47 mAb H3L9, H5L5 и H8L10 связываться с CD47 на клеточной поверхности. Выполняли серийное разведение (1:3) очищенных mAb в буфере FACS (сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS), содержащий 0,1% BSA и 0,05% азида натрия). Верхняя концентрация очищенного mAb составляла 190 мкг/мл. Эритроциты или клетки RAJI (ATCC # CCL-86) (14000 клеток) осаждали в U-образных чашках центрифугированием при 600 об/мин (62×g) в течение 5 мин. Клетки ресуспендировали в 20 мкл очищенных антител в буфере FACS и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. После инкубации клетки трижды промывали буфером FACS. Используя вторичное PE/Cy7-конъюгированное Ab к человеческому IgG (Biolegend, Cat # 409316), измеряли количество анти-CD47 mAb на эритроцитах и клетках RAJI с помощью анализа FACS (проточный цитометр Attune NxT; Carlsbad, CA). Результаты анализа FACS по связыванию анти-CD47 mAb представлены на фиг. 7A-7B.

Пример 8. Клеточный анализ связывания SIRP α .

Клетки RAJI культивировали в RPMI+10% FBS. Белок человеческий SIRP α (ECD)-mFc (huSIRP α -muFc) (ECD человеческого SIRP α , слитый с мышиным Fc) в конечной концентрации 30 нМ инкубировали с очищенными гуманизированными анти-CD47 mAb при 30, 90 и 300 нМ. Затем смесь добавляли к 14000 клеток RAJI в круглодонном 96-луночном планшете, перемешивали и инкубировали в нутаторе в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем клетки центрифугировали при 600 об/мин в течение 5 мин и трижды промывали буфером FACS (HBSS с добавлением 0,1% BSA и 0,05% азида натрия). После этого клетки инкубировали с FITC-конъюгированными поликлональными ослиными антителами к мышиному Fc (Jackson ImmunoResearch, Cat: 715-095-150) в нутаторе в течение 15 мин при комнатной температуре, трижды промывали буфером FACS и затем ресуспендировали в буфере FACS. Затем клетки пропускали через прибор Attune NxT, и данные анализировали с помощью программного обеспечения Attune NxT. Результаты по блокированию гуманизированными анти-CD47 mAb H3L9, H5L5 и H8L10 связывания huSIRP α -muFc с клетками RAJI показаны на фиг. 8.

Пример 9. Анализ опосредованного макрофагами фагоцитоза.

Моноциты человека индуцировали в течение 6 дней в среде AIM-V (Thermo Fisher, Cat: 12055091), содержащей 50 нг/мл GM-CSF (Shenandoah, Cat: 100-08-20ug). Затем макрофаги поляризовали с помощью 100 нг/мл INF-гамма (Shenandoah, Cat: 100-77-100 мкг) в течение дополнительных 2 дней. Макрофаги M1 определяли как популяцию CD14⁺, CD80⁺, CD163⁻ и CD206⁺ клеток. После отделения от планшетов для тканевых культур макрофаги промывали один раз RPMI-1640, содержащей 10% FBS, а затем дважды ледяным HBSS. Количество клеток доводили до 2 $\times$ 10⁶ клеток/мл в среде AIM-V. К 50 мкл клеток RAJI (100000 клеток), меченных CFSE (Thermo Fisher, Cat: 34570), в каждой лунке 96-луночного планшета добавляли 25 мкл тестируемых mAb и 25 мкл клеточной суспензии макрофагов (50000 клеток) и выдерживали в течение 2 ч при 37°C. Конечная концентрация mAb составляла 10 мкг/мл. После совместного культивирования клеточные смеси окрашивали PE-Су7-конъюгированным mAb к человеческому CD14 (Biolegend, Cat: 367111). После окрашивания клетки анализировали методом проточной цитометрии. Процент как CFSE, так и PE-Су7-позитивных макрофагов в популяции PE-Су7-позитивных макрофагов представлен в виде фагоцитоза. Результаты индукции гуманизированными анти-CD47 mAb H3L9, H5L5 и H8L10 опосредованного макрофагами фагоцитоза клеток RAJI показаны на фиг. 9.

Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены изменения без отклонения от общей концепции изобретения. Следовательно, предполагается, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными раскрытыми вариантами осуществления и охватывает модификации, находящиеся в пределах сущности и объема настоящего изобретения, определенных настоящим описанием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 с полипептидными последовательностями:

(1) SEQ ID NO: 201, 202, 203, 204, 205 и 206, соответственно; или

(2) SEQ ID NO: 81, 82, 83, 147, 148 и 149, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с CD47.

2. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где CD47 представляет собой CD47 человека.

3. Выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 199 или 25, или вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 200 или 26.

4. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, содержащее:

а) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 199 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 200; или

б) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 25 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 26.

5. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным или человеческим или гуманизированным.

6. Выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно блокировать связывание CD47 с сигнальным белком альфа (SIRP α), индуцируя опосредованный макрофагами фагоцитоз злокачественных клеток и/или связываться со злокачественными клетками, при этом связывание с эритроцитами про-

исходит на уровне от минимального до недетектируемого.

7. Биспецифическое антитело, содержащее моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6.

8. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6.

9. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифическое антитело по п.7.

10. Вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.8 или 9.

11. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.10.

12. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый носитель или биспецифическое антитело по п.7 и фармацевтически приемлемый носитель.

13. Способ блокирования связывания CD47 с сигнал-регуляторным белком α (SIRP α) у больного, включающий введение больному фармацевтической композиции по п.12.

14. Способ определения уровня CD47 у индивида, включающий:

(a) получение образца от индивида;

(b) приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-6; и

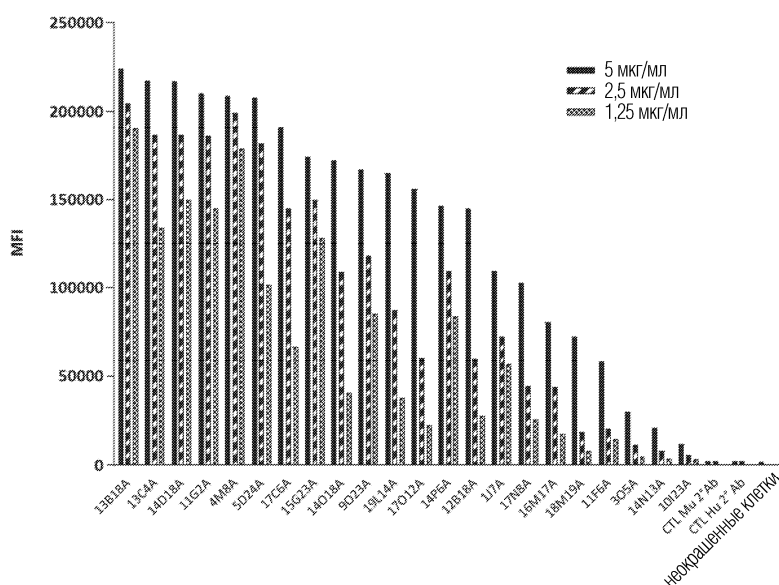
(c) определение уровня CD47 у индивида.

15. Способ по п.14, в котором образец представляет собой образец ткани или образец крови, необязательно, где образец ткани представляет собой образец злокачественной ткани.

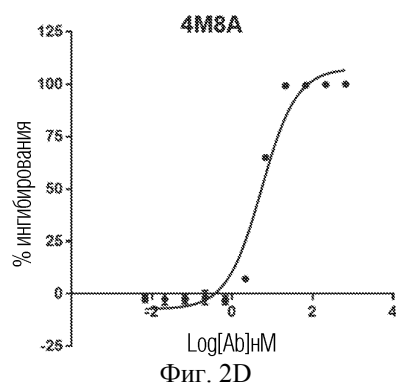
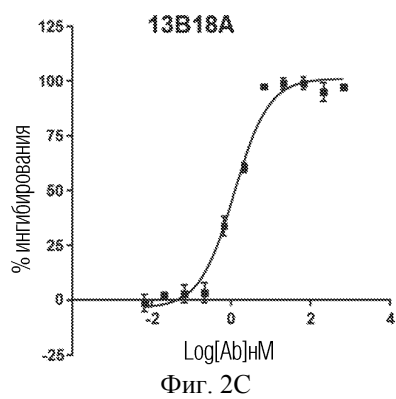
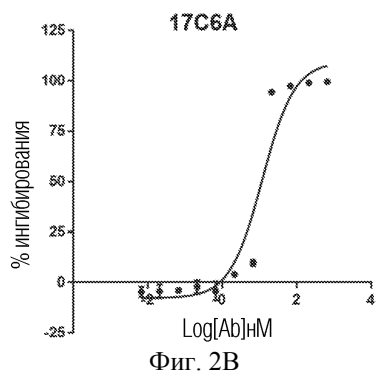
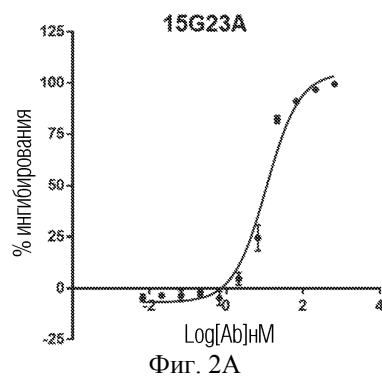
16. Способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-6, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продуцирования моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

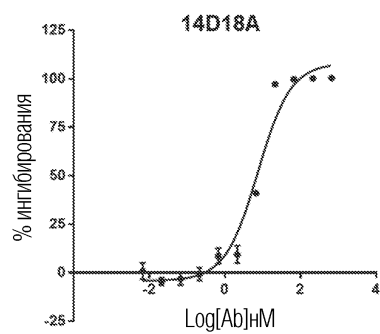
17. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, включающий объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

18. Способ лечения заболевания и/или состояния, выбранного из группы, состоящей из злокачественной опухоли, воспалительного заболевания, инфекционного заболевания, артериосклероза, сердечно-сосудистого заболевания, нарушения метаболизма, радиационного поражения и аутоиммунного заболевания у больного, включающий введение больному фармацевтической композиции по п.12.

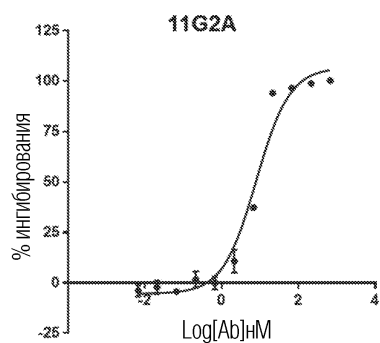


Фиг. 1

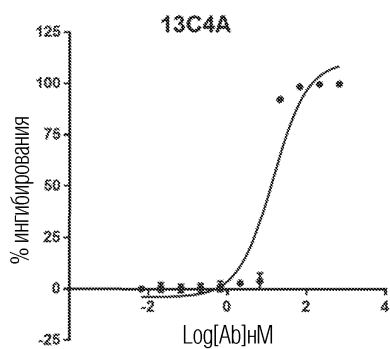




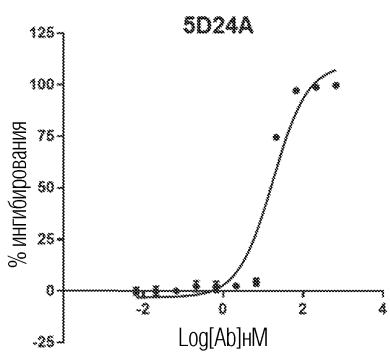
Фиг. 2Е



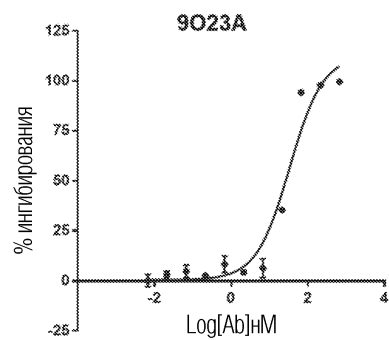
Фиг. 2F



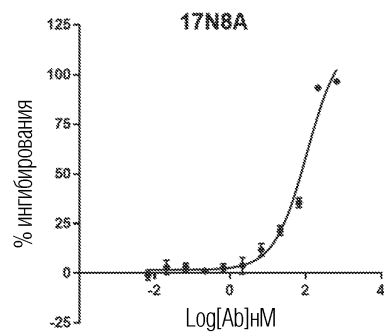
Фиг. 2G



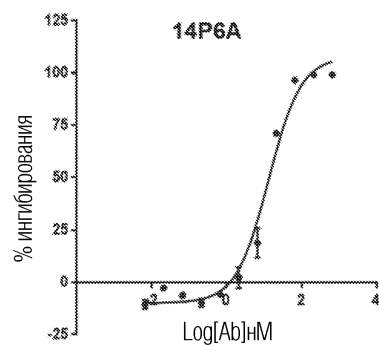
Фиг. 2H



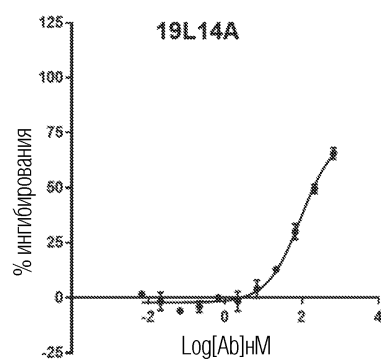
Фиг. 2I



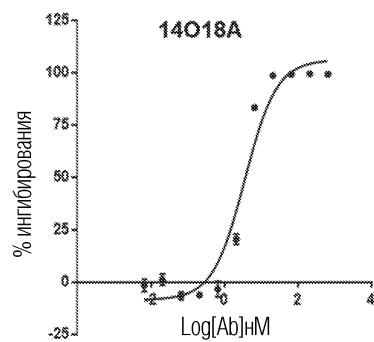
Фиг. 2J



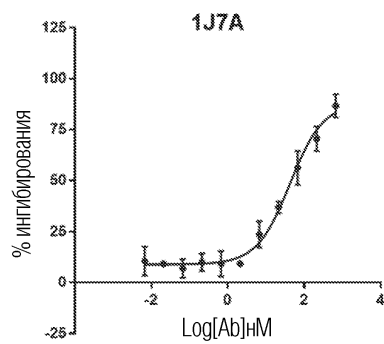
Фиг. 2K



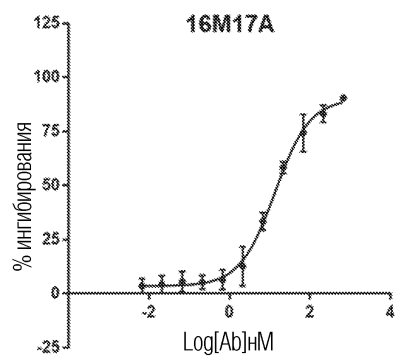
Фиг. 2L



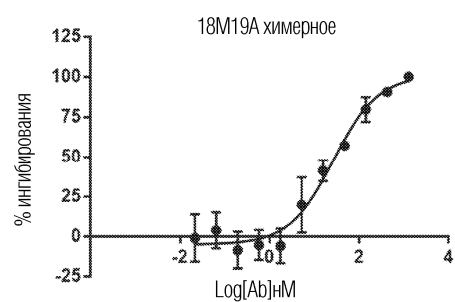
Фиг. 2М



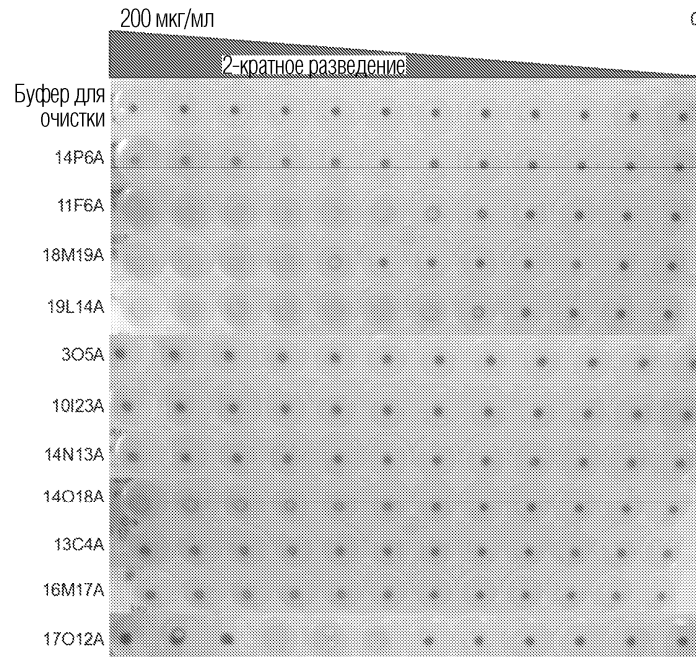
Фиг. 2N



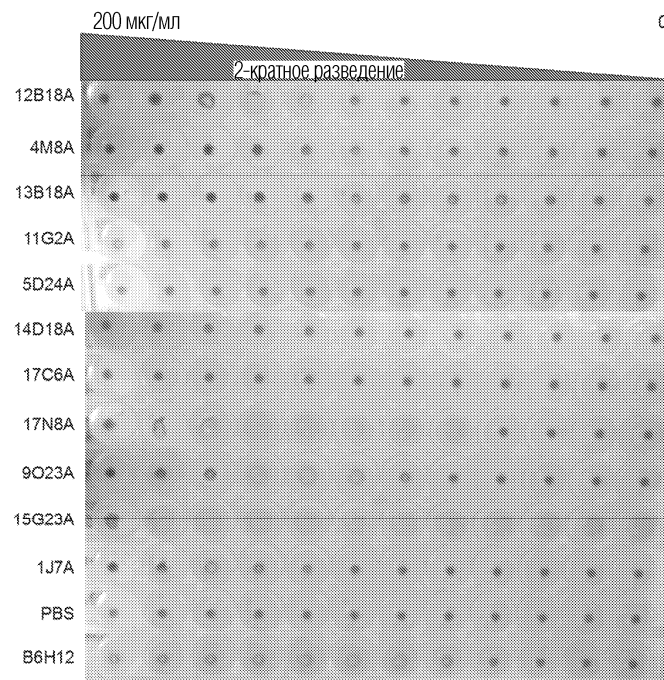
Фиг. 2O



Фиг. 2P



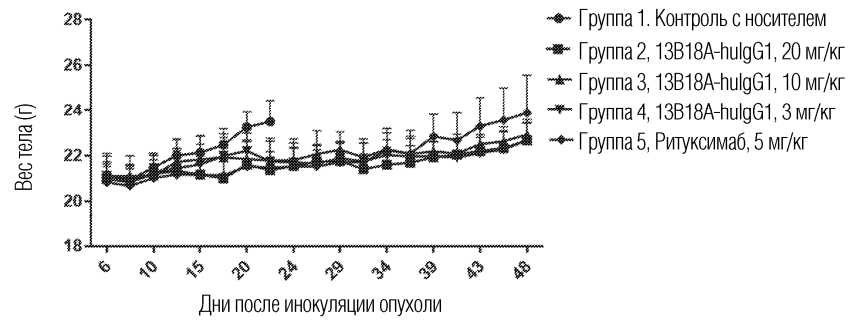
Фиг. 3А



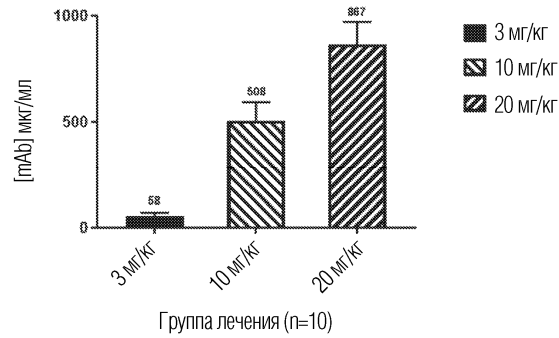
Фиг. 3В



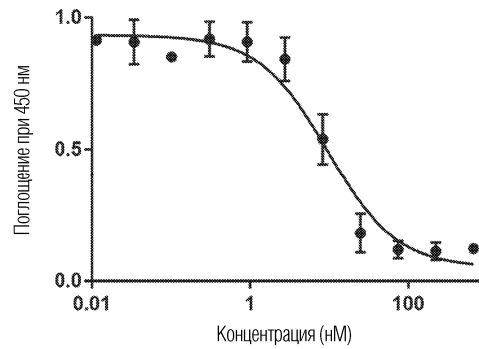
Фиг. 4А



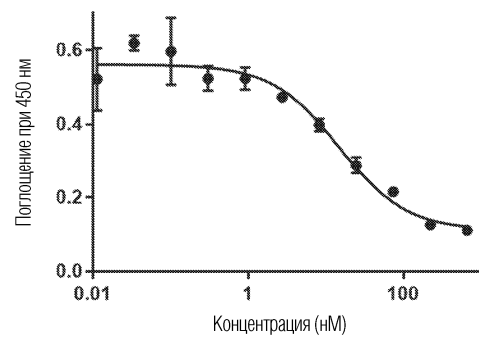
Фиг. 4В



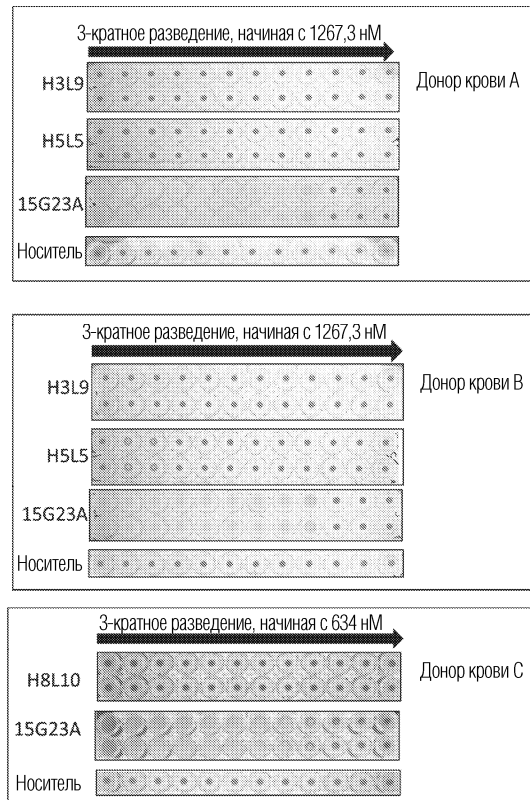
Фиг. 4С



Фиг. 5А

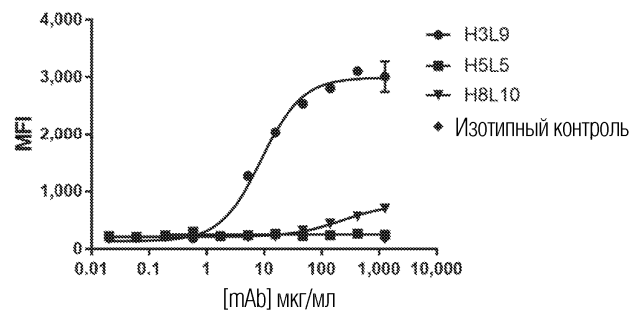


Фиг. 5В



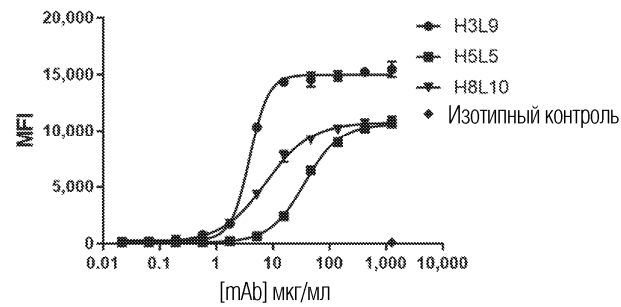
Фиг. 6

Связывание эритроцитов

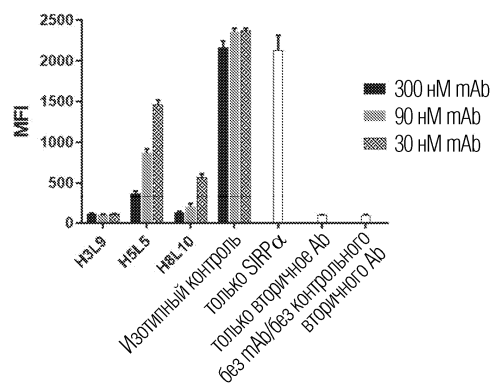


Фиг. 7А

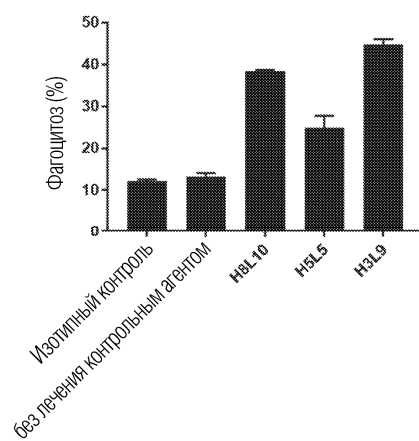
Связывание RAJI-клеток



Фиг. 7В



Фиг. 8



Фиг. 9

