

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045361**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.20

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

(21) Номер заявки
202091339

(22) Дата подачи заявки
2018.11.29

**(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD47 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

(31) 62/593,712

(32) 2017.12.01

(33) US

(43) 2020.10.21

(86) PCT/US2018/062961

(87) WO 2019/108733 2019.06.06

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Гардай Шира, Ливенгуд Мэттью,
Транг Вивиан, Вестендорф Лори,
Карозино Кристофер, Фельдхаус
Майкл, Ло Чэ-Леунг (US)**

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

(56) WO-A1-2017121771
WO-A2-2011143624
WO-A1-2016179335
US-A1-2016152711
WO-A2-2015048329

I-JU CHEN ET AL.: "Selective antibody activation through protease-activated pro-antibodies that mask binding sites with inhibitory domains", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 7, no. 1, 14 September 2017 (2017-09-14), XP55586093, DOI: 10.1038/s41598-017-11886-7 paragraph linking pages 5-6; Applicability of LAP inhibitory domain in an anti-TNF-alfa antibody; abstract

(57) Предложены гуманизированные антитела, включая экранированные антитела, которые специфически связываются с CD47. Предложены способы применения антител против CD47, включая экранированные антитела, для модуляции активности (например, ингибирования пролиферации) клетки, экспрессирующей CD47, а также для лечения одного или более заболеваний или патологий (например, онкологического заболевания), связанных с клетками, экспрессирующими CD47.

B1**045361****045361****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/593712, поданной 1 декабря 2017 г., которая включена в данный документ в полном объеме и для любых целей посредством ссылки.

Область изобретения

Данное изобретение относится к области лечения онкологических заболеваний, основанной на использовании антител. В частности, данное изобретение относится к новым гуманизированным антителам против CD47 и их антигенсвязывающим фрагментам или их конъюгатам, которые необязательно могут быть связаны с пригодным для удаления экранирующим агентом, и их применению для лечения онкологических заболеваний, характеризующихся экспрессией CD47.

Уровень техники

Кластер дифференцировки 47 (CD47), также известный как белок, связанный с интегрином (IAP - integrin associated protein), представляет собой трансмембранный рецептор, принадлежащий к суперсемейству белков иммуноглобулинов. CD47 повсеместно экспрессируется на клетках и служит маркером распознавания "своего", предотвращая фагоцитоз, служа сигналом "не ешь меня". CD47 опосредует свои эффекты посредством взаимодействия с несколькими другими белками, включая тромбоспондин (TSP) и сигнальный регуляторный белок-альфа (SIRP α). Взаимодействие между SIRP α на фагоцитирующих клетках и CD47 на клетках-мишенях помогает гарантировать, что клетки-мишени не будут поглощены.

Некоторые виды онкологических заболеваний используют механизм уклонения клеток от иммунитета, основанный на CD47, увеличивая экспрессию CD47 на клеточной поверхности раковой клетки, тем самым избегая удаления иммунной системой. Однако известные в данной области техники способы лечения, нацеленные на клетки, экспрессирующие CD47, у субъекта, нацелены как на раковые клетки, так и клетки, не являющиеся раковыми, что приводит к токсичности у субъекта, такой как уменьшение количества эритроцитов и тромбоцитов в периферической крови. Следовательно, существует потребность в композициях и способах селективного нацеливания на CD47 в раковых клетках без нацеливания на клетки, не являющиеся раковыми.

Краткое описание сущности изобретения

Данное раскрытие основано на открытии новых гуманизированных антител против CD47 и их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых аспектах изобретения предложены гуманизированные антитела против CD47 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат пригодный для удаления экранирующий агент (например, суперспиральный экранирующий агент), который предотвращает связывание антител против CD47 или их антигенсвязывающих фрагментов с белком CD47. В некоторых вариантах реализации данного изобретения, экранирующий агент может быть удален (например, расщеплен) одной или более молекулами (например, протеазами), которые присутствуют в окружающей среде раковых клеток. Удаление экранирующего агента восстанавливает способность антител против CD47 или их антигенсвязывающих фрагментов связывать CD47, таким образом, обеспечивая специфическое нацеливание антител против CD47 или их антигенсвязывающих фрагментов на белок CD47 в контексте раковых клеток.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложено гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, выбранную из SEQ ID NO: 16, 19, 21 и 23; HCDR2, выбранную из SEQ ID NO: 17, 20, 22 и 24; и HCDR3 SEQ ID NO: 18; при этом указанная вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, выбранную из SEQ ID NO: 31 и 34; LCDR2, выбранную из SEQ ID NO: 32 и 35; и LCDR3, выбранную из SEQ ID NO: 33 и 36; при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность с идентичностью, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% относительно аминокислотной последовательности выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8; при этом указанная вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность с идентичностью, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% относительно аминокислотной последовательности выбранной из SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 и 15.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложено гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, выбранную из SEQ ID NO: 16, 19, 21 и 23; HCDR2, выбранную из SEQ ID NO: 17, 20, 22 и 24; и HCDR3 SEQ ID NO: 18; при этом указанная вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, выбранную из SEQ ID NO: 31 и 34; LCDR2, выбранную из SEQ ID NO: 32 и 35; и LCDR3, выбранную из SEQ ID NO: 33 и 36; при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

каркасную последовательность IGHV3-23/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 88, при этом положения каркасной последовательности H44, H49, H82, H89, H91 и H94, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора; или

каркасную последовательность IGHV3-48/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 89, при этом положение каркасной последовательности H49, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляет собой остаток донора; или

каркасную последовательность IGHV3-66/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 90, при этом положения каркасной последовательности H29, H49, и H82, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора; или

каркасную последовательность IGHV3-74/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 91, при этом положение каркасной последовательности H49, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляет собой остаток донора; и

при этом указанная вариабельная область легкой цепи содержит:

каркасную последовательность IGKV6-21/KJ2 человека, представленную в SEQ ID NO: 92, при этом положения каркасной последовательности L4, L21, L69 и L85, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора; или

каркасную последовательность IGKV1-27/KJ2 человека, представленную в SEQ ID NO: 93, при этом положения каркасной последовательности L21, L49 и L69, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения, вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, выбранные из: SEQ ID NO: 16, 17 и 18; SEQ ID NO: 19, 20 и 18; SEQ ID NO: 21, 22 и 18; SEQ ID NO: 16, 20 и 18; и SEQ ID NO: 23, 24 и 18. В некоторых вариантах реализации данного изобретения, вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, выбранные из: 31, 32 и 33; SEQ ID NO: 31, 32 и 36; и SEQ ID NO: 34, 35 и 33. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, выбранные из SEQ ID NO: 16, 17, 18, 31, 32 и 33; SEQ ID NO: 16, 17, 18, 34, 35 и 33; SEQ ID NO: 19, 20, 18, 31, 32 и 33; SEQ ID NO: 19, 20, 18, 34, 35 и 33; SEQ ID NO: 21, 22, 18, 31, 32 и 33; SEQ ID NO: 21, 22, 18, 34, 35 и 33; SEQ ID NO: 16, 20, 18, 31, 32 и 33; SEQ ID NO: 16, 20, 18, 34, 35 и 33; SEQ ID NO: 23, 24, 18, 31, 32 и 33; SEQ ID NO: 23, 24, 18, 34, 35 и 33; SEQ ID NO: 16, 17, 18, 31, 32 и 36; SEQ ID NO: 19, 20, 18, 31, 32 и 36; SEQ ID NO: 21, 22, 18, 31, 32 и 36; SEQ ID NO: 16, 20, 18, 31, 32 и 36; и SEQ ID NO: 23, 24, 18, 31, 32 и 36.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложено гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, выбранную из SEQ ID NO: 25, 28 и 29; HCDR2, выбранную из SEQ ID NO: 26 и 30; и HCDR3 SEQ ID NO: 27; и при этом указанная вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, выбранную из SEQ ID NO: 37 и 40; и LCDR2 SEQ ID NO: 38; и LCDR3, выбранную из SEQ ID NO: 39 и 41; при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность с идентичностью, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% относительно аминокислотной последовательности выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8; при этом указанная вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность с идентичностью, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% относительно аминокислотной последовательности выбранной из SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 и 15.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложено гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, выбранную из SEQ ID NO: 25, 28 и 29; HCDR2, выбранную из SEQ ID NO: 26 и 30; и HCDR3 SEQ ID NO: 27; и при этом указанная вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, выбранную из SEQ ID NO: 37 и 40; и LCDR2 SEQ ID NO: 38; и LCDR3, выбранную из SEQ ID NO: 39 и 41; при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

каркасную последовательность IGHV3-23/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 88, при этом положения каркасной последовательности H44, H49, H82, H89, H91 и H94, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора; или

каркасную последовательность IGHV3-48/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 89, при этом положение каркасной последовательности H49, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляет собой остаток донора; или

каркасную последовательность IGHV3-66/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 90, при этом положения каркасной последовательности H29, H49, и H82, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора; или

каркасную последовательность IGHV3-74/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 91, при этом положение каркасной последовательности H49, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляет собой остаток донора; и при этом указанная вариабельная область легкой цепи содержит:

каркасную последовательность IGKV6-21/KJ2 человека, представленную в SEQ ID NO: 92, при

этом положения каркасной последовательности L4, L21, L69 и L85, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора; или

каркасную последовательность IGKV1-27/KJ2 человека, представленную в SEQ ID NO: 93, при этом положения каркасной последовательности L21, L49 и L69, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения, переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, выбранные из: SEQ ID NO: 25, 26 и 27; SEQ ID NO: 28, 26 и 27; SEQ ID NO: 29, 30 и 27; и SEQ ID NO: 29, 26 и 27. В некоторых вариантах реализации данного изобретения, переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, выбранные из: SEQ ID NO: 37, 38 и 39; SEQ ID NO: 40, 38 и 39; и SEQ ID NO: 37, 38 и 41. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, выбранные из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 37, 38 и 39; SEQ ID NO: 25, 26, 27, 40, 38 и 39; SEQ ID NO: 25, 26, 27, 37, 38 и 41; SEQ ID NO: 28, 26, 27, 37, 38 и 39; SEQ ID NO: 28, 26, 27, 40, 38 и 39; SEQ ID NO: 28, 26, 27, 37, 38 и 41; SEQ ID NO: 29, 30, 27, 37, 38 и 39; SEQ ID NO: 29, 30, 27, 40, 38 и 39; SEQ ID NO: 29, 30, 27, 37, 38 и 41; SEQ ID NO: 29, 26, 27, 37, 38 и 39; SEQ ID NO: 29, 26, 27, 40, 38 и 39; и SEQ ID NO: 29, 26, 27, 37, 38 и 41.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В некоторых вариантах реализации данного изобретения переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 и 15. В некоторых вариантах реализации данного изобретения переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи содержат SEQ ID NO: 2 и 10; SEQ ID NO: 3 и 11; SEQ ID NO: 3 и 12; SEQ ID NO: 3 и 13; SEQ ID NO: 3 и 14; SEQ ID NO: 4 и 11; SEQ ID NO: 4 и 12; SEQ ID NO: 4 и 13; SEQ ID NO: 4 и 14; SEQ ID NO: 5 и 11; SEQ ID NO: 5 и 12; SEQ ID NO: 5 и 13; SEQ ID NO: 5 и 14; SEQ ID NO: 6 и 11; SEQ ID NO: 6 и 12; SEQ ID NO: 6 и 13; SEQ ID NO: 6 и 14; SEQ ID NO: 7 и 11; SEQ ID NO: 7 и 12; SEQ ID NO: 7 и 13; SEQ ID NO: 7 и 14; SEQ ID NO: 8 и 11; SEQ ID NO: 8 и 12; SEQ ID NO: 8 и 13; SEQ ID NO: 8 и 14; SEQ ID NO: 3 и 15.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложено гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1 SEQ ID NO: 16, HCDR2 SEQ ID NO: 17, и HCDR3 SEQ ID NO: 18; и при этом указанная переменная область легкой цепи содержит LCDR1 SEQ ID NO: 31, LCDR2 SEQ ID NO: 32, и LCDR3 SEQ ID NO: 33; и при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, с 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности относительно SEQ ID NO: 3, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, с 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности относительно SEQ ID NO: 13; и при этом антитело имеет пониженную гемагглютинацию эритроцитов по сравнению с Ab47. В некоторых вариантах реализации данного изобретения переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах реализации гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленных в данном документе, переменная область тяжелой цепи содержит:

каркасную последовательность IGHV3-23/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 88, при этом положения каркасной последовательности H44, H49, H82, H89, H91 и H94, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора; или

каркасную последовательность IGHV3-48/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 89, при этом положение каркасной последовательности H49, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляет собой остаток донора; или

каркасную последовательность IGHV3-66/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 90, при этом положения каркасной последовательности H29, H49, и H82, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора; или

каркасную последовательность IGHV3-74/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 91, при этом положение каркасной последовательности H49, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляет собой остаток донора.

В некоторых таких вариантах реализации данного изобретения, H29 представляет собой F, H44 представляет собой R или G, H49 представляет собой A, H82 представляет собой M или I, H89 представляет собой I или V, H91 представляет собой F или Y и H94 представляет собой R, согласно нумерации по Кабату.

В некоторых вариантах реализации гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленных в данном документе, переменная область легкой цепи содержит:

каркасную последовательность IGKV6-21/KJ2 человека, представленную в SEQ ID NO: 92, при этом положения каркасной последовательности L4, L21, L69 и L85, в соответствии с нумерацией по Ка-

бату, представляют собой остатки донора; или

каркасную последовательность IGKV1-27/KJ2 человека, представленную в SEQ ID NO: 93, при этом положения каркасной последовательности L21, L49 и L69, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора.

В некоторых таких вариантах реализации данного изобретения, L4 представляет собой M, L21 представляет собой L, L49 представляет собой K, L69 представляет собой T или S, и L85 представляет собой V или T, согласно нумерации по Кабату.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой изотип IgG1. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают повышенной антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ, ADCC) по сравнению с их исходным антителом. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают повышенным антителозависимым клеточным фагоцитозом (АЗКФ, ADCP) по сравнению с их исходным антителом. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают повышенной комплемент-зависимой цитотоксичностью (КЗЦ, CDC) по сравнению с их исходным антителом. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой Fab, Fab', F(ab')₂, фрагмент Fv, диатело, одноцепочечное антитело, фрагмент scFv или scFv-Fc. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют апоптоз клеток, экспрессирующих CD47, *in vitro* и/или *in vivo*. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет пониженное фукозилирование остова по сравнению с их исходным антителом. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является афукозилированным. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует взаимодействие между CD47 и SIRPα. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет пониженную гемагглютинацию эритроцитов по сравнению с Ab47.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложена последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложен вектор экспрессии, который содержит указанную последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложена клетка-хозяин, которая содержит указанную нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложена клетка-хозяин, которая экспрессирует антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе. В некоторых вариантах реализации данного изобретения способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, представленный в данном документе, включает культивирование клетки-хозяина. В некоторых вариантах реализации данного изобретения способ дополнительно включает выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложены способы лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложены способы лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, у субъекта, включающие:

идентификация субъекта как имеющего онкологическое заболевание, которое характеризуется экспрессией CD47; и

введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в данном документе.

В некоторых таких вариантах реализации данного изобретения, этап а) включает:

- i) получение раковой ткани; и
- ii) обнаружение CD47 в выделенной раковой ткани.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложены способы лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, у субъекта, включающие:

идентификация субъекта с повышенными уровнями инфильтрации макрофагов в раковой ткани по сравнению с тканью, не являющейся раковой; и

введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в данном документе.

В некоторых таких вариантах реализации данного изобретения, этап а) включает:

- i) получение от субъекта раковой ткани и окружающей ткани, не являющейся раковой;
- ii) обнаружение макрофагов в выделенной раковой ткани и в ткани, не являющейся раковой; и
- iii) сравнение количественной оценки окрашивания в раковой ткани по сравнению с тканью, не являющейся раковой. В некоторых вариантах реализации данного изобретения окрашивание макрофагов проводят с использованием антитела против CD163.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения способы лечения онкологического заболевания включают идентификацию субъекта как имеющего онкологическое заболевание, характеризующееся экспрессией CD47, и повышенные уровни инфильтрации макрофагов в раковой ткани по сравнению с тканью, не являющейся раковой.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложен способ индукции апоптоза клетки, экспрессирующей CD47, включающий контактирование клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном документе. В некоторых вариантах реализации данного изобретения, клетки находятся *in vitro*. В некоторых вариантах реализации данного изобретения, клетки находятся *in vivo*.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложено экранированное антитело, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком CD47 человека и, по меньшей мере, один экранирующий домен, при этом, по меньшей мере, один экранирующий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 44-55, 75-86, 94 и 95. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложено экранированное антитело, которое содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в настоящем документе, и по меньшей мере, один экранирующий домен. В некоторых вариантах реализации данного изобретения, по меньшей мере один, экранирующий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 44-55, 75-86, 94 и 95.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения, по меньшей мере один, экранирующий домен снижает аффинность связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с белком CD47 человека по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без, по меньшей мере, одного экранирующего домена. В некоторых вариантах реализации данного изобретения аффинность связывания снижается, по меньшей мере, в около 100 раз по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без, по меньшей мере, одного экранирующего домена. В некоторых вариантах реализации данного изобретения аффинность связывания снижается от около 200 раз до около 1500 раз по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без, по меньшей мере, одного экранирующего домена.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь связана с первым экранирующим доменом; или при этом легкая цепь связана со вторым экранирующим доменом; или при этом тяжелая цепь связана с первым экранирующим доменом и легкая цепь связана со вторым экранирующим доменом. В некоторых вариантах реализации данного изобретения первый экранирующий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 44, 46, 48, 50, 52, 54, 75, 77, 79, 81, 83, 85 и 94; и второй экранирующий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 45, 47, 49, 51, 53, 55, 76, 78, 80, 82, 84, 86 и 95. В некоторых вариантах реализации данного изобретения первый экранирующий домен и второй экранирующий домен представляют собой пару экранирующих доменов, выбранных из: SEQ ID NO: 44 и 45; SEQ ID NO: 46 и 47; SEQ ID NO: 48 и 49; SEQ ID NO: 50 и 51; SEQ ID NO: 52 и 53; SEQ ID NO: 54 и 55; SEQ ID NO: 75 и 76; SEQ ID NO: 77 и 78; SEQ ID NO: 79 и 80; SEQ ID NO: 81 и 82; SEQ ID NO: 83 и 84; SEQ ID NO: 85 и 86; и SEQ ID NO: 94 и 95. В некоторых вариантах реализации данного изобретения первый экранирующий домен связан с N-концом тяжелой цепи, а второй экранирующий домен связан с N-концом легкой цепи.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения каждый экранирующий домен содержит пригодный для расщепления протеазой линкер и связан с тяжелой цепью или легкой цепью через пригодный для расщепления протеазой линкер. В некоторых вариантах реализации данного изобретения пригодный для расщепления протеазой линкер содержит сайт расщепления матриксной металлопротеазой (ММП). В некоторых вариантах реализации данного изобретения сайт расщепления ММП выбран из сайта расщепления ММП2, сайта расщепления ММП7, сайта расщепления ММП9 и сайта расщепления ММП3. В некоторых вариантах реализации данного изобретения после расщепления с помощью ММП тяжелая цепь и/или легкая цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления ММП. В некоторых вариантах реализации данного изобретения фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления содержит последовательность LRSG, SG или VR на N-конце антитела.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе. В некоторых вариантах реализации данного изобретения экранированное антитело содержит тяжелую цепь, связанную с первым экранирующим доменом и имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и легкую цепь, связанную со вторым экранирующим доменом и имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложена последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует экранированное антитело, представленное в данном документе. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложен вектор экспрессии, который содержит указанную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложена

клетка-хозяин, которая экспрессирует экранированное антитело, представленное в данном документе. В некоторых вариантах реализации данного изобретения способ получения экранированного антитела, представленный в данном документе, включает культивирование клетки-хозяина. В некоторых вариантах реализации данного изобретения способ дополнительно включает выделение экранированного антитела.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложены способы лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества экранированного антитела, представленного в данном документе.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложены способы лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, у субъекта, включающие:

a) идентификацию субъекта как имеющего повышенные уровни ММП в опухоли по сравнению с окружающей тканью, не являющейся раковой; и

b) введение субъекту терапевтически эффективного количества экранированного антитела, представленного в данном документе, при этом каждый экранирующий домен экранированного антитела содержит пригодный для расщепления протеазой линкер и при этом пригодный для расщепления протеазой линкер содержит сайт расщепления матриксной металлопротеазой (ММП). В некоторых вариантах реализации данного изобретения сайт расщепления ММП выбран из сайта расщепления ММП2, сайта расщепления ММП7, сайта расщепления ММП9 и сайта расщепления ММП13. В некоторых вариантах реализации данного изобретения ММП выбрана из ММП2, ММП7, ММП9 и ММП13. В некоторых вариантах реализации данного изобретения, этап a) содержит:

- i) получение от субъекта раковой ткани и ткани, не являющейся раковой;
- ii) обнаружение ММП в выделенной раковой ткани и в ткани, не являющейся раковой; и
- iii) сравнение количественной оценки окрашивания в раковой ткани по сравнению с тканью, не являющейся раковой.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложены способы лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, у субъекта, включающие:

идентификация субъекта как имеющего онкологическое заболевание, которое характеризуется экспрессией CD47; и

введение субъекту терапевтически эффективного количества экранированного антитела, представленного в данном документе.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения, этап a) содержит:

- i) получение раковой ткани; и
- ii) обнаружение CD47 в выделенной раковой ткани.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложены способы лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, у субъекта, включающие:

идентификация субъекта с повышенными уровнями инфильтрации макрофагов в раковой ткани по сравнению с тканью, не являющейся раковой; и

введение субъекту терапевтически эффективного количества экранированного антитела, представленного в данном документе.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения, этап a) содержит:

- i) получение от субъекта раковой ткани и окружающей ткани, не являющейся раковой;
- ii) обнаружение макрофагов в выделенной раковой ткани и в ткани, не являющейся раковой; и
- iii) сравнение количественной оценки окрашивания в раковой ткани по сравнению с тканью, не являющейся раковой. В некоторых вариантах реализации данного изобретения окрашивание макрофагов проводят с использованием антитела против CD163.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложены способы лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, у субъекта, включающие идентификацию субъекта как имеющего (a) повышенные уровни ММП в опухоли по сравнению с окружающей тканью, не являющейся раковой и (b) онкологическое заболевание, характеризующееся экспрессией CD47. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложены способы лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, у субъекта, включающие идентификацию субъекта как имеющего (a) повышенные уровни ММП в опухоли по сравнению с окружающей тканью, не являющейся раковой и (b) повышенные уровни макрофагальной инфильтрации в раковой ткани по сравнению с тканью, не являющейся раковой. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложены способы лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, у субъекта, включающие идентификацию субъекта как имеющего (a) онкологическое заболевание, характеризующееся экспрессией CD47 и (b) повышенные уровни инфильтрации макрофагов в раковой ткани по сравнению с тканью, не являющейся раковой. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложены способы лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, у субъекта, включающие идентификацию субъекта как имеющего (a) повышенные уровни ММП в опухоли по сравнению с окружающей тканью, не являющейся раковой, и (b) онкологическое заболевание, характеризующееся экспрессией CD47, и (c) повышенные уровни инфильтрации макрофагов в раковой ткани по

сравнению с тканью, не являющейся раковой.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения экранированное антитело содержит, по меньшей мере, один экранирующий домен, содержащий пригодный для расщепления протеазой линкер, и при этом пригодный для расщепления протеазой линкер расщепляется в микроокружении опухоли. В некоторых вариантах реализации данного изобретения после расщепления пригодного для расщепления протеазой линкера в микроокружении опухоли экранирующий домен высвобождается из антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах реализации данного изобретения пригодный для расщепления протеазой линкер содержит аминокислотную последовательность IPVSLRSG (SEQ ID NO: 73) или GPLGVR (SEQ ID NO: 57). В некоторых вариантах реализации данного изобретения пригодный для расщепления протеазой линкер содержит сайт расщепления ММП. В некоторых вариантах реализации данного изобретения сайт расщепления ММП выбран из сайта расщепления ММП2, сайта расщепления ММП7, сайта расщепления ММП9 и сайта расщепления ММП3. В некоторых вариантах реализации данного изобретения, после высвобождения антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент имеет фрагмент из аминокислотных остатков пригодного для расщепления протеазой линкера. В некоторых вариантах реализации данного изобретения фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления содержит последовательность LRSR, SR или VR на N-конце антитела.

В различных вариантах реализации данного изобретения онкологическое заболевание, характеризующееся экспрессией CD47, представляет собой гемобластоз или солидный рак. В некоторых вариантах реализации данного изобретения онкологическое заболевание, характеризующееся экспрессией CD47, выбрано из неходжкинской лимфомы, В-лимфоцитарной лимфомы; В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза/лимфомы из малых лимфоцитов, синдрома Рихтера, фолликулярной лимфомы, множественной миеломы, миелофиброза, истинной полицитемии, Т-клеточной лимфомы кожи, моноклональной гаммапатии неустановленной этиологии (MGUS), миелодиспластического синдрома (MDS), иммунобластной крупноклеточной лимфомы, В-лимфоцитарного лейкоза из клеток-предшественников, острого миелоидного лейкоза (AML) и анапластической крупноклеточной лимфомы. В некоторых вариантах реализации данного изобретения онкологическое заболевание, характеризующееся экспрессией CD47, выбрано из рака легких, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака печени, рака яичника, рака яичка, рака почки, рака мочевого пузыря, рака позвоночника, рака головного мозга, рака шейки матки, рака эндометрия, колоректального рака, рака анального канала, рака пищевода, рака желчного пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака головы и шеи, рака кожи, меланомы, рака простаты, рака гипофиза, рака матки, рака влагалища и рака щитовидной железы. В некоторых вариантах реализации данного изобретения онкологическое заболевание, характеризующееся экспрессией CD47, выбрано из рака легких, саркомы, колоректального рака, рака головы и шеи, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака желудка, меланомы и рака молочной железы.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент или экранированное антитело вводят в комбинации с ингибитором молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из одного или более из белка запрограммированной смерти клетки 1 (PD-1), лиганда запрограммированной смерти клетки 1 (PD-L1), PD-L2, цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA-4), белка 3, содержащего домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), ген активации лимфоцитов 3 (LAG-3), карциномэмбриональной антигензависимой молекулы клеточной адгезии 1 (CEACAM-1), CEACAM-5, V-доменного иммуноглобулинового супрессора активации Т-клеток (VISTA), В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA), Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT), иммуноглобулино-подобного рецептора, ассоциированного с лейкоцитами (типа 1) (LAIR1), CD160, 2B4 или TGFR. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент или экранированное антитело вводят в комбинации с агонистическим антителом против CD40. В некоторых вариантах реализации данного изобретения агонистическое антитело против CD40 имеет низкие уровни фукозилирования или является афукозилированным. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент или экранированное антитело вводят в сочетании с конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC), при этом антитело ADC специфически связывается с белком, который экспрессируется на внеклеточной поверхности раковой клетки и антитело конъюгировано с соединением линкер-лекарственное средство, содержащим цитотоксический агент. В некоторых вариантах реализации данного изобретения цитотоксический агент представляет собой ауристатин. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело ADC конъюгировано с соединением линкер-лекарственное средство, выбранным из vcMMAE и mcMMAF.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент или антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент экранированного антитела проявляют пониженную гемагглютинацию *in vitro* по сравнению с их исходным антителом против CD47. В некоторых вариантах реализации данного изобретения исходное антитело представляет собой Ab47. В некоторых вариантах реализации данного изобретения введение антитела против CD47 или экранированного антитела не вызывает гемагглютинацию у субъекта. В некоторых вариантах

реализации данного изобретения антитело против CD47 или экранированное антитело вызывает апоптоз клеток, экспрессирующих CD47, *in vitro* и/или *in vivo*. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или экранированное антитело вызывает апоптоз клеток, экспрессирующих CD47, *in vivo*. В некоторых вариантах реализации данного изобретения клетки, экспрессирующие CD47, представляют собой раковые клетки.

В одном аспекте предложено гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR, представленные в виде SEQ ID NO: 16 (GYGMS), 17 (TITSGGTYTYYPDSVKG) и 18 (SLAGNAMDY), и каркасную последовательность IGHV3-23/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 88 (фиг. 1A), при этом положения каркасной последовательности H44, H49, H82, H89, H91 и H94, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора.

В другом аспекте предложено гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR, представленные в виде SEQ ID NO: 16 (GYGMS), 17 (TITSGGTYTYYPDSVKG) и 18 (SLAGNAMDY), и каркасную последовательность IGHV3-48/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 89 (фиг. 1B), при этом положение каркасной последовательности H49, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляет собой остаток донора.

В еще одном аспекте предложено гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR, представленные в виде SEQ ID NO: 16 (GYGMS), 17 (TITSGGTYTYYPDSVKG) и 18 (SLAGNAMDY), и каркасную последовательность IGHV3-66/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 90 (фиг. 1C), при этом положения каркасной последовательности H29, H49 и H82, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора.

В еще одном аспекте предложено гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR, представленные в виде SEQ ID NO: 16 (GYGMS), 17 (TITSGGTYTYYPDSVKG) и 18 (SLAGNAMDY), и каркасную последовательность IGHV3-74/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 91 (фиг. 1D), при этом положение каркасной последовательности H49, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляет собой остаток донора.

В еще одном аспекте предложено гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR, представленные в виде SEQ ID NO: 31 (RASQTISDYLH), 32 (FASQSIG) и 33 (QNGHGFPR); и каркасную последовательность IGKV6-21/KJ2 человека, представленную в SEQ ID NO: 92 (фиг. 1G), при этом положения каркасной последовательности L4, L21, L69 и L85, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора.

В еще одном аспекте предложено гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR, представленные в виде SEQ ID NO: 31 (RASQTISDYLH), 32 (FASQSIG) и 33 (QNGHGFPR); и каркасную последовательность IGKV1-27/KJ2 человека, представленную в SEQ ID NO: 93 (фиг. 1H), при этом положения каркасной последовательности L21, L49 и L69, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора.

В одном варианте реализации данного изобретения положение каркасной последовательности L4 занято M, L21 занято L, L49 занято K, L69 занято T или S, и L85 занято V или T, в соответствии с нумерацией по Кабату.

В одном варианте реализации данного изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую идентичность последовательности, по меньшей мере, 90% относительно любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую идентичность последовательности, по меньшей мере, 90% относительно любой из SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 и 15.

В одном варианте реализации данного изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит мутацию G91A в LCDR3, в соответствии с нумерацией по Кабату.

В одном варианте реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой изотип IgG1.

В одном варианте реализации данного изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент обладает повышенной антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ) по сравнению с их ис-

ходным антителом.

В одном варианте реализации данного изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент обладает повышенным антителозависимым клеточным фагоцитозом (АЗКФ) по сравнению с их исходным антителом.

В одном варианте реализации данного изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеют пониженное фукозилирование остова по сравнению с их исходным антителом.

В одном варианте реализации данного изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент блокирует взаимодействие между CD47 и SIRP α .

В одном варианте реализации данного изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеют пониженную гемагглютинацию эритроцитов по сравнению с его исходным антителом.

В одном аспекте предложена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека.

В одном варианте реализации данного изобретения антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, Fab', F(ab')₂, фрагмент Fv, диатело, одноцепочечное антитело, фрагмент scFv или scFv-Fc.

В одном аспекте предложен способ лечения онкологического заболевания, характеризующегося CD47, у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего экранирующий агент (также называемый "экранирующим доменом"), при этом экранирующий агент содержит один или более суперспиральных пептидов, которые снижают аффинность связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с CD47 человека по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента.

В одном варианте реализации данного изобретения пригодный для расщепления протеазой линкер присоединяет экранирующий агент к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту.

В одном варианте реализации данного изобретения пригодный для расщепления протеазой линкер имеет аминокислотную последовательность, содержащую IPVSLRSG (SEQ ID NO: 73) или GPLGVR (SEQ ID NO: 57).

В одном варианте реализации данного изобретения пригодный для расщепления протеазой линкер содержит сайт расщепления матриксной металлопротеазой (ММП).

В одном варианте реализации данного изобретения сайт расщепления ММП выбран из сайта расщепления ММП2, сайта расщепления ММП7, сайта расщепления ММП9 и сайта расщепления ММП3.

В одном варианте реализации данного изобретения экранирующий агент высвобождается из антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента после расщепления сайта расщепления ММП в микроокружении опухоли с помощью ММП.

В одном варианте реализации данного изобретения расщепленное антитело против CD47 имеет фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления ММП.

В одном варианте реализации данного изобретения фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления содержит последовательность LRSG, SG или VR на N-конце антитела.

В одном варианте реализации данного изобретения один или более суперспиральных пептидов содержат одну или более последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 и 55. В одном варианте реализации данного изобретения один или более суперспиральных пептидов содержат одну или более последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 и 86. В одном варианте реализации данного изобретения один или более суперспиральных пептидов содержат одну или более последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 94 и 95.

В одном варианте реализации данного изобретения связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента с CD47 уменьшается, по меньшей мере, в около 100 раз по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента.

В одном варианте реализации данного изобретения связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента с CD47 уменьшается от в около 200 раз до в около 1500 раз по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента.

В одном варианте реализации данного изобретения онкологическое заболевание, характеризующееся экспрессией CD47, представляет собой гемобластоз, который вызывает солидный рак.

В одном варианте реализации данного изобретения гемобластоз выбран из неходжкинской лимфомы, В-лимфобластной лимфомы; В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза/лимфомы из малых лимфоцитов, синдрома Рихтера, фолликулярной лимфомы, множественной миеломы, миелофиброза, истинной полицитемии, Т-клеточной лимфомы кожи, моноклональной гаммапатии неустановленной этиологии (MGUS), миелодиспластического синдрома (MDS), иммунобластной крупноклеточной лимфомы, В-лимфобластного лейкоза из клеток-предшественников, острого миелоидного лейкоза (AML) и анапластической крупноклеточной лимфомы.

В одном варианте реализации данного изобретения онкологическое заболевание, характеризующееся экспрессией CD47, представляет собой солидный рак.

В одном варианте реализации данного изобретения солидный рак выбран из рака легких, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака печени, рака яичника, рака яичка, рака почки, рака мо-

чевого пузыря, рака позвоночника, рака головного мозга, рака шейки матки, рака эндометрия, колоректального рака, рака анального канала, рака пищевода, рака желчного пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, саркомы, рака головы и шеи, меланомы, рака кожи, рака простаты, рака гипофиза, рака матки, рака влагалища и рака щитовидной железы.

В одном варианте реализации данного изобретения солидный рак выбран из рака легких, саркомы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака желудка, меланомы, колоректального рака, рака головы и шеи, и рака молочной железы.

В одном варианте реализации данного изобретения субъект представляет собой человека, болеющего солидным раком.

В одном варианте реализации данного изобретения антитело против CD47 вводят в комбинации с ингибитором молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из одного или более из белка запрограммированной смерти клетки 1 (PD-1), лиганда запрограммированной смерти клетки 1 (PD-L1), PD-L2, цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA-4), белка 3, содержащего домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), ген активации лимфоцитов 3 (LAG-3), карциномоэмбриональной антигензависимой молекулы клеточной адгезии 1 (CEACAM-1), CEACAM-5, V-доменного иммуноглобулинового супрессора активации Т-клеток (VISTA), В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA), Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT), иммуноглобулино-подобного рецептора, ассоциированного с лейкоцитами (типа 1) (LAIR1), CD160, 2B4 или TIGFR.

В одном аспекте предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком CD47 человека, которые содержат экранирующий агент, при этом экранирующий агент содержит один или более суперспиральных пептидов, содержащих последовательность

SEQ ID NO: 95 (QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGS) и/или

SEQ ID NO: 94 (QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGS),

и при этом один или более суперспиральных пептидов снижают'affинность связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с белком CD47 человека по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента.

В одном варианте реализации данного изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую идентичность последовательности, по меньшей мере, 90% относительно любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую идентичность последовательности, по меньшей мере, 90% относительно любой из SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 и 15.

В одном варианте реализации данного изобретения экранирующий агент присоединяется к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту через пригодный для расщепления протеазой линкер.

В одном варианте реализации данного изобретения пригодный для расщепления протеазой линкер имеет аминокислотную последовательность, содержащую IPVSLRSG (SEQ ID NO: 73) или GPLGVR (SEQ ID NO: 57).

В одном варианте реализации данного изобретения пригодный для расщепления протеазой линкер содержит сайт расщепления матриксной металлопротеазой (ММП).

В одном варианте реализации данного изобретения сайт расщепления ММП выбран из сайта расщепления ММП2, сайта расщепления ММП7, сайта расщепления ММП9 и сайта расщепления ММП3.

В одном варианте реализации данного изобретения экранирующий агент удаляется из антитела против CD47 после расщепления сайта расщепления ММП с помощью ММП.

В одном варианте реализации данного изобретения антитело против CD47 имеет фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления ММП после расщепления сайта расщепления ММП с помощью ММП.

В одном варианте реализации данного изобретения фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления содержит последовательность LRSG, SG или VR на N-конце антитела.

В одном варианте реализации данного изобретения связывание уменьшается, по меньшей мере, в около 100 раз по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента.

В одном варианте реализации данного изобретения связывание уменьшается от в около 200 раз до в около 1500 раз по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента.

В одном варианте реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 42 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 43.

В одном варианте реализации данного изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариант Fc-области, которая придает усиленную эффекторную функцию, выбранную из активности АЗКЦ и/или КЗЦ.

В одном варианте реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является афукозилированным.

В одном аспекте предложено гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, при этом антитело представляет собой изотип IgG1.

В одном варианте реализации данного изобретения антитело содержит повышенную АЗКЦ, повышенный АЗКФ и/или повышенную активность КЗЦ.

В одном аспекте предложен способ лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, у субъекта, включающий этапы:

а) идентификация субъекта как имеющего повышенные уровни ММП в опухоли по сравнению с окружающей тканью, не являющейся раковой; и

б) введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего экранирующий агент, при этом экранирующий агент содержит суперспиральные пептиды, которые снижают аффинность связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с CD47 человека по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента, если субъект имеет повышенные уровни ММП в опухоли по сравнению с окружающей тканью, не являющейся раковой.

В одном варианте реализации данного изобретения ММП выбрана из группы, состоящей из: ММП2, ММП7, ММП9 и ММП13.

В одном варианте реализации данного изобретения этап а) включает:

i) получение от субъекта раковой ткани и ткани, не являющейся раковой;

ii) обнаружение ММП в выделенной раковой ткани и в ткани, не являющейся раковой; и

iii) сравнение количественной оценки окрашивания в раковой ткани по сравнению с тканью, не являющейся раковой.

В одном аспекте предложен способ лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, у субъекта, включающий этапы:

а) идентификация субъекта как имеющего повышенные уровни CD47 в опухоли по сравнению с окружающей тканью, не являющейся раковой; и

б) введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего экранирующий агент, при этом экранирующий агент содержит суперспиральные пептиды, которые снижают аффинность связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с CD47 человека по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента, если субъект имеет повышенные уровни CD47 в опухоли по сравнению с окружающей тканью, не являющейся раковой.

В одном варианте реализации данного изобретения этап а) включает:

i) получение от субъекта раковой ткани и окружающей ткани, не являющейся раковой;

ii) обнаружение CD47 в выделенной раковой ткани и окружающей ткани, не являющейся раковой; и

iii) сравнение количественной оценки окрашивания CD47 в раковой ткани по сравнению с окрашиванием CD47 в ткани, не являющейся раковой.

В одном аспекте предложен способ лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, у субъекта, включающий этапы:

а) идентификация субъекта с повышенными уровнями инфильтрации макрофагов в раковой ткани по сравнению с тканью, не являющейся раковой; и

б) введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего экранирующий агент, при этом экранирующий агент содержит один или более суперспиральный пептид, который снижает аффинность связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с CD47 человека по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента, если субъект имеет повышенные уровни инфильтрации макрофагов в опухоли по сравнению с тканью, не являющейся раковой.

В одном варианте реализации данного изобретения этап а) включает:

i) получение от субъекта раковой ткани и окружающей ткани, не являющейся раковой;

ii) обнаружение макрофагов в выделенной раковой ткани и в ткани, не являющейся раковой; и

iii) сравнение количественной оценки окрашивания в раковой ткани по сравнению с тканью, не являющейся раковой.

В одном варианте реализации данного изобретения окрашивание макрофагов проводят с использованием антитела против CD163.

В одном аспекте гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую идентичность последовательности, по меньшей мере, 90% относительно любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую идентичность последовательности, по меньшей мере, 90% относительно любой из SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 и 15, при этом антитело дополнительно содержит последовательность LRSR, SG или VR на N-конце HCVR и/или LCVR.

В одном аспекте предложен способ лечения онкологического заболевания путем введения комбинации экранированного антитела против CD47 по данному изобретению с агонистическим антителом против CD40.

В одном варианте реализации данного изобретения агонистическое антитело против CD40 имеет низкие уровни фукозилирования, например, антитело SEA-CD40.

В одном аспекте предложен способ лечения онкологического заболевания путем введения комбинации экранированного антитела против CD47 по п.37 формулы изобретения с конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC), при этом антитело ADC специфически связывается с белком, который экспрессируется на внеклеточной поверхности раковой клетки и антитело конъюгировано с соединением линкер-лекарственное средство, содержащим цитотоксический агент.

В одном варианте реализации данного изобретения цитотоксический агент представляет собой ауристатин.

В одном варианте реализации данного изобретения антитело ADC конъюгировано с соединением линкер-лекарственное средство, выбранным из vcMMAE и mcMMAF.

Краткое описание раскрытия, описанного выше, не является ограничивающим, и другие признаки и преимущества описанных антител, а также способов их изготовления и использования будут очевидны из следующих графических материалов, подробного описания сущности изобретения, примеров и формулы изобретения.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A-J изображено выравнивание последовательностей антител. На фиг. 1A изображено выравнивание вариантов последовательности тяжелой цепи hB6H12 с донорной последовательностью VH человека, HV3-23/HJ4. На фиг. 1B изображено выравнивание вариантов последовательности тяжелой цепи hB6H12 с донорной последовательностью VH человека, HV3-48/HJ4. На фиг. 1C изображено выравнивание вариантов последовательности тяжелой цепи hB6H12 с донорной последовательностью VH человека, HV3-66/HJ4. На фиг. 1D изображено выравнивание вариантов последовательности тяжелой цепи hB6H12 с донорной последовательностью VH человека, HV3-74/HJ4. На фиг. 1E изображено выравнивание вариантов последовательности тяжелой цепи hB6H12. На фиг. 1F изображено выравнивание последовательности тяжелой цепи hB6H12.3 (hvH1) по сравнению с mB6H12 и Ab47. На фиг. 1G изображено выравнивание вариантов последовательности легкой цепи hB6H12 с донорной последовательностью VH человека, KV1-3/KJ2. На фиг. 1H изображено выравнивание вариантов последовательности легкой цепи hB6H12 с донорной последовательностью VH человека, KV1-27/KJ2. На фиг. 1I изображено выравнивание вариантов последовательности легкой цепи hB6H12. На фиг. 1J изображено выравнивание последовательности легкой цепи hB6H12.3 (hvK3) по сравнению с mB6H12 и Ab47.

На фиг. 2A-C изображены аффинность и кинетика связывания антител. На фиг. 2A изображен CD47-насыщающий клеточный флуоресцентный сортинг (FACS) с типовыми антителами против CD47. На фиг. 2B изображен CD47-насыщающий ИФА с типовыми антителами против CD47. На фиг. 2C изображена кинетика связывания CD47 с типовыми антителами против CD47.

На фиг. 3A, B изображен опосредованный антителами фагоцитоз. На фиг. 3A и фиг. 3B изображен опосредованный антителами фагоцитоз красных клеток крови CD47+ человека (эритроцитов) с типичными антителами против CD47.

На фиг. 4A, B изображена опосредованная антителами гемагглютинация. На фиг. 4A представлен снимок формирования дисперсных неосажденных эритроцитов. На фиг. 4B представлен процент гемагглютинации эритроцитов антителами против CD47 Ab47 и hB6H12.3.

На фиг. 5A, B изображена опосредованная антителами активация рецепторов Fcγ. Активность люциферазы, содержащей репортер NFAT, измеряли по клеткам Jurkat, трансфицированным FcγRI (фиг. 5A) или высокоаффинным FcγRIIIa-H (фиг. 5B), и подвергавшимся воздействию клеткам WIL2S, покрытых с использованием увеличенных концентраций, либо мышиными B6H12, Ab47, либо hB6H12.3.

На фиг. 6A, B изображены опосредованная NK-клетками АЗКЦ и активация FcγRIIIa. Клетки WIL2S, меченные хромом, покрытые mB6H12, Ab47 или hB6H12.3, подвергали воздействию клеток Jurkat, стабильно экспрессирующих V/V-вариант с высокой аффинностью FcγRIIIa, и активацию рецептора оценивали как NFAT-зависимую люциферазную активность. АЗКЦ (фиг. 6A) и активацию FcγRIIIa (фиг. 6B) сравнивали между mB6H12, Ab47 и hB6H12.3.

На фиг. 7A-D изображена супрессорная функция антител против CD47. Дифференцированные моноциты с фенотипом макрофагов, ассоциированных с опухолью (MAO (TAM)), показали повышенные уровни маркеров активации макрофагов CD86 (фиг. 7A) и MHCII (фиг. 7B) при воздействии антител против CD47. TCR-опосредованную активацию Т-клеток оценивали путем выявления повышенной регуляции MHCII (фиг. 7C) и секреции ИНФγ (IFNγ) (фиг. 7D) в Т-клетках.

На фиг. 8A-D изображено сравнение между hB6H12.3 и антителом против CD47 5F9. Активация FcγRI была обнаружена в клетках Jurkat, несущих люциферазный NFAT-репортер (фиг. 8A). Активацию FcγRII оценивали в клетках Jurkat, несущих люциферазный NFAT-репортер (фиг. 8B). Определяли NK-опосредованную активность АЗКЦ (фиг. 8C). Оценивали уровень секреции Т-клетками ИНФγ (фиг. 8D).

На фиг. 9A, B изображены данные масс-спектрометрии для повторно ММР2-активированного экранированного антитела. Представлена масса легкой цепи после деконволюции для Vel-IPV-hB6H12.3 до (фиг. 9A) и после (фиг. 9B) расщепления рекомбинантной ММР2 человека. Ожидаемое значение m/z для интактной легкой цепи составляет 28681 (регистрируется: 28680,8). Ожидаемое значение m/z для ММР2-расщепленного антитела (LRSG-hB6H12.3) составляет 23969 (регистрируется: 23968,4).

На фиг. 10 изображено насыщение антителами против CD47 клеток рака мочевого пузыря человека SW780. Антитела hB6H12, экранированные Vel-IPV, тестировали вместе с предварительно ММР2-активированными компарторами. Расщепленные Vel-IPV-антитела содержали остаток последовательности LRSG на N-конце антитела.

На фиг. 11 изображено насыщение антителами против CD47 клеток рака мочевого пузыря человека SW780. Антитела hB6H12, экранированные Vel-IPV, тестировали вместе с предварительно ММР2-активированными компарторами. Расщепленные Vel-IPV антитела и IPV-антитела с фрагментом из аминокислотных остатков сайта расщепления содержали остаток последовательности LRSG на N-конце антитела. Расщепленное антитело было получено путем расщепления с помощью ММР2, тогда как IPV-антитела с фрагментом из аминокислотных остатков сайта расщепления было получено рекомбинантно.

На фиг. 12 изображено насыщение антителами против CD47 эритроцитов человека. Антитела hB6H12, экранированные Vel-IPV, были протестированы вместе с повторно активированными компарторами (IPV-hB6H12.3 с фрагментом из аминокислотных остатков сайта расщепления или ММР2-расщепленное Vel-IPV-hB6H12.3). Расщепленные Vel-IPV антитела и IPV-антитела с фрагментом из аминокислотных остатков сайта расщепления содержали остаток последовательности LRSG на N-конце антитела. Расщепленное антитело было получено путем расщепления с помощью ММР2, тогда как IPV-антитела с фрагментом из аминокислотных остатков сайта расщепления было получено рекомбинантно.

На фиг. 13 изображено насыщение антителами против CD47 рч CD47 с использованием детектирования с помощью ИФА. Vel-IPV-hB6H12.3 проявляло значительно ослабленное связывание. Связывание может быть восстановлено после расщепления рчММР2.

На фиг. 14 изображено насыщение антителами против CD47 рч CD47 с помощью обнаружения ИФА. Как hB6H12.3, так и hB6H12.3 G91A показывают более высокий B_{max} , чем Ab47.

На фиг. 15 изображено насыщение антителами против CD47 клеток рака мочевого пузыря человека SW780. Связывание Ab47 и hB6H12.3 сравнивали с вариантами, несущими мутацию G91A в CDR-L3.

На фиг. 16 изображено насыщение антителами против CD47 эритроцитов человека. Связывание Ab47 и hB6H12.3 сравнивали с вариантами, несущими мутацию G91A в CDR-L3.

На фиг. 17А, В изображена активность антител против CD47 в ксенотрансплантатной модели опухоли L428 у мышей NSG. Антитела вводили внутривенно (в/в) каждые четыре дня по четыре дозы (q4dx4) по 1 или 10 мг/кг (Фиг. 17А). Анализ опухолевой ткани с использованием маркера макрофагов анти-F4/80 показал присутствие мышинных макрофагов в ксенотрансплантатной модели опухоли L428 (Фиг. 17В).

На фиг. 18А-Д изображена активность антител против CD47 в ксенотрансплантатной модели опухоли L428 у мышей NSG. Антитела вводили в/в q4dx4 (4 дозы каждые 4 дня) с использованием дозировки 1 или 10 мг/кг (фиг. 18А). Анализ опухолевой ткани с использованием маркера макрофагов анти-F4/80 выявил присутствие мышинных макрофагов в ксенотрансплантатной модели опухоли Detroit 562 (фиг. 18В). Также анализировали активность антител против CD47-антител в ксенотрансплантатной модели опухоли SUDHL8 у мышей NSG (фиг. 18С). Антитела вводили в/в q4dx4 с использованием дозировки 1 или 10 мг/кг. Анализ опухолевой ткани с использованием маркера макрофагов анти-F4/80 показал присутствие мышинных макрофагов в ксенотрансплантатной модели опухоли SUDHL8 (фиг. 18Д).

На фиг. 19А-Д изображена активность антител против CD47 в моделях опухолей, имеющих низкое содержание внутриопухолевых макрофагов. Представлены модель рака Фибросаркомы HT1080 (фиг. 19А и фиг. 19В) и модель Печеночноклеточного рака HepG2 (фиг. 19С и фиг. 19Д). Антитела вводили в/в q4dx4 с использованием дозировки 10 мг/кг. Анализ опухолевой ткани с использованием маркера макрофагов анти-F4/80 показал присутствие мышинных макрофагов в модели рака фибросаркомы HT1080 (фиг. 19В) и модели печеночноклеточного рака HepG2 (фиг. 19Д).

На фиг. 20 изображена активность антител против CD47 в моделях опухолей, имеющих низкое содержание внутриопухолевых макрофагов, которая может быть усилена в сочетании с конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC) монометилауристатином Е (ММАЕ) (который, как известно, стимулирует инфильтрацию макрофагов). Антитело против CD47 вводили в/в q4dx4 с использованием дозировки 5 мг/кг, в то время как с ADC ММАЕ вводили один раз с использованием дозировки 1 мг/кг.

На фиг. 21А, В изображено, что мышинное реактивное антитело против CD47 mIAP301 может быть экранировано с использованием тех же последовательностей VEL и IPV, что и антитело hB6H12.3 человека (фиг. 21А). Экранирование этими конструкциями блокировало связывание антител с мышинными CD47-положительными опухолями (фиг. 21В) и предотвращало функциональную активность, измеренную с помощью фагоцитоза эритроцитов. В моделях опухолей, имеющих низкое внутриопухолевое содержание макрофагов, антитело против CD47 вводили в/в q4dx4 с использованием дозировки 5 мг/кг, в то время как с ADC ММАЕ вводили один раз с использованием дозировки 1 мг/кг.

На фиг. 22А, В изображены ^3H -меченые исходные и экранированные антитела, которые вводили мышам BALB/c. Антитела оценивались с использованием сцинтилляционных измерений. Представлено количество тромбоцитов у мышей (фиг. 22А) и фармакокинетика с использованием мышинных антител (фиг. 22В). На фиг. 22В контрольный момент времени для анализа антитела mIAP301 был через 24 ч после введения последней дозы антитела.

Фиг. 23А-D Анти-мышинное антитело против CD47 mIAP301 проявляло противоопухолевую активность в модели лимфомы A20, но вызывало сопутствующее уменьшение количества эритроцитов (фиг. 23А). Экранированное антитело Vel-IPV-mIAP301 проявляло сходную активность, но нейтрализовало влияние на изменение количества эритроцитов (фиг. 23В). Vel-IPV-mIAP301 предотвращало связывание антигенов эритроцита, но поддерживало связывание опухоли (фиг. 23 С и фиг. 23D).

На фиг. 24 изображено, что анти-мышинное антитело против CD47 mIAP301 стимулирует противоопухолевую активность в модели рака толстой кишки MC38, которая, как известно, чувствительна к иммуноонкологическим (I/O) агентам. Активность экранированного антитела против mIAP301 в этой модели продемонстрировала превосходную эффективность согласно животным, проявляющим полный ответ. Повторное заражение этого животного приводило к полному отторжению опухоли, демонстрируя индукцию долгоживущего ответа Т-клеток памяти.

Фиг. 25А, В. Исходное антитело и экранированное анти-мышинное антитело против CD47 mIAP301 вызывали повышенную противоопухолевую активность в сочетании с суррогатным антителом против PD-1, в результате чего 4/6 животных демонстрировали полные ответы (ПО, CR) (фиг. 25А). Исходное антитело и экранированное анти-мышинное антитело против CD47 mIAP301 вызывали повышенную противоопухолевую активность в сочетании с активирующим макрофаги CD40-нацеленного SEA-усиленного суррогатным антителом 1C10 (фиг. 25В).

На фиг. 26 изображена стабильность различных суперспиралей, гуманизированных вариантов hB6H12 у мышей BALB/c через три дня после введения дозы. Стабильность оценивали с помощью денситометрии результатов вестерн-блоттинга после разделения экранированных и неэкранированных тяжелых цепей с использованием ДНС-ПААГ в восстанавливающих условиях.

Фиг. 27А, В. Были определены уровни эритроцитов после однократной в/в болюсной дозы 0,1, 1, 10 или 30 мг/кг гуманизированного IgG1 hB6H12 "Ab47" (фиг. 27А). Дозы, превышающие 1 мг/кг, были не переносимыми, и у животных при всех уровнях дозы наблюдались клинические признаки, связанные с гемолизом и воздействием испытываемым препаратом. Представлены уровни эритроцитов после однократной в/в болюсной дозы 0,1, 1 или 10 мг/кг альтернативно экранированного гуманизированного IgG1 hB6H12 "Ab47" Vel-IPV, которое демонстрирует приблизительно 10-кратную повышенную переносимость при максимальном испытанном уровне дозы (фиг. 27В). Все дозы Vel-IPV-Ab47 были переносимыми, и никаких клинических признаков не было обнаружено ни при каком уровне дозы.

На фиг. 28 представлены уровни циркулирующих антител после однократной в/в болюсной дозы 1 мг/кг Ab47 и Vel-IPV-Ab47. В то время как доза Ab47 в 1 мг/кг была ниже предела обнаружения при использовании неспецифического ИФА анализа TAb (всех антител) в 3-й день исследования, 1 мг/кг Vel-IPV-Ab47 можно было обнаружить в течение всего курса исследования, заканчивающегося на 15-й день исследования.

На фиг. 29 представлены уровни эритроцитов после однократной в/в болюсной дозы 1 мг/кг Ab47 и Vel-IPV-Ab47. Как Ab47, так и hB6H12.3 продемонстрировали уменьшение количества эритроцитов.

На фиг. 30 представлены уровни тромбоцитов после однократной в/в болюсной дозы 1 мг/кг Ab47, hB6H12.3 или контроля. Ab47 продемонстрировало снижение уровня тромбоцитов на 60% относительно уровня тромбоцитов до введения дозы, тогда как hB6H12.3 не вызывало снижения уровня тромбоцитов выше 20%, что также наблюдалось в контрольной группе. И Ab47, и hB6H12.3 привели к повышению уровня тромбоцитов начиная с Дня 7 и до конца исследования, т.е. Дня 15.

На фиг. 31 представлены уровни эритроцитов после однократной в/в болюсной дозы 10 или 20 мг/кг Vel-IPV-hB6H12.3, которая продемонстрировала приблизительно в 20 раз повышенную переносимость по сравнению с неэкранированным hB6H12.3 с использованием дозировки 1 мг/кг. В дополнение к повышенной переносимости по гематологическим параметрам, в группах, получавших экранированное антитело, клинических признаков не наблюдалось, в то время как они наблюдались при использовании дозировки 1 мг/кг для неэкранированного hB6H12.3.

На фиг. 32 представлены уровни эритроцитов после однократной в/в болюсной дозы 20 мг/кг Vel-IPV-hB6H12.3, 20 мг/кг SEA-Vel-IPV-hB6H12.3, 1 мг/кг hB6H12.3, и контроля для сравнения. Антитела hB6H12.3, как экранированные SEA, так и экранированные не SEA, переносились одинаково, несмотря на усиление эффекторной функциональности за счет инженерии антител.

На фиг. 33 изображено обнаружение макрофагов с помощью иммуногистохимии с использованием антитела против CD 163 в опухоли молочной железы и образцах нормальной ткани молочной железы.

На фиг. 34 изображены последовательности суперспиралей M11, M15 и Vel. Также изображены ММР2-расщепляемые последовательности.

На фиг. 35А, В изображены уровни ММР опухоли в некоторых опухолях мышей и человека относительно тех, которые присутствуют в системах клеточных культур.

На фиг. 36А, В изображен отбор MMAE, который содержит ауристатин (LIV1A и CD30) в сочетании с антителом против CD47 в ксенотрансплантатной модели рака молочной железы MCSF7 для ADC Liv1A и модели лимфомы L428 для ADC CD30.

На фиг. 37А-F изображены концентрации mIAP301 и экранированных Vel-IPV-mIAP301 и Vel-M2-mIAP301 в плазме (фиг. 37А и фиг. 37В), селезенке (фиг. 37С и фиг. 37D) и опухоли (фиг. 37Е и фиг. 37F).

На фиг. 38А, В представлен процент расщепленного антитела в плазме, печени и опухоли (фиг. 38А). Опухоли HT1080, собранные от мышей, которых подвергали воздействию Ab47 или Vel-IPV-Ab47 в течение 4 или 7 дней, подвергали проточной цитометрии для определения степени антитела, которое было способно связываться и насыщать клетки опухоли, которые экспрессируют CD47 (фиг. 38В).

Фиг. 39А-С. Переносимость экранированного Ab47 (фиг. 39А) или экранированного hB6H12.3 (фиг. 39В) определяли путем измерения количества циркулирующего в плазме цитокина - моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (МХБ-1, MCP-1). Фармакокинетический анализ с использованием неспецифического ИФА всех антител (TAb) проводили на экранированном и неэкранированном hB6H12.3 (фиг. 39С).

На фиг. 40А, В изображена относительная противоопухолевая активность, определенная путем измерения среднего объема опухоли в ксенотрансплантатных моделях Vel-IPV-hB6H12.3 и SEA-Vel-IPV-hB6H12.3, а также фукозилированного и нефукозилированного SEA hB6H12.3 в моделях с высоким (Detroit562) (фиг. 40А) и низким (HT1080) (фиг. 40В) содержанием макрофагов.

На фиг. 41А, В изображено измерение уровней циркулирующих цитокинов МХБ-1 при использовании антител Vel-IPV-hB6H12.3 и SEA-Vel-IPV-hB6H12.3 (фиг. 41А). Фармакокинетический анализ с использованием неспецифического ИФА всех антител (TAb) проводили между антителом Vel-IPV-hB6H12.3 с SEA и антителом Vel-IPV-hB6H12.3 без SEA (фиг. 41В).

На фиг. 42 изображено измерение фагоцитоза CD47-положительных эритроцитов человека после инкубации с hB6H12.3 ("антитело против CD47"), Vel-IPV-hB6H12.3 ("экранированное антитело против CD47"), расщепленное с помощью ММП Vel-IPV-hB6H12.3 ("ММП-активированное экранированное антитело против CD47") или при отсутствии антитела ("Без воздействия").

На фиг. 43 изображены эритроциты человека в круглодонном планшете после инкубации с Vel-IPV-Ab47 ("Экранированным Ab47"), расщепленным с помощью ММП Vel-IPV-Ab47 ("расщепленным ММП экранированным Ab47") или без использования антител ("Без воздействия").

На фиг. 44 изображено измерение Аннексин V-положительных клеток после инкубации с hB6H12.3, 5F9 или контролем - изотипом IgG1.

На фиг. 45А-С изображено измерение связывания Vel-IPV-hB6H12.3-FITC и hB6H12.3-FITC с образцом цельной крови, представляющим собой 16 из 17 образцов пациентов (фиг. 45А) или один образец с аномальным значением (фиг. 45В); и значения ЕС50, полученные с использованием ИФА после инкубации плазмы с рекомбинантными CD47 и hB6H12.3 ("Донор 1-hB6H12.3, с нанесением") или Vel-IPV-hB6H12.3 ("Пациент 1-10 с Саркомой") (фиг. 45С).

На фиг. 46А, В изображено репрезентативное продуцирование цитокинов, индуцированное инкубацией образцов цельной крови больных раком с hB6H12.3 или Vel-IPV-hB6H12.3 в течение 20 ч при 37°C. На фиг. 46А изображено продуцирование IP-10, а на фиг. 46В изображено продуцирование IL-1RA.

На фиг. 47 изображено окрашивание аннексином V опухолевых Ht1080 клеток из ксенотрансплантатной модели опухоли HT1080 у мышей, которым вводили hB6H12.3, Vel-IPV-hB6H12.3 или контрольный изотип hIgG1 ("изотип h00").

Подробное описание сущности изобретения

Антитела против CD47 IgG3, известные в данной области на момент подачи заявки, проявляют токсичность, такую как снижение количества эритроцитов и тромбоцитов в периферической крови, что уменьшает их полезность в качестве эффективных терапевтических средств против заболеваний, связанных с CD47, таких как, например, онкологических заболеваний, характеризующихся экспрессией CD47. Заявители неожиданно обнаружили новые антитела против CD47 подкласса IgG1 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые можно активировать путем дезэкранирования в контексте микроокружения опухоли, чтобы эффективно направлять антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению специфически на солидные опухоли, экспрессирующие CD47. Описанные в данном документе гуманизированные антитела против CD47 и их антигенсвязывающие фрагменты (либо экранированные, либо неэкранированные) полезны для лечения заболеваний, связанных с CD47, например, таких как онкологических заболеваний, характеризующихся экспрессией CD47.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат пригодный для удаления экранирующий фрагмент (например, барьер со суперспиралью), который блокирует связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с его антигенной мишенью. В некоторых вариантах реализации данного изобретения пригодный для удаления экранирующий фрагмент прикрепляется к N-концу одной или более тяжелых и/или легких цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через линкерную последовательность, расщепляемую матриксной металлопротеиназой (ММП).

В микроокружении опухоли измененный протеолиз приводит к нерегулируемому росту опухоли, ремоделированию ткани, воспалению, тканевой инвазии и метастазированию (Kessenbrock (2011) Cell 141:52). ММП представляют собой наиболее выраженное семейство протеиназ, связанных с онкогенезом, и ММП опосредуют многие изменения в микроокружении опухоли во время прогрессирования опухоли. Дополнительно. При воздействии на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению ММП, линкерная последовательность ММП расщепляется, что позволяет удалить экрани-

рующий фрагмент суперспирали и дать возможность антителу или его антигенсвязывающему фрагменту связывать свой антиген-мишень специфичным для микроокружения опухоли образом.

Новые антитела против CD47 IgG1 и их антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению (как экранированные, так и неэкранированные) преимущественно демонстрируют увеличение фармакокинетики и снижение целевых эффектов по сравнению с антителами против CD47 IgG3, известными в данной области техники на момент подачи заявки. Новые гуманизированные антитела против CD47, описанные в данном документе, преимущественно демонстрируют одно или более из: 1) усиление связывания антигена по сравнению с эталонным антителом (например, исходным мышинным антителом); 2) усиление антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) по сравнению с эталонным антителом (например, исходным мышинным антителом); 3) усиление фагоцитоза (например, усиление антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ)) по сравнению с эталонным антителом (например, исходным мышинным антителом); 4) снижение гемагглютинации эритроцитов (ГА) по сравнению с эталонным антителом (например, исходным мышинным антителом); 5) связывание с тем же трехмерным (т.е. нелинейным) эпитопом CD47.

Чтобы изобретение было легче понять, некоторые технические и научные термины конкретно определены ниже. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится данное изобретение.

I. Определения

Используемые в контексте данного документа, включая прилагаемую формулу изобретения, существительные в единственном числе включают соответствующие существительные во множественном числе, если в контексте явно не указано иначе.

"Конъюгат антитело-лекарственное средство" относится к антителу, конъюгированному с цитотоксическим агентом или цитостатическим агентом. Обычно конъюгаты антитело-лекарственное средство связываются с целевым антигеном (например, CD47) на поверхности клетки с последующей интернализацией конъюгата антитело-лекарственное средство в клетку и последующим высвобождением лекарственного средства в клетку.

"Полипептид" или "полипептидная цепь" представляет собой полимер аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями, независимо от того, получен ли он природным или синтетическим путем. Полипептиды с около менее чем 10 аминокислотными остатками обычно называют "пептидами".

"Белок" представляет собой макромолекулу, содержащую одну или более полипептидных цепей. Белок также может содержать непептидные компоненты, такие как углеводные группы. Клетка, в которой продуцируется белок, может добавлять углеводы и другие непептидные заместители, и они будут варьироваться в зависимости от типа клетки. Белки определены в данном документе с точки зрения их структур аминокислотных остовов. Заместители, такие как углеводные группы, обычно не указаны, но, тем не менее, могут присутствовать.

Термины "амино-конец" и "карбокси-конец" обозначают положения внутри полипептидов. Там, где позволяет контекст, эти термины используются со ссылкой на конкретную последовательность или часть полипептида для обозначения близости позиции или относительной позиции. Например, определенная последовательность, расположенная на карбокси-конце контрольной последовательности в полипептиде, расположена проксимальнее карбокси-конца контрольной последовательности, но необязательно находится на карбокси-конце полного полипептида.

В целях классификации аминокислотных замен как консервативных или неконсервативных, следующие аминокислотные замены считаются консервативными заменами: серин, замещенный треонином, аланином или аспарагином; треонин, замещенный пролином или серином; аспарагин, замещенный аспарагиновой кислотой, гистидином или серином; аспарагиновая кислота, замещенная глутаминовой кислотой или аспарагином; глутаминовая кислота, замещенная глутамином, лизином или аспарагиновой кислотой; глутамин, замещенный аргинином, лизином или глутаминовой кислотой; гистидин, замещенный тирозином или аспарагином; аргинин, замещенный лизином или глутамином; метионин, замещенный изолейцином, лейцином или валином; изолейцин, замещенный лейцином, валином или метионином; лейцин, замещенный валином, изолейцином или метионином; фенилаланин, замещенный тирозином или триптофаном; тирозин, замещенный триптофаном, гистидином или фенилаланином; пролин, замещенный треонином; аланин, замещенный серином; лизин, замещенный глутаминовой кислотой, глутамином или аргинином; валин, замещенный метионином, изолейцином или лейцином; и триптофан, замещенный фенилаланином или тирозином. Консервативные замены также могут означать замены между аминокислотами в одном и том же классе. Классы являются следующими: Группа I (гидрофобные боковые цепи): met, ala, val, leu, ile; Группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): cys, ser, thr; Группа III (кислые боковые цепи): asp, glu; Группа IV (основные боковые цепи): asn, gin, his, lys, arg; Группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепи): gly, pro; и группа VI (ароматические боковые цепи): trp, tyr, phe.

Две аминокислотные последовательности имеют "100% идентичность аминокислотной последовательности", если аминокислотные остатки двух аминокислотных последовательностей одинаковы при выравнивании для максимального соответствия. Сравнение последовательностей может быть выполнено

с использованием стандартных программ, таких как те, которые включены в пакет биоинформатических вычислений LASERGENE, который выпускается DNASTAR (Madison, Wisconsin). Другие способы сравнения двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей с помощью определения оптимального выравнивания хорошо известны специалистам в данной области техники. (См., например, Peruski and Peruski, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research* (ASM Press, Inc. 1997); Wu et al. (eds.), *"Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins,"* in *Methods in Gene Biotechnology* 123-151 (CRC Press, Inc. 1997); Bishop (ed.), *Guide to Human Genome Computing* (2nd ed., Academic Press, Inc. 1998).) Считается, что две аминокислотные последовательности имеют "значительную идентичность последовательности", если две последовательности имеют, по меньшей мере, около 80%, по меньшей мере, около 85%, по меньшей мере, около 90% или, по меньшей мере, около 95% идентичности последовательности относительно друг друга.

Процент идентичности последовательностей определяют с помощью последовательностей антител, максимально выровненных в соответствии с конвенцией нумерации по Кабату. После выравнивания, если область исследуемого антитела (например, весь вариабельный домен тяжелой или легкой цепи) сравнивается с одной и той же областью эталонного антитела, процентная идентичность последовательности между областями исследуемого и эталонного антитела представляет собой число позиций, занимаемых одной и той же аминокислотой в области как исследуемого, так и эталонного антитела, деленное на общее количество выровненных позиций двух областей без учета пробелов, умноженное на 100 для преобразования в процент.

Композиции или способы, "содержащие" один или более перечисленных элементов, могут включать в себя другие элементы, специально не указанные. Например, композиция, которая содержит антитело, может содержать антитело отдельно или в комбинации с другими компонентами.

Обозначение диапазона значений включает все целые числа в пределах диапазона или определяющие диапазон.

В антителах или других белках, описанных в данном документе, ссылка на аминокислотные остатки, соответствующие остаткам, указанным в SEQ ID NO, включает посттрансляционные модификации таких остатков.

Термин "антитело" обозначает белки иммуноглобулина, продуцируемые организмом в ответ на присутствие антигена и связывающиеся с антигеном, а также антигенсвязывающие фрагменты и их варианты, полученные способами генной инженерии. Следовательно, термин "антитело" включает, например, интактные моноклональные антитела (например, антитела, полученные с использованием гибридной технологии) и фрагменты антигенсвязывающих антител, такие как F(ab')₂, фрагмент Fv, диатело, одноцепочечное антитело, фрагмент scFv или scFv-Fc. Также включены генетически сконструированные интактные антитела и фрагменты, такие как химерные антитела, гуманизированные антитела, одноцепочечные Fv-фрагменты, одноцепочечные антитела, диатела, миниантитела, антитела, распознающие линейные эпитопы, поливалентные или мультиспецифичные (например, биспецифичные) гибридные антитела и тому подобное. Таким образом, термин "антитело" широко используется для включения любого белка, который содержит антигенсвязывающий сайт антитела и способен специфически связываться с его антигеном.

Термин антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает "голое" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые не связаны (то есть не связаны ковалентно или нековалентно) с экранирующим соединением по данному изобретению. Термин "антитело" также включает "экранированное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые ковалентно или нековалентно связаны с одним или более экранирующими соединениями, такими как, например, суперспиральными пептидами, как описано далее в данном документе. Термин антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает "конъюгированное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или "конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC)", в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно или нековалентно связаны с фармацевтическим агентом, например, с цитостатическим или цитотоксическим лекарственным средством. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой голое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который необязательно конъюгирован с фармацевтическим агентом, например, с цитостатическим или цитотоксическим лекарственным средством. В других вариантах реализации данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой экранированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое необязательно конъюгировано с фармацевтическим агентом, например, с цитостатическим или цитотоксическим лекарственным средством.

Термин "генетически сконструированные антитела" относится к антителу, в котором аминокислотная последовательность отличается от последовательности нативного или исходного антитела. Возможных вариаций много, и они варьируются от замены только одной или более аминокислот до полного изменения конструкции, например, вариабельной или константной области. Изменения в константной области, как правило, делают для улучшения или изменения характеристик, таких как, например, реакции связывания компонента и других эффекторных функций. Как правило, изменения в вариабельной области вносятся для улучшения антигенсвязывающих характеристик, улучшения стабильности вари-

бельной области и/или снижения риска иммуногенности.

Термин "химерное антитело" относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителе, полученном из определенного вида (например, человека) или принадлежащему к определенному классу или подклассу антител, тогда как остаток цепи(ей) идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям в антителе, полученном из другого вида (например, мыши) или принадлежащему к другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность.

"Антигенсвязывающий сайт антитела" представляет собой ту часть антитела, которая достаточна для связывания его с антигеном. Минимальная такая область обычно представляет собой варибельный домен или его генетически сконструированный вариант. Сайты связывания с одним доменом могут быть получены из верблужьих антител (см. Muyldermans and Lauwereys, *Mol. Recog.* 12: 131-140, 1999; Nguyen et al., *EMBO J.* 19:921-930, 2000) или из доменов VH других видов для получения однодоменных антител ("dAb", см. Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989; US Patent No. 6,248,516 to Winter et al). Обычно антигенсвязывающий сайт антитела содержит как варибельный домен (VH) тяжелой цепи, так и варибельный домен (VL) легкой цепи, которые связываются с общим эпитопом. В контексте данного изобретения антитело может включать один или более компонентов в дополнение к антигенсвязывающему сайту, например, такой как второй антигенсвязывающий сайт антитела (который может связываться с тем же или другим эпитоп или с тем же или другим антигеном), пептидный линкер, константную область иммуноглобулина, шарнир иммуноглобулина, амфипатическую спираль (см. Pack and Pluckthun, *Biochem.* 31: 1579-1584, 1992), непептидный линкер, олигонуклеотид (см. Chaudri et al, *FEBS Letters* 450:23-26, 1999), цитостатическое или цитотоксическое лекарственное средство и тому подобное, и может представлять собой мономерный или мультимерный белок. Примеры молекул, содержащих антигенсвязывающий сайт антитела, известны в данной области техники и включают, например, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)c, диатела, миниантитела, наноантитела, слияния Fab-scFv, биспецифичные (scFv)₄-IgG и биспецифичные (scFv)₂-Fab. (См., например, Hu et al, *Cancer Res.* 56:3055-3061, 1996; Atwell et al., *Molecular Immunology* 33: 1301-1312, 1996; Carter and Merchant, *Curr. Op. Biotechnol.* 8:449-454, 1997; Zuo et al., *Protein Engineering* 13:361-367, 2000; и Lu et al., *J. Immunol. Methods* 267:213-226, 2002.)

Термин "иммуноглобулин" относится к белку, состоящему из одного или более полипептидов, в основном кодируемых геном(ами) иммуноглобулина. Одна форма иммуноглобулина представляет основную структурную единицу нативных (то есть природных или исходных) антител у позвоночных. Данная форма представляет собой тетрамер и состоит из двух идентичных пар цепей иммуноглобулина, каждая из которых имеет одну легкую цепь и одну тяжелую цепь. В каждой паре варибельные области легкой и тяжелой цепи (VL и VH) вместе, в первую очередь, ответственны за связывание с антигеном, а константные области прежде всего ответственны за эффекторные функции антитела. У высших позвоночных идентифицировано пять классов белков иммуноглобулина (IgG, IgA, IgM, IgD и IgE). IgG относится к основному классу и обычно находится в плазме в качестве второго наиболее распространенного белка. У людей IgG состоит из четырех подклассов, обозначаемых IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Каждая тяжелая цепь иммуноглобулина обладает константной областью, которая состоит из белковых доменов константной области (CH1, шарнира, CH2 и CH3; IgG3 также содержит домен CH4), которые по существу инвариантны для данного подкласса у вида.

Последовательности ДНК, кодирующие цепи иммуноглобулинов человека и не человека, известны в данной области техники. (См., например, Ellison et al, *DNA* 1:11-18, 1981; Ellison et al., *Nucleic Acids Res.* 10:4071-4079, 1982; Kenten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 79:6661-6665, 1982; Seno et al., *Nucl. Acids Res.* 11:719-726, 1983; Riechmann et al., *Nature* 332:323-327, 1988; Amster et al., *Nucl. Acids Res.* 8:2055-2065, 1980; Rusconi and Kohler, *Nature* 314:330-334, 1985; Boss et al., *Nucl. Acids Res.* 12:3791-3806, 1984; Bothwell et al., *Nature* 298:380-382, 1982; van der Loo et al., *Immunogenetics* 42:333-341, 1995; Karlin et al., *J. Mol. Evol.* 22: 195-208, 1985; Kindsvogel et al., *DNA* 1:335-343, 1982; Breiner et al., *Gene* 18: 165-174, 1982; Kondo et al., *Eur. J. Immunol.* 23:245-249, 1993; и GenBank Accession No. J00228.) Для ознакомления со структурой и функцией иммуноглобулинов см. Putnam, *The Plasma Proteins*, Vol V, Academic Press, Inc., 49-140, 1987; and Padlan, *Mol. Immunol.* 31: 169-217, 1994. Термин "иммуноглобулин" используется в данном документе для его общего значения, обозначающего интактное антитело, компоненты его цепей или фрагменты цепей, в зависимости от контекста.

Полноразмерные "легкие цепи" иммуноглобулина (около 25 кДа или 214 аминокислот) кодируются геном варибельной области на amino-конце (кодирующем около 110 аминокислот) и геном константной области каппа или лямбда на карбоксильном конце. Полноразмерные "тяжелые цепи" иммуноглобулина (около 50 кДа или 446 аминокислот) кодируются геном варибельной области (кодирующим около 116 аминокислот) и геном константной области гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (кодирующим около 330 аминокислот), при этом последний определяет изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD или IgE соответственно. Внутри легкой и тяжелой цепей варибельные и константные области соединены областью "J" из около 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает область "D" из еще около

10 аминокислот. (См. в целом *Fundamental Immunology* (Paul, ed., Raven Press, N.Y., 2nd ed. 1989), Ch. 7).

Вариабельная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (также называемая в данном документе "вариабельный домен легкой цепи" ("домен VL") или "вариабельный домен тяжелой цепи" ("домен VH") соответственно) состоит из "каркасной" области, прерываемой тремя "областями, определяющими комплементарность" или "CDR". Каркасные области служат для выравнивания CDR для специфического связывания с эпитопом антигена. Таким образом, термин "CDR" относится к аминокислотным остаткам антитела, которые в первую очередь ответственны за связывание антигена. От аминоконца до карбоксильного конца оба домена VL и VH содержат следующие каркасные (FR) и CDR области: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Определение позиций аминокислот в каждом домене вариабельной области соответствует определениям по Кабату, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 и 1991). Способ Кабата также предусматривает широко используемое соглашение о нумерации (нумерация по Кабату), в котором соответствующим остаткам между различными вариабельными областями тяжелой цепи или между различными вариабельными областями легкой цепи назначается один и тот же номер. CDR 1, 2 и 3 домена VL также упоминаются в данном документе соответственно как CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3. CDR 1, 2 и 3 домена VH также упоминаются в данном документе соответственно как CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3. Если так отмечено, определение CDR может быть в соответствии с IMGT® (Lefranc et al., *Developmental & Comparative Immunology* 27:55-77; 2003) вместо способа Кабата.

Нумерация константной области тяжелой цепи осуществляется с помощью индекса ЕС, как указано в работе Кабата (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 и 1991).

Если в контекст не указано иного, термин "моноклональное антитело" не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Термин "моноклональное антитело" может включать антитело, полученное из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон. В конкретных вариантах реализации данного изобретения антитела, описанные в данном документе, представляют собой моноклональные антитела.

Термин "гуманизированный домен VH" или "гуманизированный домен VL" относится к домену VH или VL иммуноглобулина, включающему некоторые или все CDR полностью или в значительной степени из иммуноглобулина-донора, не относящегося к человеку, (например, мыши или крысы), и каркасные последовательности вариабельного домена полностью или в значительной степени из последовательностей иммуноглобулина человека. Иммуноглобулин, не являющийся человеческим, обеспечивающий CDR, называется "донором", а человеческий иммуноглобулин, обеспечивающий каркасную последовательность, называется "акцептором". В некоторых случаях гуманизированные антитела сохраняют некоторые остатки, не относящиеся к человеку, в каркасных областях вариабельного домена человека для улучшения надлежащих характеристик связывания (например, могут потребоваться мутации в каркасных последовательностях для сохранения аффинности связывания, когда антитело гуманизировано).

"Гуманизированное антитело" представляет собой антитело, содержащее один или оба гуманизированный домен VH и гуманизированный домен VL. Константная область(и) иммуноглобулина не обязательно должны присутствовать, но если они присутствуют, они полностью или в значительной степени относятся к константным областям иммуноглобулина человека.

Гуманизированное антитело представляет собой генетически сконструированное антитело, в котором CDR из "донорного" антитела, не относящегося к человеку, привиты к последовательностям "акцепторных" антител человека (см., например, Queen, US 5,530,101 и 5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; и Foote, US 6,881,557). Последовательности акцепторных антител могут быть, например, последовательностью зрелого человеческого антитела, композицией таких последовательностей, консенсусной последовательностью последовательностей человеческого антитела или последовательностью области зародышевой линии. Человеческие акцепторные последовательности могут быть выбраны для высокой степени идентичности последовательностей в каркасах вариабельных областей с донорными последовательностями, чтобы соответствовать каноническим формам между акцепторной и донорной CDR среди других критериев. Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, имеющее CDR полностью или в значительной степени из донорных антител и каркасные последовательности вариабельных областей и константные области, если они присутствуют, полностью или в значительной степени от последовательностей антител человека. Аналогично, гуманизированная тяжелая цепь обычно имеет все три CDR полностью или в значительной степени из тяжелой цепи донорного антитела, а также каркасную последовательность вариабельной области тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, если они присутствуют, в значительной степени из каркасной последовательности вариабельной области тяжелой цепи человека и последовательности константной области тяжелой цепи антитела человека. Аналогично, гуманизированная легкая цепь обычно имеет все три CDR полностью или в значительной степени из легкой цепи донорного антитела и каркасную последовательность вариабельной области легкой цепи и константную область легкой цепи, если она присутствует, в значительной степени из каркасной последовательности вариабельной области легкой цепи человека и последовательности константной области легкой цепи человека. CDR в гуманизированном антителе в

значительной степени получены из соответствующей CDR в антителе, не относящегося к человеку, при этом, по меньшей мере, около 80%, около 81%, около 82%, около 83%, около 84%, около 85%, около 86%, около 87%, около 88%, около 89%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98% или около 99% соответствующих остатков (как определено нумерацией по Кабату), или при этом около 100% соответствующих остатков (как определено нумерацией по Кабату) являются идентичными между соответствующими CDR. Каркасные последовательности варибельной области цепи антитела или константной области цепи антитела в значительной степени получены из каркасной последовательности варибельной области человека или константной области антитела человека соответственно, при этом, по меньшей мере, около 80%, около 81%, около 82%, около 83%, около 84%, около 85%, около 86%, около 87%, около 88%, около 89%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98% или около 99% соответствующих остатков (как определено нумерацией по Кабату для варибельной области и нумерацией EU для константной области), или около 100% соответствующих остатков (как определено нумерацией по Кабату для варибельной области и нумерацией EU для константной области) являются идентичными.

Хотя гуманизированные антитела часто включают все шесть CDR (предпочтительно, как определено по Кабату или IMGT®) из мышиного антитела, они также могут быть получены с использованием менее чем всех шести CDR (например, по меньшей мере, 3, 4 или 5) CDR из мышиного антитела (например, Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002; Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., Journal of Immunology, 164: 1432-1441, 2000).

CDR в гуманизированном антителе получена "в значительной степени из" соответствующего CDR в антителе, не относящегося к человеку, при этом, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или 100% соответствующих остатков (как определено по Кабату (или IMGT)) являются идентичными между соответствующими CDR. В конкретных вариациях гуманизированного домена VH или VL, в котором CDR в значительной степени получены из иммуноглобулина, не относящегося к человеку, CDR гуманизированного VH или VL домена имеют не более шести (например, не более пяти, не более четырех, не более трех, не более двух или не более одной) аминокислотных замен (предпочтительно консервативных замен) во всех трех CDR относительно соответствующих CDR VH или VL, не относящихся к человеку. Каркасные последовательности варибельной области VH- или VL-домена антитела или, если они присутствуют, последовательности константной области иммуноглобулина, "в значительной степени получены из" каркасной последовательности VH или VL человека или константной области антитела человека соответственно, при этом, по меньшей мере, около 80%, около 81%, около 82%, около 83%, около 84%, около 85%, около 86%, около 87%, около 88%, около 89%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98% или около 99% соответствующих остатков (как определено нумерацией по Кабату для варибельной области и нумерацией EU для константной области), или около 100% соответствующих остатков (как определено нумерацией по Кабату для варибельной области и нумерацией EU для константной области) являются идентичными. Следовательно, все части гуманизированного антитела, за исключением CDR, как правило, полностью или в значительной степени получены из соответствующих частей последовательностей природного иммуноглобулина человека.

Антитела обычно предлагаются в изолированной форме. Это означает, что антитело обычно имеет чистоту, по меньшей мере, около 50% мас./мас. от мешающих белков и других загрязняющих веществ, возникающих в результате его производства или очистки, но не исключает возможности того, что антитело объединяют с избытком фармацевтически приемлемого носителя (носителей) или другим наполнителем, предназначенными для облегчения использования антитела. Иногда антитела имеют чистоту, по меньшей мере, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 95% или около 99% мас./мас. от мешающих белков и загрязняющих веществ, появляющихся в результате производства или очистки. Антитела, в том числе изолированные антитела, могут быть конъюгированы с цитотоксическими агентами и представлены в виде конъюгатов лекарственное средство-антитело и/или экранированы, например, с помощью соответствующих суперспиралей.

Специфическое связывание антитела с его антигеном-мишенью обычно относится к аффинности, по меньшей мере, около 10^6 , около 10^7 , около 10^8 , около 10^9 или около 10^{10} M^{-1} . Специфическое связывание заметно выше по величине и отличается от неспецифического связывания, происходящего, по меньшей мере, с одной неспецифической мишенью. Специфическое связывание может быть результатом образования связей между конкретными функциональными группами или определенным пространственным соответствием (например, тип замка и ключа), тогда как неспецифическое связывание обычно является результатом действия ван-дер-ваальсовых сил.

Термин "эпитоп" относится к сайту антигена, с которым связывается антитело. Эпитоп может быть образован из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, расположенных рядом, путем сворачивания в третичную структуру одного или более белков. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих агентов, например растворителей, тогда как эпитопы, образованные путем свертывания белка в третичную структуру, обычно теряются при воз-

действии денатурирующими агентами, например растворителями. Эпитоп обычно включает, по меньшей мере, около 3 и более, обычно, по меньшей мере, около 5, по меньшей мере, около 6, по меньшей мере, около 7 или около 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерный магнитный резонанс. См., например, Epitope Mapping Protocols, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Антитела, которые распознают одинаковые или перекрывающиеся эпитопы, можно идентифицировать простым иммуноанализом, показывающим способность одного антитела конкурировать со связыванием другого антитела с антигеном-мишенью. Эпитоп антитела также может быть определен с помощью рентгеновской кристаллографии антитела, связанного с его антигеном, для идентификации контактных остатков.

Альтернативно, два антитела имеют один и тот же эпитоп, если все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого (при условии, что такие мутации не вызывают глобального изменения структуры антигена). Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого антитела.

Конкуренцию между антителами можно определить с помощью анализа, в котором тестируемое антитело ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 50: 1495, 1990). Тестируемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если избыток тестируемого антитела ингибирует связывание эталонного антитела.

Антитела, идентифицированные конкурентным анализом (конкурирующие антитела), включают антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, которые связываются с соседним эпитопом, достаточно проксимальным по отношению к эпитопу, связанному с эталонным антителом, для возникновения стерического несоответствия. Антитела, идентифицированные конкурентным анализом, также включают антитела, которые косвенно конкурируют с эталонным антителом, вызывая конформационное изменение в белке-мишени, тем самым предотвращая связывание эталонного антитела с эпитопом, отличным от связанного с тестируемым антителом.

Эффекторная функция антитела относится к функции, обеспечиваемой Fc-областью Ig. Такими функциями могут быть, например, антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ) или комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ). Такая функция может быть осуществлена, например, путем связывания области Fc с рецептором Fc на иммунной клетке с фагоцитарной или литической активностью или путем связывания области Fc с компонентами системы комплемента. Как правило, эффект(ы), опосредуемый Fc-связывающими клетками или компонентами комплемента, приводит к ингибированию и/или уменьшению количества CD47-нацеленных клеток. Fc-области антител могут рекрутировать клетки, экспрессирующие Fc-рецептор (FcR), и сопоставлять их с клетками-мишенями, покрытыми антителами. Клетки, экспрессирующие поверхностный FcR для IgG, включая FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD64), могут действовать как эффекторные клетки для разрушения клеток, покрытых IgG. Такие эффекторные клетки включают моноциты, макрофаги, натуральные киллеры (NK-клетки), нейтрофилы и эозинофилы. Связывание FcγR IgG активирует АЗКЦ или АЗКФ. АЗКЦ опосредуется эффекторными клетками CD16+ через секрецию мембранных порообразующих белков и протеаз, в то время как фагоцитоз опосредуется эффекторными клетками CD32+ и CD64+ (см. *Fundamental Immunology*, 4th ed., Paul ed., Lippincott-Raven, N.Y., 1997, Chapters 3, 17 and 30; Uchida et al., *J. Exp. Med.* 199:1659-69, 2004; Akewanlop et al., *Cancer Res.* 61:4061-65, 2001; Watanabe et al., *Breast Cancer Res. Treat.* 53: 199-207, 1999).

В дополнение к АЗКЦ и АЗКФ Fc-области антител, связанных с клетками, также могут активировать классический путь комплемента, чтобы вызвать КЗЦ. Clq системы комплемента связывается с Fc-областями антител, когда они образуют комплекс с антигенами. Связывание Clq с клеточными антителами может инициировать каскад событий, включающих протеолитическую активацию C4 и C2 для генерации C3 конвертазы. Расщепление C3 в C3b конвертазой C3 позволяет активировать терминальные компоненты комплемента, включая C5b, C6, C7, C8 и C9. В совокупности эти белки формируют мембранно-атакующий комплекс, который образует поры на клетках, покрытых антителами. Эти поры нарушают целостность клеточной мембраны, убивая клетку-мишень (см. *Immunobiology*, 6th ed., Janeway et al., Garland Science, N. Y., 2005, Chapter 2).

Термин "антителозависимая клеточная цитотоксичность" или "АЗКЦ" относится к механизму индукции гибели клеток, который зависит от взаимодействия покрытых антителом клеток-мишеней с иммунными клетками, обладающими литической активностью (также называемыми эффекторными клетками). Такие эффекторные клетки включают естественные киллеры, моноциты/макрофаги и нейтрофилы. Эффекторные клетки прикрепляются к Fc-области Ig, связанной с клетками-мишенями через их антигенсвязывающие сайты. Смерть покрытой антителом клетки-мишени происходит в результате активности эффекторных клеток. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения

антитело против CD47 IgG1 по данному изобретению опосредует одинаковую или повышенную АЗКЦ относительно исходного антитела и/или относительно антитела против CD47 IgG3.

Термин "антитело-зависимый клеточный фагоцитоз" или "АЗКФ" относится к процессу, посредством которого покрытые антителами клетки поглощаются, полностью или частично, фагоцитарными иммунными клетками (например, макрофагами, нейтрофилами и/или дендритными клетками) которые связываются с Fc-областью Ig. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 IgG1 по данному изобретению опосредует одинаковую или повышенную АЗКФ относительно исходного антитела и/или относительно антитела против CD47 IgG3.

Термин "комплемент-зависимая цитотоксичность" или "КЗЦ" относится к механизму индукции гибели клеток, в котором Fc-область антитела, связанного с мишенью, активирует ряд ферментативных реакций, кульминацией которых является образование отверстий в мембране клетки-мишени.

Обычно комплексы антиген-антитело, такие как комплексы на клетках-мишенях, покрытых антителами, связывают и активируют компонент C1q комплемента, который, в свою очередь, активирует каскад комплемента, приводящий к гибели клеток-мишеней. Активация комплемента может также привести к отложению компонентов комплемента на поверхности клетки-мишени, которые способствуют АЗКЦ, связывая рецепторы комплемента (например, CR3) на лейкоцитах.

"Цитотоксический эффект" относится к уменьшению количества, элиминации и/или уничтожению клетки-мишени. "Цитотоксический агент" относится к соединению, которое оказывает цитотоксическое действие на клетку, тем самым опосредуя уменьшение количества, элиминацию и/или уничтожение клетки-мишени. В некоторых вариантах реализации данного изобретения цитотоксический агент конъюгирован с антителом или вводится в комбинации с антителом. Подходящие цитотоксические агенты описаны далее в данном документе.

"Цитостатический эффект" относится к ингибированию пролиферации клеток. "Цитостатический агент" относится к соединению, которое оказывает цитостатическое действие на клетку, тем самым опосредуя ингибирование роста и/или размножения клеток определенного типа и/или субпопуляции клеток. Подходящие цитостатические агенты описаны далее в данном документе.

Термины "единица экспрессии" и "кассета экспрессии" используются в данном документе взаимозаменяемо и обозначают сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий интересующий полипептид и способный обеспечивать экспрессию сегмента нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Единица экспрессии обычно содержит промотор транскрипции, открытую рамку считывания, кодирующую интересующий полипептид, и терминатор транскрипции, функционально связанный. В дополнение к промотору и терминатору транскрипции, блок экспрессии может дополнительно включать другие сегменты нуклеиновой кислоты, такие как, например, энхансер или сигнал полиаденилирования.

Термин "вектор экспрессии" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, линейной или циклической, содержащей одну или более единиц экспрессии. В дополнение к одной или более единицам экспрессии, вектор экспрессии может также включать дополнительные сегменты нуклеиновой кислоты, такие как, например, одну или более точек начала репликации или один или более селективируемых маркеров.

Векторы экспрессии обычно происходят из плазмидной или вирусной ДНК или могут содержать элементы обоих.

Термин "пациент" или "субъект" включает людей и других млекопитающих, таких как приматы, не относящиеся к человеку, кролики, крысы, мыши и тому подобное, и их трансгенные виды, которые подвергаются либо профилактическому, либо терапевтическому лечению. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения субъект представляет собой пациента-человека, страдающего или подверженного риску развития онкологического заболевания, например солидной опухоли, которая необязательно секретирует одну или более протеаз, способных расщеплять экранирующий домен (например, суперспиральный экранирующий домен) антитела против CD47, описанного в данном документе.

Термин "эффективное количество" в контексте лечения заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, путем введения антитела против CD47, как описано в данном документе, относится к количеству такого антитела, которое является достаточным для ингибирования возникновения или ослабления одного или более симптомов заболевания, связанного с CD47 (например, онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47). Эффективное количество антитела вводят по "эффективной схеме". Термин "эффективная схема" относится к комбинации количества вводимого антитела и частоты приема, адекватной для осуществления профилактического или терапевтического лечения заболевания (например, профилактического или терапевтического лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47).

Термин "фармацевтически приемлемый" предпочтительно относится к соединению, которое разрешено к медицинскому применению или утверждено регулирующим органом Федерального правительства или правительства Штата или включено в Фармакопею США или другую общепризнанную фармакопею. Термин "фармацевтически совместимый компонент" относится к фармацевтически приемлемому дилуэнту, адъюванту, эксципиенту или наполнителю, с которым приготовлено антитело против CD47.

Фраза "фармацевтически приемлемая соль" относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям. Типичные соли включают сульфатные, цитратные, ацетатные, оксалат-

ные, хлоридные, бромидные, йодидные, нитратные, бисульфатные, фосфатные, гидрофосфатные, изоникотинатные, лактатные, салицилатные, цитратные, тартратные, олеатные, таннатные, пантотенатные, битартратные, аскорбатные, сукцинатные, малеатные, гентизинатные, фумаратные, глюконатные, глюкоуронатные, сахаратные, формиатные, бензоатные, глутаматные, метансульфонатные, этансульфонатные, бензолсульфонатные, п-толуолсульфонатные и памоатные (т.е. 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоатные)) соли. Фармацевтически приемлемая соль может дополнительно содержать дополнительную молекулу, такую как, например, ацетат-ион, сукцинат-ион или другой противоион. Противоион может быть любым органическим или неорганическим фрагментом, который стабилизирует заряд исходного соединения. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь более одного заряженного атома в своей структуре. В тех случаях, когда несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, они могут иметь несколько противоионов. Следовательно, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или более заряженных атомов и/или один или более противоионов.

Если из контекста не очевидно иное, когда значение выражается как "около" X или "приблизительно" X, заявленное значение X будет восприниматься с точностью до $\pm 10\%$.

Сольваты в контексте изобретения представляют собой те формы соединений по данному изобретению, которые образуют комплекс в твердом или жидком состоянии при координации с молекулами растворителя. Гидраты представляют собой одну особую форму сольватов, в которой координация происходит с водой. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения сольваты в контексте данного изобретения представляют собой гидраты.

Термин "гемагглютинация" относится к процессу, при котором эритроциты слипаются вместе. Гемагглютинация является известным нежелательным побочным эффектом антител против CD47 в данной области техники. Гуманизированные антитела против CD47 по данному изобретению необязательно опосредуют сниженную гемагглютинацию по сравнению с мышинным исходным антителом против CD47 и/или по сравнению с одним или более антителом против CD47, известным в данной области техники.

II. Антитела против CD47 и антигенсвязывающие фрагменты

Данное изобретение предлагает изолированные, рекомбинантные и/или синтетические антитела против CD47 человека, приматов, грызунов, млекопитающих, химерные, гуманизированные и/или CDR-привитые антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, а также композиции и молекулы нуклеиновых кислот, содержащие, по меньшей мере, один полинуклеотид, кодирующий, по меньшей мере, часть одной молекулы антитела против CD47. Данное изобретение дополнительно включает, но не ограничивается ими, способы получения и использования таких нуклеиновых кислот и антител, включая диагностические и терапевтические композиции, способы и изделия. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения предложены гуманизированные антитела против CD47 IgG1. В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения предложены экранированные антитела против CD47 IgG1. В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения предложены гуманизированные антитела против CD47 IgG1, содержащие фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления.

В конкретных вариантах реализации данного изобретения предложены гуманизированные антитела против CD47, имеющие одну или более из следующих активностей: 1) усиление связывания антигена по сравнению с эталонным антителом (например, исходным мышинным антителом); 2) усиление антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКИ) по сравнению с эталонным антителом (например, исходным мышинным антителом); 3) усиление фагоцитоза (например, антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ)) по сравнению с эталонным антителом (например, исходным мышинным антителом); 4) снижение гемагглютинации эритроцитов (ГА) по сравнению с эталонным антителом (например, исходным мышинным антителом); 5) связывание с трехмерным (т.е. нелинейным) эпитопом CD47.

Иллюстративные антитела против CD47 и их антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению включают следующие пары тяжелая цепь/легкая цепь антитела CD47: hB6H12.1-hvH1/hvK1; hB6H12.2-hvH1/hvK2; hB6H12.3-hvH1/hvK3; hB6H12.4-hvH1/hvK4; hB6H12.5-hvH2/hvK1; hB6H12.6-hvH2/hvK2; hB6H12.7-hvH2/hvK3; hB6H12.8-hvH2/hvK4; hB6H12.9-hvH3/hvK1; hB6H12.10-hvH3/hvK2; hB6H12.11-hvH3/hvK3; hB6H12.12-hvH3/hvK4; hB6H12.13-hvH4/hvK1; hB6H12.14-hvH4/hvK2; hB6H12.15-hvH4/hvK3; hB6H12.16-hvH4/hvK4; hB6H12.17-hvH5/hvK1; hB6H12.18-hvH5/hvK2; hB6H12.19-hvH5/hvK3; hB6H12.20-hvH5/hvK4; hB6H12.21-hvH6/hvK1; hB6H12.22-hvH6/hvK2; hB6H12.23-hvH6/hvK3; hB6H12.24-hvH6/hvK4; hB6H12.3 (дезамидированный мутант)-hvH1/hvK3 G91A; Ab47-HV3-7/HJ4/KV3D-11/KJ1; и mB6H12-vH1/vL. Иллюстративные последовательности вариативной области тяжелой цепи антитела против CD47, вариативные области легкой цепи, CDR тяжелой цепи и CDR легкой цепи можно найти в таблицах 1-6. Аминокислотные последовательности для тяжелой цепи и легкой цепи типового гуманизированного антитела против CD47 можно найти в табл. 7.

Табл. 1. Вариабельные последовательности тяжелой цепи, полученные из мышиноного антитела B6H12. CDR по Кабату подчеркнуты, а CDR IMGT выделены жирным шрифтом.

Таблица 1

Вариант	Последовательность
mB6h12 vH	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFS GYGMS WVRQTPDKRLE WVA TITSGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQIDSLKSEDTAIY FCARSLAGNAMDYWGQGSVTSS (SEQ ID NO: 1)
Ab47vH (HV3-7/HJ4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTFS GYGMS WVRQAPGKGLE WVA TITSGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARSLAGNAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 2)
hvH1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTFS GYGMS WVRQAPGKRL WVA TITSGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIY FCARSLAGNAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 3)
hvH2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTFS SYAMS WVRQAPGKGLEW VA TITSGGTYTYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY FCARSLAGNAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 4)
hvH3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTFS SYAMS WVRQAPGKGLEW VA TITSGGTYTYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQINSLRAEDTAVYF CARSLAGNAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 5)
hvH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTFS SYGMN WVRQAPGKGLE WVA TITSGGTYIYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARSLAGNAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 6)
hvH5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTFS GYGMS WVRQAPGKGLE WVA TITSGGTYTYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQINSLRAEDTAVY YCARSLAGNAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 7)
hvH6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTFS SYGMH WVRQAPGKGLV WVA TITSGGTYTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARSLAGNAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 8)

Таблица 2. Вариабельные последовательности легкой цепи, полученные из мышиноного антитела B6H12. CDR по Кабату подчеркнуты, а CDR IMGT выделены жирным шрифтом.

Таблица 2

Вариант	Последовательность
mB6h12 vL	DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRAS Q TISDYLHWYQQKSHESPRLLIK FASQ SISGIPSRFSGSGSGDFTLSINSVEPEDVGYYC QNGHGFPR T GGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 9)
Ab47vL (KV3D- 11/KJ1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS Q TISDYLHWYQQKPGQAPRLLIK FASQ SISGIPARFSGSGSGDFTLTISLEPEDFAVYYC QNGHGFPR T QGQTKLEIKR (SEQ ID NO: 10)
hvK1	EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLCRAS Q TISDYLHWYQQKPDQSPKLLI K FASQ SISGVPSRFSGSGSGDFTLTINSLEAEDAAYYC QNGHGFPR TFGQGTKLEIK(R) (SEQ ID NO: 11)
hvK2	EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLCRAS Q TISDYLHWYQQKPDQSPKLLI K FASQ SISGVPSRFSGSGSGDFTLTINSLEAEDAATYYC QNGHGFPR T FGQGTKLEIK(R) (SEQ ID NO: 12)
hvK3	EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLCRAS Q TISDYLHWYQQKPDQSPKLLI K FASQ SISGVPSRFSGSGSGDFTLTINSLEAEDAATYYC QNGHGFPR T FGQGTKLEIK(R) (SEQ ID NO: 13)

hvk4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLT <u>CRASQTISNYLA</u> WYQQKPGKVPKLLI <u>KFASTLQSGVPSRFS</u> SGSGSGSDFTLTISLQPEDVATYYC <u>QNGHGFPR</u> FGQGTKLEIK(R) (SEQ ID NO: 14)
hvk3 (G91A)	EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLT <u>CRASQTISDYLH</u> WYQQKPDQSPKLLI <u>KFASQSIGVPSRFS</u> SGSGSGSDFLTINSLEAEDAATYYC <u>QNAHGFPR</u> FGQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 15)

Таблица 3
Последовательности CDR тяжелой цепи вариантов антител (по Кабату)

CDR	Последовательность
hvh1 & hvh5 HCDR1 (по Кабату)	GYGMS (SEQ ID NO: 16)
hvh1 HCDR2 (по Кабату)	TITSGGTYTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 17)
hvh1- hvh6 HCDR3 (по Кабату)	SLAGNAMDY (SEQ ID NO: 18)
hvh2 & hvh3 HCDR1 (по Кабату)	SYAMS (SEQ ID NO: 19)
hvh2, hvh3, & hvh5 HCDR2 (по Кабату)	TITSGGTYTYADSVKG (SEQ ID NO: 20)
hvh4 HCDR1 (по Кабату)	SYGMN (SEQ ID NO: 21)
hvh4 HCDR2 (по Кабату)	TITSGGTYIYADSVKG (SEQ ID NO: 22)
hvh6 HCDR1 (по Кабату)	SYGMH (SEQ ID NO: 23)
hvh6 HCDR2 (по Кабату)	TITSGGTYTSYADSVKG (SEQ ID NO: 24)

Таблица 4
Последовательности CDR тяжелой цепи вариантов антител (IMGT)

CDR	Последовательность
hvh1 & hvh5 HCDR1 (IMGT)	GFTFSGYG (SEQ ID NO: 25)
hvh1-hvh3, hvh5-hvh6 HCDR2 (IMGT)	ITSGGTYT (SEQ ID NO: 26)
hvh1- hvh6 HCDR3 (IMGT)	ARSLAGNAMDY (SEQ ID NO: 27)
hvh2 & hvh3 HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 28)
hvh4 & hvh6 HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYG (SEQ ID NO: 29)
hvh4 HCDR2 (IMGT)	ITSGGTYI (SEQ ID NO: 30)

Таблица 5
Последовательности CDR легкой цепи вариантов антител (по Кабату)

CDR	Последовательность
hvk1-hvk3 LCDR1 (по Кабату)	RASQTISDYLH (SEQ ID NO: 31)
hvk1-hvk3 LCDR2 (по Кабату)	FASQSIG (SEQ ID NO: 32)
hvk1- hvk4 LCDR3 (по Кабату)	QNGHGFPR (SEQ ID NO: 33)
hvk4 LCDR1 (по Кабату)	RASQTISNYLA (SEQ ID NO: 34)
hvk4 LCDR2 (по Кабату)	FASTLQS (SEQ ID NO: 35)
hvk3 (G91A) LCDR3 (по Кабату)	QNAHGFPR (SEQ ID NO: 36)

Таблица 6

Последовательности CDR легкой цепи вариантов антител (IMGT)

CDR	Последовательность
hvk1-hvk3 LCDR1 (IMGT)	QTISDY (SEQ ID NO: 37)
hvk1-hvk4 LCDR2 (IMGT)	FAS (SEQ ID NO: 38)
hvk1-hvk4 LCDR3 (IMGT)	QNGHGFPR (SEQ ID NO: 39)
hvk4 LCDR1 (IMGT)	QTISNY (SEQ ID NO: 40)
hvk3 (G91A) LCDR3 (IMGT)	QNAHGFPR (SEQ ID NO: 41)

Табл. 7. Полные последовательности тяжелой и легкой цепей экранированного антитела против CD47 в соответствии с предпочтительным вариантом реализации данного изобретения. Последовательности тяжелых цепей и легких цепей приведены в виде простого текста (SEQ ID NO: 42 и 43 соответственно), экранирующие последовательности выделены жирным шрифтом, а последовательности расщепления протеазами подчеркнуты.

Таблица 7

Цепь Антитела	Последовательность
Тяжелая Цепь	<u>Q</u>GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGS<u>IPV</u> <u>SLRSG</u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGMSWVRQA PGKRLEWVATITSGGTYTYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAIFYCARSLAGNAMDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK (SEQ ID NO: 42)
Экранирующая последовательность Тяжелой Цепи	QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGS (SEQ ID NO: 94)
Легкая Цепь	<u>Q</u>GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLGS<u>IPVS</u> <u>LRSG</u>EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLCRASQTISDYHLHWYQQKPDQ SPKLLIKFASQSIGVPSRFSGSGSGSDFTLTINSLEAEDAATYYCQN GHGFPRFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 43)
Экранирующая последовательность Легкой Цепи	QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLGS (SEQ ID NO: 95)

hB6H12.1

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR из HCVR, представленные как SEQ ID NO: 3 и/или CDR из LCVR, представленные как SEQ ID NO: 11. В других вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 16, 17 и 18 и/или CDR легкой цепи SEQ ID NO: 31, 32 и 33. В некоторых вариантах реализа-

или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR из HCVR, представленные как SEQ ID NO: 2 и/или CDR из LCVR, представленные как SEQ ID NO: 10. В других вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 16, 17 и 18 и/или CDR легкой цепи SEQ ID NO: 31, 32 и 33. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 25, 26 и 27 и/или CDR легкой цепи SEQ ID NO: 37, 38 и 39. В других вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару HCVR/LCVR SEQ ID NO: 2/SEQ ID NO: 10. В других вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, которая имеет, по меньшей мере, около 80% гомологии или идентичности (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) относительно SEQ ID NO: 2 и/или содержит LCVR, которая имеет, по меньшей мере, около 80% гомологии или идентичности (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) относительно SEQ ID NO: 10.

mB6H12

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR из HCVR, представленные как SEQ ID NO: 1 и/или CDR из LCVR, представленные как SEQ ID NO: 9. В других вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 16, 17 и 18 и/или CDR легкой цепи SEQ ID NO: 31, 32 и 33. В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 25, 26 и 27 и/или CDR легкой цепи SEQ ID NO: 37, 38 и 39. В других вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару HCVR/LCVR SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 9. В других вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, которая имеет, по меньшей мере, около 80% гомологии или идентичности (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) относительно SEQ ID NO: 1 и/или содержит LCVR, которая имеет, по меньшей мере, около 80% гомологии или идентичности (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) относительно SEQ ID NO: 9.

Антитела против CD47 и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут быть экспрессированы в модифицированной форме. Например, область дополнительных аминокислот, особенно заряженных аминокислот, может быть добавлена к N-концу антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента для улучшения стабильности и устойчивости в клетке-хозяине во время очистки или при последующем обращении и хранении. Также пептидные фрагменты могут быть добавлены к антителу против CD47 или его антигенсвязывающему фрагменту по данному изобретению для облегчения очистки. Такие области могут быть удалены до окончательного получения молекулы антитела или, по меньшей мере, одного ее фрагмента. Такие способы описаны во многих стандартных лабораторных руководствах, таких как Sambrook, цитировано выше; Ausubel, et al., ed., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2001).

Антитела против CD47 или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, обычно связывают CD47 с равновесной константой связывания ≤ 1 мкМ, например ≤ 100 нМ, предпочтительно ≤ 10 нМ и, более предпочтительно ≤ 1 нМ, как измерено с использованием стандартных анализов связывания, например, анализ связывания на основе технологии Biotec.

Молекулы антител по данному изобретению можно охарактеризовать относительно эталонного антитела против CD47, например, B6H12, 2D3, MABL, CC2C6 или BRIC126. Антитело B6H12 описано, например, в патентных США № 5,057,604 и 9,017,675, коммерчески доступно от Abcam, PLC, Santa Cruz Biotechnology, Inc. и eBioscience, Inc.

Варианты гликозилирования.

Антитела против CD47 и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть гликозилированы в консервативных положениях в их константных областях (Jefferis and Lund, (1997) *Chem. Immunol.* 65:111-128; Wright and Morrison, (1997) *TibTECH* 15:26-32). Олигосахаридные боковые цепи иммуноглобулинов влияют на функцию белка (Boyd et al., (1996) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318; Wittwe and Howard, (1990) *Biochem.* 29:4175-4180) и внутримолекулярное взаимодействие между частями гликопротеина, которые могут влиять на конформацию и представленную трехмерную поверхность гликопротеина (Jefferis and Lund, цитировано выше; Wyss and Wagner, (1996) *Current Op. Biotech.* 7:409-416). Олигосахариды также могут служить для нацеливания данного гликопротеина на определенные молекулы на основе специфических структур распознавания. Например, сообщалось, что в агалактозилированном IgG олигосахаридный фрагмент «выскальзывает» из пространства между CH2, и концевые остатки N-ацетилглюкозамина становятся доступными для связывания белка, связывающего маннозу (Malhotra et al., (1995) *Nature Med.* 1:237-243). Удаление гликопептидазой олигосахаридов из CAMPATH-1H (рекомбинантного гуманизированного мышинового моноклонального антитела IgG1, которое распознает антиген CDw52 лимфоцитов человека), продуцируемого в клетках яичника китайского хомячка (CHO), приводило к полному сниже-

нию комплемент-опосредованного лизиса (CMCL) (Boyd et al., (1996) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318), в то время как селективное удаление остатков сиаловой кислоты с использованием нейраминидазы не приводило к потере CMCL. Также сообщалось, что гликозилирование антител влияет на антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ). В частности, сообщалось, что клетки CHO с регулируемой тетрациклином экспрессией $\alpha(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III, гликозилтрансферазы, катализирующей образование бисектного GlcNAc, обладают повышенной активностью АЗКЦ. (1999) *Mature Bio- tech.* 17:176-180).

Гликозилирование антител обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводной части к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или сиалозы к гидроксиаминокислоте, чаще всего серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксиллизин.

Варианты гликозилирования антител представляют собой варианты, в которых паттерн гликозилирования антитела изменяется. Под изменением подразумевается удаление одной или более углеводных групп, обнаруженных в антителе, добавление одной или более углеводных групп к антителу, изменение состава гликозилирования (паттерн гликозилирования), степени гликозилирования и т.д.

Добавление сайтов гликозилирования к антителу против CD47 или его антигенсвязывающему фрагменту может быть достигнуто путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более описанных выше трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования). Изменение также может быть осуществлено путем добавления или замены одного или более остатков серина или треонина к последовательности исходного антитела (для O-связанных сайтов гликозилирования). Аналогично, удаление сайтов гликозилирования может быть достигнуто путем изменения аминокислот в нативных сайтах гликозилирования антитела.

Аминокислотная последовательность обычно изменяется путем изменения соответствующей последовательности нуклеиновой кислоты. Эти способы включают выделение из природного источника (в случае природных вариантов аминокислотных последовательностей) или получение с помощью олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, мутагенеза с помощью ПЦР и касетного мутагенеза ранее полученного варианта антитела или версии, не относящейся к варианту антитела.

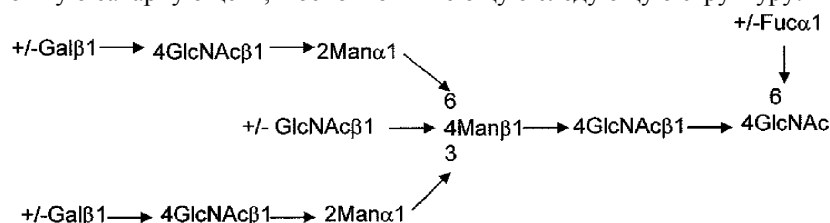
Гликозилирование (включая паттерн гликозилирования) антител также может быть изменено без изменения аминокислотной последовательности или соответствующей нуклеотидной последовательности. Гликозилирование в значительной степени зависит от клетки-хозяина, используемой для экспрессии антитела. Поскольку тип клеток, используемых для экспрессии рекомбинантных гликопротеинов, например антител, в качестве потенциальных терапевтических средств, редко является нативной клеткой, можно ожидать значительных изменений в паттерне гликозилирования антител. См., например, Hse et al., (1997) *J. Biol. Chem.* 272:9062-9070. В дополнение к выбору клеток-хозяев факторы, которые влияют на гликозилирование во время рекомбинантной продукции антител, включают режим роста, состав среды, плотность культуры, оксигенацию, pH, схемы очистки и тому подобное. Были предложены различные способы изменения паттерна гликозилирования, достигаемого в конкретном организме-хозяине, включая введение или избыточную экспрессию определенных ферментов, вовлеченных в продукцию олигосахаридов (патенты США № 5047335; 5510261; 5278299). Гликозилирование или определенные типы гликозилирования могут быть ферментативно удалены из гликопротеина, например, с использованием эндогликозидазы H (Эндо H, Endo H). Кроме того, рекомбинантная клетка-хозяин может быть генетически сконструирована, например, повреждена при процессинге определенных типов полисахаридов. Такие и подобные способы хорошо известны в данной области техники.

Структура гликозилирования антител может быть легко проанализирована с помощью обычных способов анализа углеводов, включая лектиновую хроматографию, ЯМР, Масс-спектрометрию, ВЭЖХ (HPLC), ГПХ (GPC), анализ состава моносахаридов, последовательное ферментативное расщепление и ВЭАОХ-ИАД (HPLC-PAD), в котором используется анионообменная хроматография с высоким pH для разделения олигосахаридов на основе заряда. Способы высвобождения олигосахаридов для аналитических целей также известны и включают, без ограничения, ферментативную обработку (обычно выполняемую с использованием пептид-N-гликозидазы F/эндо-Ргалактозидазы), элиминацию с использованием жесткой щелочной среды для высвобождения в основном O-связанных структур, и химические способы с использованием безводного гидразина для высвобождения как N-, так и O-связанных олигосахаридов.

Предпочтительной формой модификации гликозилирования антител является сниженное фукозилирование остова. "Фукозилирование остова" относится к добавлению фукозы ("фукозилирование") к N-ацетилглюкозамину ("GlcNAc") на восстанавливающем конце N-связанного гликана.

"Сложная N-гликозид-связанная сахарная цепь" обычно связана с аспарагином 297 (согласно нуме-

рации по Кабату). В контексте данного документа, сложная N-гликозид-связанная сахарная цепь имеет биантенарную сложную сахарную цепь, в основном имеющую следующую структуру:



где +/- указывает, что молекула сахара может присутствовать или отсутствовать, а цифры указывают положение связей между молекулами сахара. В вышеупомянутой структуре конец сахарной цепи, который связывается с аспарагином, называется восстанавливающим концом (справа), а противоположная сторона называется невосстанавливающим концом. Фукоза обычно связана с N-ацетилглюкозамин ("GlcNAc") восстанавливающего конца, как правило посредством связи $\alpha 1,6$ (положение 6 GlcNAc связано с положением 1 фукозы). "Gal" относится к галактозе, а "Man" относится к маннозе.

"Сложная N-гликозид-связанная сахарная цепь" включает 1) комплексный тип, в котором невосстанавливающая концевая сторона структуры остова имеет одну или более ветвей галактоза-N-ацетилглюкозамина (также называемого "gal-GlcNAc") и невосстанавливающая концевая сторона Gal-GlcNAc необязательно содержит сиаловую кислоту, бисектный GlcNAcN-ацетилглюкозамин или тому подобное; или 2) гибридный типа, в котором невосстанавливающая концевая сторона структуры остова имеет обе ветви сахарной цепи с высоким содержанием маннозы, связанной с N-гликозидом, и сложную сахарную цепь, связанную с N-гликозидом.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения "сложная N-гликозид-связанная сахарная цепь" включает 1) комплексный тип, в котором невосстанавливающая концевая сторона структуры остова не имеет или имеет одну или более ветвей галактоза-N-ацетилглюкозамина (также называемого "gal-GlcNAc") и невосстанавливающая концевая сторона Gal-GlcNAc необязательно дополнительно содержит сиаловую кислоту, бисектный GlcNAcN-ацетилглюкозамин или тому подобное.

В соответствии с представленными способами обычно только незначительное количество фукозы включается в сложную N-гликозид-связанную сахарную цепь(и) гуманизированных или химерных антител. Например, в различных вариантах реализации данного изобретения, менее чем около 60%, менее чем около 50%, менее чем около 40%, менее чем около 30%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5% или менее чем около 3% молекул антитела имеют фукозилацию остова с помощью фукозы. В некоторых вариантах реализации данного изобретения около 2% молекул антитела имеют фукозилацию остова с помощью фукозы.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения только незначительное количество аналога фукозы (или метаболита или продукта аналога фукозы) включено в сложную N-гликозид-связанную сахарную цепь(и). Например, в различных вариантах реализации данного изобретения, менее чем около 60%, менее чем около 50%, менее чем около 40%, менее чем около 30%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5% или менее чем около 3% гуманизированных или химерных антител имеют фукозилацию остова аналогом фукозы или метаболитом или продуктом аналога фукозы. В некоторых вариантах реализации данного изобретения около 2% гуманизированных или химерных антител имеют фукозилацию остова аналогом фукозы или метаболитом или продуктом аналога фукозы.

Способы получения нефукозилированных антител путем инкубации антителообразующих клеток с аналогом фукозы описаны, например, в WO 2009/135181. Вкратце, клетки, которые были сконструированы для экспрессии гуманизированных или химерных антител инкубируют в присутствии аналога фукозы или внутриклеточного метаболита или продукта аналога фукозы. Внутриклеточный метаболит может представлять собой, например, GDP-модифицированный аналог или полностью или частично деэтерифицированный аналог. Продукт может быть, например, полностью или частично деэтерифицированным аналогом. В некоторых вариантах реализации данного изобретения аналог фукозы может ингибировать фермент(ы) в пути утилизации фукозы. Например, аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность фукокиназы или GDP-фукозациклофосфорилазы. В некоторых вариантах реализации данного изобретения аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) ингибирует фукозилтрансферазу (предпочтительно 1,6-фукозилтрансферазу, например белок FUT8). В некоторых вариантах реализации данного изобретения аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность фермента в пути синтеза de novo для фукозы. Например, аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность 4,6-дегидратазы GDP-маннозы и/или синтетазы GDP-фукозы. В некоторых вариантах реализации данного изобретения аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать переносчик фукозы (например, переносчик GDP-фукозы).

В одном варианте реализации данного изобретения аналог фукозы представляет собой 2-флуорофукозу. Способы использования аналогов фукозы в питательной среде и других аналогов фукозы описаны, например, в WO/2009/135181, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Другие способы конструирования клеточных линий для снижения фукозилирования остова включали нокаут (knock-out) генов, "нокин" (knock-in) генов и РНК-интерференцию (РНК-и, RNAi). При нокауте генов ген, кодирующий FUT8 (фермент альфа-1,6-фукозилтрансферазу), инактивируется. FUT8 катализирует перенос фукозильного остатка из GDP-фукозы в положение 6 Asn-связанного (N-связанного) GlcNac N-гликана. Сообщается, что FUT8 является единственным ферментом, ответственным за добавление фукозы к N-связанному биантенарному углеводу в Asn297. При "нокин" генов добавляют гены, кодирующие ферменты, такие как GNTIII или Гольджи-альфа-маннозидазы II. Повышение уровня таких ферментов в клетках отвлекает моноклональные антитела от пути фукозилирования (что приводит к уменьшению фукозилирования остова) и увеличивает количество бисектных N-ацетилглюкозаминов. РНК-и, как правило, также нацелена на экспрессию гена FUT8, что приводит к снижению уровня транскриптов мРНК или полностью нарушает экспрессию генов. Любой из этих способов может быть использован для создания клеточной линии, которая была бы способна продуцировать нефукозилированное антитело, например гуманизированное или химерное антитело.

Существует множество способов определения степени фукозилирования на антителе. Способы включают, например, ЖХ-МС с помощью хроматографии на PLRP-S и квадрупольную МС с электрораспылительной ионизацией (TOF MS).

Суперспиральные экранирующие агенты.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с суперспиральным экранирующим агентом (также называемым "суперспиральным экранирующим доменом" или "экранирующим доменом"), который предотвращает связывание антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента с CD47. В различных вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, связанные с экранирующим доменом, называют "экранированным антителом".

Суперспираль представляет собой структурный мотив в белках и пептидах, в котором две или более альфа-спирали обвиваются вокруг друг друга, образуя суперспираль. В пучке суперспирали может быть две, три или четыре спирали, и спирали могут быть ориентированы либо в одном (параллельном), либо в противоположном (антипараллельном) направлениях.

Суперспирали, как правило, содержат элементы последовательности из трех и четырех остатков, чьи паттерн гидрофобности и состав остатков совместимы со структурой амфипатических альфа-спиралей. Чередующиеся элементы последовательности из трех и четырех остатков представляют собой гептадные повторы, в которых аминокислоты обозначены как "a", "b", "c", "d", "e", "f" и "g". Остатки в положениях "a" и "d", как правило, являются гидрофобными и образуют зигзагообразный паттерн из выступов и отверстий, которые сцепляются с аналогичным паттерном на другой нити, образуя плотно прилегающее гидрофобное ядро. Из оставшихся остатков, "b", "c" и "f" как правило заряжены. Следовательно, образование гептадного повтора зависит от физических свойств гидрофобности и заряда, которые требуются в определенной позиции, а не на определенной аминокислоте. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения суперспирали по данному изобретению образованы из двух пептидов, образующих суперспираль.

Примеры консенсусных формул для гептадных повторов в пептидах, образующих суперспираль, приведены в WO 2011034605, включенной в данный документ в полном объеме посредством ссылки для всех целей.

Иллюстративные консенсусные формулы в соответствии с некоторыми вариантами реализации данного изобретения представлены ниже:

Формула 1: $(X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7)_n$, где:

X1 представляет собой гидрофобную аминокислоту или аспарагин;

X2, X3 и X6 представляют собой любую аминокислоту;

X4 представляет собой гидрофобную аминокислоту;

X5 и X7 каждый представляет собой заряженный аминокислотный остаток; и n является положительным целым числом.

Формула 2: $(X_1', X_2', X_3', X_4', X_5, X_6, X_7)_n$, где:

X1' представляет собой гидрофобную аминокислоту или аспарагин;

X2', X3' и X6' каждый представляет собой любой аминокислотный остаток;

X4' представляет собой гидрофобную аминокислоту;

X5 и X7' каждый представляет собой заряженный аминокислотный остаток;

где n в формулах 1 и 2 больше или равно 2; и

n является положительным целым числом.

В некоторых вариантах реализации изобретения, в которых пептиды в Формуле 1 и Формуле 2 образуют суперспираль, X5 в Формуле 1 противоположен по заряду X7 в Формуле 2, а X7 в Формуле 1 противоположен по заряду X5 в Формуле 2. Гептадные повторы внутри пептида, образующего супер-

спираль, могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга при в соответствии Формуле 1 и/или 2.

Суперспирали могут быть гомодимерными или гетеродимерными. Примеры пептидов, которые могут образовывать суперспираль в соответствии с некоторыми типовыми вариантами реализации данного изобретения, представлены в табл. 8. Пептидные последовательности можно использовать как есть, или их компоненты можно использовать в других комбинациях. Например, пептид Vel, образующий суперспираль, может быть использован с другими линкерными последовательностями. Последовательности, представленные для легких цепей, могут также использоваться с тяжелыми цепями и наоборот.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения предложено двухвалентное антитело, содержащее две пары легкой и тяжелой цепей, при этом N-концы одной или более легких цепей и/или тяжелых цепей связаны через линкеры, содержащие сайт расщепления протеазой в пептидах, образующих суперспираль, которые связываются, образуя суперспираль, снижая аффинность связывания пары легкой и тяжелой цепи с мишенью. Необязательно, пептиды связываются без образования дисульфидного мостика.

Необязательно, две пары легких и тяжелых цепей одинаковы. Необязательно, две пары легких и тяжелых цепей различны. Необязательно, легкие цепи включают переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи, а тяжелые цепи включают переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи. Необязательно, область тяжелой цепи включает области CH1, шарнира, CH2 и CH3. Необязательно две легкие цепи связаны с первым гетерологичным пептидом, а две тяжелые цепи - со вторым гетерологичным пептидом.

Необязательно, сайт расщепления протеазой является сайтом расщепления MMP1 или MMP2.

Необязательно, мишенью является CD47.

Необязательно, связывание антигена уменьшается, по меньшей мере, в 100 раз благодаря наличию экранирующего агента (например, суперспирального экранирующего агента). Необязательно, связывание антигена уменьшается в 200-1500 раз благодаря наличию экранирующего агента (например, суперспирального экранирующего агента). Необязательно, цитотоксичность конъюгата снижается, по меньшей мере, в 100 раз благодаря наличию экранирующего агента (например, суперспирального экранирующего агента). Необязательно, цитотоксичность конъюгата снижается, по меньшей мере, в 200-1500 раз благодаря наличию экранирующего агента (например, суперспирального экранирующего агента).

Необязательно, пептиды, образующие суперспираль, связаны с N-концом тяжелой и легкой цепей в одинаковой ориентации. Необязательно, пептиды, образующие суперспираль, связаны с N-концом тяжелой и легкой цепей в противоположных ориентациях. Необязательно, несколько копий пептида, образующего суперспираль, связаны в тандеме с N-концом тяжелой и легкой цепей.

Иллюстративные линкеры пептидов, образующих суперспираль, и сайты протеаз в соответствии с некоторыми вариантами реализации данного изобретения изображены на фиг. 34.

В соответствии с некоторыми типовыми вариантами реализации данного изобретения, пептид, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 51 (Vel LC в табл. 8) используется для формирования линкера, содержащего сайт расщепления протеазой и пептид, образующий суперспираль, связанный с N-концом легкой цепи, и пептид последовательности SEQ ID NO: 50 (Vel HC в табл. 8) используется для формирования линкера, содержащего сайт расщепления протеазой и пептид, образующий суперспираль, связанный с N-концом тяжелой цепи, или наоборот. Пептиды, содержащие эти последовательности, могут быть связаны с любым из антител, описанных в данном документе.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения аминокислотные замены в варианте пептида, который образует суперспираль, являются консервативными заменами. В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения повторяющийся гептадный паттерн сохраняется в варианте пептида, посредством чего пептид, образующий суперспираль, может быть подразделен на непрерывные гептадные сегменты в соответствии с формулой, классифицирующей аминокислоты, занимающие позиции в формуле по типу аминокислоты, так как в Формуле 1 и/или в Формуле 2. В некоторых вариантах реализации данного изобретения в гептаде аминокислот имеется не более 1 или 2 замен, и любые такие замены являются консервативными. В других вариантах реализации данного изобретения вариант может иметь, по меньшей мере, около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательностей с пептидом, образующим суперспираль, описанным в данном документе, и способен образовывать суперспираль.

Иллюстративные пептиды, которые образуют суперспирали, приведены в табл. 8A и табл. 8B.

Таблица 8А

Последовательности экранирующих доменов в соответствии с некоторыми типовыми вариантами реализации данного изобретения.

Последовательности расщепления подчеркнуты

Экранирующий Пептид	Последовательность
A2B1 HC	GASTSVDELQAEVDQLQDENYALKTKVAQLRKKVEKLSEGGGG GPLGVRGGGGGS (SEQ ID NO: 44)
A2B1 LC	GASTTVAQLRERVKTLRAQNYELESEVQRLREQVAQLASGGGG GPLGVRGGGGGS (SEQ ID NO: 45)
M11 HC	LEIEAAFLERENTALETRVAELRQVRQARNRVSQYRTRYGGGG GPLGVRGGGGGS (SEQ ID NO: 46)
M11 LC	LEIRAAFLRQRNTALRTEVAELEQEVQRLNEVSQYETRYGGGG GPLGVRGGGGGS (SEQ ID NO: 47)
M15 HC	LEIRAAFLRRNTALRTRVAELRQVRQRLRNIVSQYETRYGGGG GGPLGVRGGGGGS (SEQ ID NO: 48)
M15 LC	LEIEAAFLEQENTALETEVAELEQEVQRLNIVSQYETRYGGGG GPLGVRGGGGGS (SEQ ID NO: 49)
Vel HC	GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGS <u>IPVSL</u> <u>RSG</u> (SEQ ID NO: 50)
Vel LC	GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLLEEQAQLGS <u>IPVSL</u> <u>RSG</u> (SEQ ID NO: 51)
Fos-Jun HC	GALTDTLQAETDQLEDKKSALQTEIANLLKEKEKLEFILAAHGG GGGPLGVRGGGGGS (SEQ ID NO: 52)
Fos-Jun LC	GARIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMNY GGGGGPLGVRGGGGGS (SEQ ID NO: 53)
A4B4 HC	GKIAALKQKIAALKYKNAALKKKIAALKQGGGGGPLGVRGGGG S (SEQ ID NO: 54)
A4B4 LC	GEIAALEQEIAALEKENAALEWEIAALEQGGGGGPLGVRGGGGGS (SEQ ID NO: 55)

Таблица 8В

Последовательности экранирующих доменов в соответствии с некоторыми типовыми вариантами реализации данного изобретения. Последовательности расщепления подчеркнуты. Остатки ЕАС включены

Экранирующий Пептид	Последовательность
CA2B1 HC	EACGASTSVDELQAEVDQLQDENYALKTKVAQLRKKVEKLSEG GGGG <u>PLGVR</u> GGGGS (SEQ ID NO: 75)
CA2B1 LC	EACGASTTVAQLRERVKTTLRAQNYELESEVQRLREQVAQLASG GGGG <u>PLGVR</u> GGGGS (SEQ ID NO: 76)
CM11 HC	EACLEIEAAFLERENTALETRVAELRQVRQARNRVSQYRTRYG GGGG <u>PLGVR</u> GGGGS (SEQ ID NO: 77)
CM11 LC	EACLEIRAAFLRQRNTALRTEVAELEQEVQRLNEVSQYETRYG GGGG <u>PLGVR</u> GGGGS (SEQ ID NO: 78)
CM15 HC	EACLEIRAAFLRRNTALRTRVAELRQVRQRLRNIVSQYETRYG GGGGG <u>PLGVR</u> GGGGS (SEQ ID NO: 79)
CM15 LC	EACLEIEAAFLEQENTALETEVAELEQEVQRLNIVSQYETRYGG GGGG <u>PLGVR</u> GGGGS (SEQ ID NO: 80)
CVel HC	EACGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIP <u>VSLRSG</u> (SEQ ID NO: 81)
CVel LC	EACGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLREQVAQLGSIP <u>VSLRSG</u> (SEQ ID NO: 82)
CFos-Jun HC	EACGALTDTLQAETDQLEDKKSALQTEIANLLKEKEKLEFILAAH GGGGG <u>PLGVR</u> GGGGS (SEQ ID NO: 83)
CFos-Jun LC	EACGARIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVM NYGGGGG <u>PLGVR</u> GGGGS (SEQ ID NO: 84)
CA4B4 HC	EACGKIAALKQKIAALKYKNAALKKKIAALKQGGGGG <u>PLGVRG</u> GGGS (SEQ ID NO: 85)
CA4B4 LC	EACGEIAALEQEIAALEKENAALEWEIAALEQGGGGG <u>PLGVRG</u> GGGS (SEQ ID NO: 86)

Линкеры и сайты расщепления.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения линкер используется для связывания суперспирального экранирующего агента с антителом против CD47 или его антигенсвязывающим фрагментом. Линкерами могут быть любые сегменты аминокислот, обычно используемые в качестве линкера для присоединения пептидных доменов. Подходящие линкеры могут варьироваться по длине, например от 1 до 20, от 2 до 15, от 3 до 12, от 4 до 10, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Некоторые такие линкеры включают сегмент полиглицина. Некоторые такие линкеры включают один или более остатков серина, часто в положениях, фланкирующих остатки глицина. Другие линкеры включают один или более остатков аланина. Глицин и глицин-сериновые полимеры являются относительно неструктурированными и, следовательно, могут служить в качестве нейтральной связи между компонентами. Глицин получает доступ к значительно большему количеству ϕ - ψ -пространства, чем даже аланин, и гораздо менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Некоторые иллюстративные линкеры имеют форму S(G)_nS, где n равно 5-20. Другими типовыми линкерами являются (G)_n, глицин-сериновые полимеры (включая, например, (GS)_n, (GSGGS)_n [(GSGGS) - SEQ ID NO: 59] и (GGGS)_n, [(GGGS) - SEQ ID NO: 60], где n представляет собой целое число, по меньшей мере, единицу), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Некоторыми примерами линкеров являются Ser-(Gly)₁₀-Ser (SEQ ID NO: 61), Gly-Gly- Ala-Ala (SEQ ID NO: 62), Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 63), Leu- Ala- Ala-

Ala- Ala (SEQ ID NO: 64), Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 65), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 66), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 67), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 68), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 69), Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 70) и тому подобное.

Сайт протеазы предпочтительно распознается и расщепляется протеазой, экспрессируемой внеклеточно, поэтому он связывается с экранированным антителом, высвобождая экранированное антитело и позволяя ему связаться с его мишенью, такой как рецептор внеклеточного домена или растворимым лигандом. Подходящими являются несколько сайтов матриксной металлопротеиназы (ММП-28). ММП играют роль в ремоделировании тканей и участвуют в опухолевых процессах, таких как морфогенез, ангиогенез и метастазирование. Некоторыми типовыми сайтами протеаз являются PLG-XXX (SEQ ID NO: 71), хорошо известная эндогенная последовательность для ММП, PLG-VR (SEQ ID NO: 72) (W02014193973) и IPVSLRSG (SEQ ID NO: 73) (Turk et al., Nat. Biotechnol., 2001, 19, 661-667), LSGRS-DNY (SEQ ID NO: 74) (Cytomx) и GPLGVR (SEQ ID NO: 57) (Chang et al., Clin. Cancer Res. 2012 Jan 1; 18(1):238-47). Дополнительные примеры ММП приведены в US 2013/0309230, WO 2009/025846, WO 2010/081173, WO 2014/107599, WO 2015/048329, US 20160160263 и Ratnikov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111: E4148-E4155 (2014).

Таблица 9

Последовательности расщепления протеазой. Сайт расщепления ММП обозначен *, а сайты расщепления uPA/матриптазой/легумаином обозначены **

Название Сайта Расщепления	Последовательность
M2	GPLG*VR** (SEQ ID NO: 57)
IPV	IPVS*LR**SG (SEQ ID NO: 58)

Связывание суперспиральных экранирующих агентов с антителами против CD47.

Пептиды, образующие суперспираль, связаны с N-концом переменных областей антитела через линкер, включающий сайт расщепления протеазой. Типичное антитело включает переменную область тяжелой и легкой цепи, и в этом случае пептид, образующий суперспираль, связан с N-концом каждой цепи. Двухвалентное антитело имеет два сайта связывания, которые могут быть одинаковыми или нет. В нормальном моноспецифическом антителе сайты связывания одинаковы, и антитело имеет две идентичные пары легкой и тяжелой цепи. В этом случае каждая тяжелая цепь связана с одним и тем же пептидом, образующим суперспираль, и каждая легкая цепь - с одним и тем же пептидом, образующим суперспираль (который может совпадать или не совпадать с пептидом, связанным с тяжелой цепью). В биспецифическом антителе сайты связывания различны и образованы из двух разных пар тяжелой и легкой цепей. В таком случае переменная область тяжелой и легкой цепи одного сайта связывания соответственно связана с пептидами, образующими суперспираль, как и переменные области тяжелой и легкой цепи другого сайта связывания. Обычно обе переменные области тяжелой цепи связаны с одним и тем же типом пептида, образующего суперспираль, как и обе переменные области легкой цепи.

Пептид, образующий суперспираль, может быть связан с переменной областью антитела через линкер, включающий сайт расщепления протеазой. Как правило, один и тот же линкер с одним и тем же сайтом расщепления протеазой используется для связывания каждой переменной области тяжелой или легкой цепи антитела с суперспиральным пептидом. Сайт расщепления протеазой должен быть таким, который может быть расщеплен протеазой, присутствующей внеклеточно в предполагаемой ткани-мишени или патологии, такой как опухоль, так, что расщепление линкера высвобождает антитело из суперспирали, экранирующей его активность, позволяя антителу связываться с его предполагаемой мишенью, такой как антиген клеточной поверхности или растворимый лиганд.

Наряду с переменными областями экранированное антитело обычно включает всю или часть константной области, которая может включать любую или все константные области легкой цепи, области CH1, шарнира, CH2 и CH3. Как и в случае других антител, один или более C-концевых остатков могут быть протеолитически обработаны или дериватизированы.

Суперспирали могут быть образованы из одного и того же пептида, образующего гомодимер, или двух разных пептидов, образующих гетеродимер. Для образования гомодимера легкие и тяжелые цепи антител связываются с одним и тем же пептидом, образующим суперспираль. Для образования гетеродимера легкие и тяжелые цепи антител связываются с различными пептидами, образующими суперспираль. Для некоторых пар пептидов, образующих суперспираль, предпочтительно, чтобы один из пары был связан с тяжелой цепью, а другой - с легкой цепью антитела, хотя также возможна обратная ориентация.

Каждая цепь антитела может быть связана с одним пептидом, образующим суперспираль, или многочисленными такими пептидами в тандеме (например, двумя, тремя, четырьмя или пятью копиями пептида). Если последнее, то пептиды в тандемной связи обычно одинаковы. Также, если используется тандемная связь, легкие и тяжелые цепи обычно связаны с одинаковым количеством пептидов.

Связывание цепей антител с пептидами, образующими суперспираль, может снижать аффинность связывания антитела, по меньшей мере, в около 10 раз, в около 50 раз, в около 100 раз, в около 200 раз, в

около 500 раз, в около 1000 раз или в около 1500 раз относительно того же антитела без такой связи или после расщепления такой связи. В некоторых таких антителах аффинность связывания уменьшается в диапазоне в около 50-1500 раз, в около 100-1500 раз, в около 200-1500 раз, в около 500-1500 раз, в около 50-1000 раз, в около 100-1000 раз, в около 200-1000 раз, в около 500-1000 раз, в около 50-500 раз или в около 100-500 раз. Эффекторные функции антитела, такие как АЗКЦ, фагоцитоз и КЗЦ или цитотоксичность в результате связывания с лекарственным средством в конъюгате антитела с лекарственным средством могут быть снижены с помощью тех же факторов или в тех же диапазонах. После протеолитического расщепления, которое служит для снятия экранирующего фрагмента с антитела или иного удаления экранирующего фрагмента из антитела, восстановленное антитело, как правило, имеет аффинность или эффекторную функцию, которая находится в пределах коэффициента 2, 1,5 или предпочтительно неизменна в пределах ошибки эксперимента по сравнению с другим идентичным контрольным антителом, которое никогда не было экранировано.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитела против CD47 по данному изобретению можно комбинировать с конъюгатами антитело-лекарственное средство (ADC). Конкретные ADC могут содержать цитотоксические агенты (например, химиотерапевтические агенты), ферменты, преобразующие пролекарство, радиоактивные изотопы или соединения или токсины (эти группы в совокупности называют терапевтическими агентами). Например, ADC может быть конъюгирован с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент, или токсином (например, цитостатическим или цитотоксическим агентом, таким как, например, абрин, рицин А, псевдомонадный экзотоксин или дифтерийный токсин). Примеры полезных классов цитотоксических агентов включают, например, связывающие вещества малой бороздки ДНК, алкилирующие агенты ДНК и ингибиторы тубулина. Иллюстративные цитотоксические агенты включают, например, ауристатины, камптотецины, калихеамицины, дуокармицины, этопозиды, майтанзиноиды (например, DM1, DM2, DM3, DM4), таксаны, бензодиазепины (например, пирроло[1,4] бензодиазепины, индолинбензодиазепины и оксазолидинонбензодиазепины включая димеры пирроло[1,4] бензодиазепина, димеры индолинбензодиазепина и димеры оксазолидинонбензодиазепина) и алкалоиды барвинка.

ADC может быть конъюгирован с ферментом, преобразующим пролекарство. Фермент, преобразующий пролекарство, может быть рекомбинантно слит с антителом или химически конъюгирован с ним с использованием известных способов. Типовыми ферментами, преобразующими пролекарство, являются карбоксипептидаза G2, бета-глюкуронидаза, пенициллин-V-амидаза, пенициллин-O-амидаза, β -лактамаза, β -глюкозидаза, нитроредуктаза и карбоксипептидаза А.

Способы конъюгирования терапевтических агентов с белками и, в частности, с антителами хорошо известны. (См., например, Alley et al., *Current Opinion in Chemical Biology* 2010 14: 1-9; Senter, *Cancer J.*, 2008, 14(3): 154-169.) Терапевтический агент может быть конъюгирован способом, который снижает его активность, если он не отщепляется от антитела (например, путем гидролиза, протеолитической деградации или расщепляющим агентом). В некоторых аспектах терапевтический агент присоединяется к антителу с помощью пригодного для расщепления линкера, который чувствителен к расщеплению во внутриклеточной среде раковой клетки, экспрессирующей CD47, но по существу не чувствителен к расщеплению в внеклеточной среде, так что конъюгат отщепляется от антитела, когда оно поглощено раковой клеткой, экспрессирующей CD47, (например, в эндосомальной или, например, в зависимости от чувствительности к pH или протеазы, в лизосомальной среде или в кавеоларной среде). В некоторых вариантах реализации данного изобретения терапевтический агент также может быть присоединен к антителу с помощью не пригодного для расщепления линкера.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения ADC может включать линкерную область между цитотоксическим или цитостатическим агентом и антителом. Как отмечено выше, как правило, линкер может расщепляться во внутриклеточных условиях, так что расщепление линкера высвобождает терапевтический агент из антитела во внутриклеточной среде (например, в лизосоме, эндосоме или кавеоле). Линкер может представлять собой, например, пептидильный линкер, который расщепляется внутриклеточным пептидазным или протеазным ферментом, включая лизосомальную или эндосомальную протеазу. Расщепляющие агенты могут включать катепсины В и D и плазмин (см., например, Dubowchik and Walker, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123, 1999). Наиболее типичными являются пептидильные линкеры, которые расщепляются ферментами, присутствующими в клетках, экспрессирующих CD47. Например, можно использовать пептидильный линкер, который расщепляется тиюлзависимой протеазой катепсином-В, который высоко экспрессируется в раковой ткани (например, линкер, содержащий пептид Phe-Leu или Val-Cit).

Расщепляемый линкер может быть чувствительным к pH, то есть чувствительным к гидролизу при определенных значениях pH. Как правило, pH-чувствительный линкер гидролизует в кислых условиях. Например, может быть использован кислотолабильный линкер, который гидролизует в лизосоме (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, амид цис-аконитовой кислоты, ортоэфир, ацеталь, кеталь или тому подобное). (См., например, патенты США №5,122,368; 5,824,805; 5,622,929; Dubowchik

and Walker, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123, 1999; Neville et al, *Biol. Chem.* 264: 14653-14661, 1989.) Такие линкеры относительно стабильны в условиях нейтрального pH, таких как в крови, но нестабильны при pH ниже 5,5 или 5,0, приблизительном pH лизосомы.

Другие линкеры расщепляются в восстанавливающих условиях (например, дисульфидный линкер). Дисульфидные линкеры включают те, которые могут быть образованы с использованием SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетата), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионата), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутирата) и SMPT (N-сукцинимидил-оксикарбонил-альфа-метил-альфа- (2-пиридил-дитио)толуола), SPDB и SMPT. (См., например, Thorpe et al., *Cancer Res.* 47:5924-5931, 1987; Wawrzynczak et al., In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. См. также патент США № 4,880,935.)

Линкер также может представлять собой малонатный линкер (Johnson et al, *Anticancer Res.* 15: 1387-93, 1995), малеимидобензоильный линкер (Lau et al., *Bioorg-Med-Chem.* 3: 1299-1304, 1995) или 3'-N-амидный аналог (Lau et al., *Bioorg-Med-Chem.* 3: 1305-12, 1995).

Линкер также может представлять собой не пригодный для расщепления линкер, такой как малеимидо-алкиленовый или малеимид-арильный линкер, который непосредственно присоединен к терапевтическому агенту и высвобождается при протеолитической деградации антитела.

Как правило, линкер не является существенно чувствительным к внеклеточной среде, что означает, что не более чем около 20%, обычно не более чем около 15%, более типично не более чем около 10% и даже более типично не более чем около 5%, не более чем около 3% или не более чем около 1% линкеров в образце ADC расщепляется, когда ADC присутствует во внеклеточной среде (например, в плазме). Является ли линкер по существу не чувствительным к внеклеточной среде, можно определить, например, путем независимой инкубации с плазмой как (a) ADC ("образец ADC"), так и (b) равное молярное количество неконъюгированного антитела или терапевтического агента ("контрольный образец") в течение предварительно определенного периода времени (например, 2, 4, 8, 16 или 24 ч) и затем сравнить количество неконъюгированного антитела или терапевтического агента, присутствующего в образце ADC, с количеством, присутствующим в контрольном образце, измеренным, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографией.

Линкер также может стимулировать клеточную интернализацию. Линкер может стимулировать клеточную интернализацию, когда он конъюгирован с терапевтическим агентом (то есть в среде компонента линкер-терапевтический агент ADC или производного ADC, как описано в данном документе). Альтернативно, линкер может стимулировать клеточную интернализацию, когда он конъюгирован как с терапевтическим агентом, так и с антителом (т.е. в среде ADC, как описано в данном документе).

Антитело может быть конъюгировано с линкером через гетероатом антитела. Эти гетероатомы могут присутствовать на антителе в его естественном состоянии или могут быть введены в антитело. В некоторых аспектах антитело будет конъюгировано с линкером через атом азота остатка лизина. В других аспектах антитело будет конъюгировано с линкером через атом серы остатка цистеина. Способы конъюгирования линкера и лекарственного линкера с антителами известны в данной области техники.

Иллюстративные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе ауристатина, что означает, что компонент лекарственного средства представляет собой лекарственное средство ауристатин. Было показано, что ауристатины связывают тубулин, влияют на динамику микротрубочек, деление ядра и клеток и обладают противоопухолевой активностью. Обычно конъюгат антитело-лекарственное средство на основе ауристатина содержит линкер между лекарственным средством ауристатином и антителом против CD47. Линкер может представлять собой, например, пригодный для расщепления линкер (например, пептидный линкер) или не пригодный для расщепления линкер (например, линкер, высвобождаемый при деградации антитела). Ауристатины включают MMAF и MMAE. Синтез и структура иллюстративных ауристатинов описаны в публикациях США № 7,659,241, 7,498,298, 2009-0111756, 2009-0018086, и 7,968, 687, каждая из которых включена в данный документ в полном объеме и для всех целей посредством ссылки.

Другие иллюстративные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе мейтансиноид, означающие, что компонент лекарственного средства представляет собой лекарственное средство мейтансиноид, и конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе бензодиазепина, означающие, что лекарственный компонент представляет собой бензодиазепин (например, димеры пирроло[1,4]бензодиазепина, димеры индолинбензодиазепина и димеры оксазолидинонбензодиазепина).

В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело против CD47 по данному изобретению можно комбинировать с ADC со специфичностью связывания с другой мишенью. Иллюстративные ADC, которые можно комбинировать с антителом против CD47, включают брентуксимаб-ведотин (анти-CD30-ADC), энфортумаб-ведотин (анти-нектин-4-ADC), ладиратумаб-ведотин (анти-LIV-1 ADC), денитумаб-мафодотин (анти-CD19 ADC), глембатумаб-ведотин (анти-GPNMB ADC), анти-TIM-1 ADC, полатумаб-ведотин (анти-CD79b ADC), анти-MUC16 ADC, депатуксизумаб мафодотин, телизотумаб-ведотин, анти-PSMA ADC, анти-C4.4a ADC, анти-BCMA ADC, анти-AXL ADC, тизотумаб ведотин (анти-тканевой фактор ADC).

Экспрессия молекулы антитела.

Нуклеиновые кислоты по данному изобретению могут быть экспрессированы в клетке-хозяине, которая содержит эндогенную ДНК, кодирующую антитело или экранированное антитело по данному изобретению. Такие способы хорошо известны в данной области техники, например, как описано в патенте США № 5,580,734, 5,641,670, 5,733,746, и 5,733,761. Также см., например, Sambrook, et al., цитировано выше, и Ausubel, et al., цитировано выше. Специалистам в данной области техники известны многочисленные системы экспрессии, доступные для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей белок по данному изобретению. Наглядными клеточными культурами, полезными для продуцирования антител, экранированных антител, указанных частей или их вариантов, являются клетки млекопитающих. Клеточные системы млекопитающих часто могут быть в форме монослоев клеток, хотя также могут быть использованы суспензии клеток млекопитающих или биореакторы. Ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных экспрессировать интактные гликозилированные белки, был разработан в данной области техники и включает COS-1 (например, ATCC CRL 1650), COS-7 (например, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (например, клеточные линии ATCC CRL-10), CHO (например, ATCC CRL 1610) и BSC-1 (например, ATCC CRL-26), клетки пер G2, клетки P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, клетки HeLa и тому подобное, которые легко доступны из, например, Американской коллекции типовых культур (Манассас, Виргиния). Также могут быть использованы дрожжевые и бактериальные клетки-хозяева, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Известны и/или доступны и другие клетки, пригодные для получения нуклеиновых кислот или белков по данному изобретению, например, из "Каталога клеточных линий и гибридом" Американской коллекции типовых культур или из других известных или коммерческих источников.

Векторы экспрессии могут включать одну или более из следующих последовательностей контроля экспрессии, таких как, но не ограничиваясь ими, точку начала репликации; промотор (например, поздние или ранние промоторы SV40, промотор CMV (пат. США № 5,168,062; 5,385,839), HSV-tk промотор, pgk (фосфоглицераткиназа) промотор, альфа-промотор EF-1 (пат. США № 5,266,491), по меньшей мере, один промотор иммуноглобулина человека; энхансер и/или сайты процессинга, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования (например, сайт добавления поли-А к последовательности большого Т-антигена SV40) и последовательности терминатора транскрипции). Также см., например, Ausubel et al., цитировано выше; Sambrook, et al., цитировано выше.

Векторы экспрессии необязательно включают, по меньшей мере, один селективируемый маркер. Такие маркеры включают, например, но не ограничиваются ими, метотрексат (MTX), дигидрофолатредуктазу (DHFR, пат. США № 4,399,216; 4,634,665; 4,656,134; 4,956,288; 5,149,636; 5,179,017), ампициллин, неомицин (G418), микофеноловую кислоту или глутаминсинтетазу (GS, пат. США № 5,122,464; 5,770,359 и 5,827,739), устойчивость к эукариотической клеточной культуре и гены устойчивости к тетрациклину или ампициллину для культивирования в *E. coli* и других бактериях или прокариотах. Подходящие культуральные среды и условия для вышеописанных клеток-хозяев известны в данной области техники. Подходящие векторы будут очевидны для специалиста в данной области техники. Введение векторной конструкции в клетку-хозяина может осуществляться трансфекцией фосфатом кальция, трансфекцией, опосредованной DEAE-декстраном, трансфекцией, опосредованной катионными липидами, электропорацией, трансдукцией, инфекцией или другими известными способами. Такие способы описаны в данной области техники, например Sambrook, цитировано выше; Ausubel, цитировано выше.

Вставка нуклеиновой кислоты должна быть функционально связана с соответствующим промотором. Экспрессирующие конструкции будут дополнительно содержать сайты инициации, терминации транскрипции и, в транскрибируемой области, сайт связывания рибосомы для трансляции. Кодированная часть зрелых транскриптов, экспрессируемых этими конструкциями, предпочтительно будет включать инициацию трансляции в начале и терминирующий кодон (например, UAA, UGA или UAG), соответствующим образом расположенный в конце мРНК для трансляции, при этом предпочтительными являются UAA и UAG для экспрессии в клетках млекопитающих или эукариот.

Вставка нуклеиновой кислоты необязательно находится в рамке считывания с последовательностью суперспирали и/или последовательностью расщепления ММП, например, на N-конце одной или более последовательностей тяжелой цепи и/или легкой цепи. Альтернативно, последовательность суперспирали и/или последовательность расщепления ММП могут быть пост-трансляционно добавлены к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, например, через дисульфидную связь или тому подобное.

Когда используются эукариотические клетки-хозяева, последовательности терминатора полиаденилирования или транскрипции обычно включаются в вектор. Примером последовательности терминатора является последовательность полиаденилирования из гена гормона роста крупного рогатого скота. Последовательности для точного сплайсинга транскрипта также могут быть включены. Примером последовательности сплайсинга является интрон VP1 из SV40 (Sprague, et al. (1983) J. Virol. 45:773-781). Кроме того, последовательности генов для контроля репликации в клетке-хозяине могут быть включены в вектор, как известно в данной области техники.

Выделение и очистка антител.

Антитела против CD47 или экранированные антитела, описанные в данном документе, могут быть

выделены и очищены из рекомбинантных клеточных культур хорошо известными способами, включая, но не ограничиваясь этим, очистку с использованием протеина А, осаждение сульфатом аммония или этанолом, кислотную экстракцию, анионную или катионообменную хроматографию, фосфоцеллюлозную хроматографию, хроматографию с гидрофобным взаимодействием, аффинную хроматографию, хроматографию с гидроксипатитом и лектиновую хроматографию. Для очистки также может быть использована высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). См., например, Colligan, *Current Protocols in Immunology*, or *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1997-2001).

Антитела и экранированные антитела, описанные в данном документе, могут включать очищенные продукты, продукты химических синтетических процессов и продукты, полученные рекомбинантными способами из эукариотического хозяина, включая, например, клетки дрожжей, высших растений, насекомых и млекопитающих. В зависимости от хозяина, используемого в процедуре рекомбинантного получения, антитело или экранированное антитело по данному изобретению может быть гликозилированным или негликозилированным, при этом предпочтительным является гликозилированное. Такие способы описаны во многих стандартных лабораторных руководствах, таких как Sambrook, цитировано выше; Ausubel, цитировано выше, Colligan, *Protein Science*, цитировано выше.

Молекулы нуклеиновых кислот.

Молекулы нуклеиновой кислоты по данному изобретению могут быть в форме РНК, такой как мРНК, гяРНК, тРНК или в любой другой форме, или в форме ДНК, включая, но не ограничиваясь этим, кДНК и геномную ДНК, полученные путем клонирования или синтетически продуцированные, или любые их комбинации. ДНК может быть трехцепочечной, двухцепочечной или одноцепочечной или любой их комбинацией. Любая часть, по меньшей мере, одной цепи ДНК или РНК может представлять собой кодирующую цепь, также известную как смысловая цепь, или это может представлять собой не кодирующую цепь, также называемую антисмысловой цепью.

Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты по данному изобретению могут включать молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие открытую рамку считывания (ORF), необязательно с одним или более нитронами, например, но не ограничиваясь этим, по меньшей мере, одной указанной частью, по меньшей мере, одной CDR, такой как CDR1, CDR2 и/или CDR3, по меньшей мере, одной тяжелой цепи или легкой цепи; молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие кодирующую последовательность антитела против CD47 или экранированного антитела, или вариабельной области антитела против CD47 или экранированного антитела; и молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеотидную последовательность, существенно отличающуюся от описанной выше, но которая, вследствие вырожденности генетического кода, все еще кодируют, по меньшей мере, одно антитело против CD47 или экранированное антитело, как описано в данном документе и/или как известно в данной области техники. Учитывая, что генетический код хорошо известен в данной области техники, для специалиста в данной области техники является обычным генерировать такие вырожденные варианты нуклеиновых кислот, которые кодируют специфические антитела против CD47 или экранированные антитела по данному изобретению.

Как указано в данном документе, молекулы нуклеиновой кислоты по данному изобретению, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу антитела против CD47, могут включать, но не ограничиваясь этим, последовательности, непосредственно кодирующие аминокислотную последовательность фрагмента антитела; кодирующую последовательность всего антитела или его части; кодирующую последовательность антитела, фрагмента или части, а также дополнительные последовательности, такие как последовательности одного или обоих экранирующих агентов (например, суперспирального экранирующего агента) и/или последовательности расщепления ММП, или такую как кодирующую последовательность, по меньшей мере, одного лидерного сигнального пептида или пептида слияния с или без вышеупомянутых дополнительных кодирующих последовательностей, таких как, по меньшей мере, один интрон, вместе с дополнительными не кодирующими последовательностями, включая, но не ограничиваясь этим, не кодирующие 5' и 3' последовательности, такие как транскрибированные нетранслируемые последовательности, которые играют роль в транскрипции, процессинге мРНК, включая сигналы сплайсинга и полиаденилирования (например, связывание рибосом и стабильность мРНК); дополнительную кодирующую последовательность, которая кодирует дополнительные аминокислоты, такие как те, которые обеспечивают дополнительные функциональные возможности. В некоторых вариантах реализации данного изобретения последовательность, кодирующая антитело, может быть слита с маркерной последовательностью, такой как последовательность, кодирующая пептид, который облегчает очистку слитого антитела, содержащего фрагмент или часть антитела.

Конструирование нуклеиновых кислот.

Выделенные нуклеиновые кислоты по данному изобретению могут быть получены с использованием (а) рекомбинантных способов, (b) способов синтеза, (с) способов очистки или их комбинаций, хорошо известных в данной области техники. Нуклеиновые кислоты могут легко содержать последовательности в дополнение к полинуклеотиду по данному изобретению. Например, сайт множественного клонирования, содержащий один или более сайтов рестрикции эндонуклеазы, может быть вставлен в нуклеиновую кислоту для помощи в выделении полинуклеотида. Кроме того, транслируемые последовательности могут быть вставлены для помощи в выделении транслируемого полинуклеотида по данному изобретению.

Например, последовательность гекса-гистидинового маркера обеспечивает удобный способ для очистки белков по данному изобретению. Нуклеиновая кислота по данному изобретению-исключая кодирующую последовательность-необязательно является вектором, адаптером или линкером для клонирования и/или экспрессии полинуклеотида по данному изобретению. Дополнительные последовательности могут быть добавлены к таким последовательностям клонирования и/или экспрессии для оптимизации их функции при клонировании и/или экспрессии, для помощи в выделении полинуклеотида или для улучшения введения полинуклеотида в клетку. Использование векторов клонирования, векторов экспрессии, адаптеров и линкеров хорошо известно в данной области техники. (См., например, Ausubel, цитировано выше; или Sambrook, цитировано выше.)

Выделенные композиции нуклеиновых кислот по данному изобретению, такие как РНК, кДНК, геномная ДНК или любая их комбинация, могут быть получены из биологических источников с использованием любого количества технологий клонирования, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах реализации данного изобретения олигонуклеотидные зонды, которые селективно гибридизуются в строгих условиях с полинуклеотидами по данному изобретению, используются для идентификации желаемой последовательности в библиотеке кДНК или геномной ДНК. Выделение РНК и конструирование кДНК и геномных библиотек хорошо известны специалистам в данной области техники. (См., например, Ausubel, цитировано выше; или Sambrook, цитировано выше.)

III. Терапевтические применения

Изобретение обеспечивает способы лечения нарушений, связанных с клетками, которые экспрессируют CD47, например онкологических заболеваний. Клетки могут экспрессировать или не экспрессировать повышенные уровни CD47 относительно клеток, которые не связаны с интересующим нарушением. В результате изобретение обеспечивает способ лечения субъекта, например субъекта с онкологическим заболеванием, с использованием антител против CD47 или экранированных антител, описанных в данном документе. Способ включает введение эффективного количества антитела против CD47 или экранированного антитела или композиции, содержащей антитело против CD47 или экранированное антитело, субъекту, нуждающемуся в этом.

Используемые в контексте данного документа термины "субъект" и "пациент" относятся к организмам, подлежащим лечению способами по данному изобретению. Такие организмы предпочтительно включают, но не ограничиваются ими, млекопитающих (например, мышей, обезьян, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, собак, кошек и тому подобное) и более предпочтительно включают людей. Используемые в контексте данного документа термины "лечение", "терапия" и "воздействие" включают в себя любой эффект, например, уменьшение, восстановление, модуляцию, нормализацию или устранение, который приводит к улучшению состояния, заболевания, нарушения и тому подобному, или ослаблению его симптома, такого как, например, уменьшение количества раковых клеток, уменьшение размера опухоли, уменьшение скорости инфильтрации раковых клеток в периферические органы или снижение скорости метастазирования опухоли или роста опухоли.

Положительные терапевтические эффекты при онкологическом заболевании могут быть измерены несколькими способами (см. WA Weber, J. Null. Med. 50:1S-10S (2009); Eisenhauer et al., цитировано выше). В некоторых предпочтительных вариантах реализации данного изобретения ответ на антитело против CD47 или экранированное антитело оценивают с использованием критерия RECIST 1.1. В некоторых вариантах реализации данного изобретения лечение, достигаемое терапевтически эффективным количеством, представляет собой любое из частичный ответ (ЧО, PR), полный ответ (ПО, CR), выживаемость без прогрессирования заболевания (PFS), выживаемость без признаков заболевания (DFS), объективный ответ (ОО, OR) или общая выживаемость (ОВ, OS).

Описанный в данном документе режим дозирования при терапии, который эффективен для лечения первичного или вторичного рака печени, может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст и вес пациента, а также от способности терапии вызывать противораковый ответ у субъекта. Хотя вариант реализации способа лечения, лекарственные средства и применения по данному изобретению могут быть неэффективными в достижении положительного терапевтического эффекта у каждого субъекта, он должен делать это у статистически значимого числа субъектов, что определяется любым статистическим тестом, известным в данной области техники, таким как t-критерием Стьюдента, критерием хи-квадрат, U критерием Манна-Уитни, критерием Краскела-Уоллиса (Н-критерием), критерием Джонкхиера-Терпстра и критерием Уилкоксона.

Используемый в контексте данного документа "RECIST 1.1 Критерий оценки ответа опухоли", описывает определения, изложенные в Eisenhauer et al., E. A. et al., Eur. J Cancer 45: 228-247 (2009) для целевых или нецелевых поражений, в зависимости от ситуации, в зависимости от контекста, в котором оценивается ответ.

"Опухоль" применительно к субъекту с диагнозом или подозрением на первичный или вторичный рак печени, относится к злокачественному или потенциально злокачественному новообразованию или массе ткани любого размера. Солидная опухоль представляет собой аномальный рост или массу ткани, которая обычно не содержит кист или жидких областей. Различные типы солидных опухолей названы по типу клеток, которые их формируют. Примерами солидных опухолей являются саркомы, карциномы и

лимфомы. Лейкемии (рак крови) обычно не образуют солидных опухолей (Национальный Институт Рака, Словарь Терминов по Онкологии). Неограничивающие иллюстративные саркомы включают саркому мягких тканей и остеосаркому.

"Опухолевая масса", также называемая "опухолевой нагрузкой", относится к общему количеству опухолевой материала, распределенного по всему организму. Опухолевая нагрузка относится к общему количеству раковых клеток или к общему размеру опухоли во всем теле, включая лимфатические узлы и костный мозг. Опухолевая нагрузка может быть определена различными способами, известными в данной области техники, такими как, например, измерение размеров опухоли(ей) при удалении у субъекта, например, с использованием штангенциркуля, или во время нахождения в теле с использованием способов визуализации, например УЗИ, остеосцинтиграфии, компьютерной томография (КТ) или магнитно-резонансной томография (МРТ).

Термин "размер опухоли" относится к общему размеру опухоли, который может включать замеры как длины так и ширины опухоли. Размер опухоли может быть определен различными способами, известными в данной области техники, такими как, например, измерение размеров опухоли(ей) при удалении у субъекта, например, с использованием штангенциркуля, или во время нахождения в теле с использованием способов визуализации, например, остеосцинтиграфии, УЗИ, КТ или МРТ.

Используемый в контексте данного документа термин "эффективное количество" относится к количеству соединения (например, антитела против CD47 или экранированного антитела), достаточному для достижения полезных или желаемых результатов. Эффективное количество может быть введено за одно или более введений, применений или дозировок и не предполагает ограничения конкретным препаратом или путем введения. Как правило, терапевтически эффективное количество активного компонента находится в диапазоне от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг, например, от 1 мг/кг до 100 мг/кг, от 1 мг/кг до 10 мг/кг. Вводимая доза может варьироваться в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические характеристики конкретного агента, а также его способа и пути введения; возраст, здоровье и вес реципиента; тип и степень заболевания или показания к лечению, характер и степень симптомов, вид сопутствующего лечения, частота терапии и желаемый эффект. Начальная доза может быть увеличена за пределы верхнего уровня, чтобы быстро достичь желаемого уровня в крови или уровня в ткани. Альтернативно, начальная доза может быть меньше оптимальной, и суточная доза может постепенно увеличиваться в течение курса терапии. Дозировка для человека может быть оптимизирована, например, в обычном исследовании повышения дозы в Фазе I, рассчитанном на дозу от 0,5 до 20 мг/кг. Частота дозирования может варьироваться в зависимости от таких факторов, как путь введения, дозировка, период полувыведения антитела из сыворотки и заболевание, которое лечат. Иллюстративные частоты дозирования составляют один раз в день, один раз в неделю и один раз каждые две недели. Состав лекарств на основе моноклональных антител известен специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах реализации данного изобретения моноклональное антитело лиофилизируют и затем восстанавливают в буферном солевом растворе во время введения.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения, данное изобретение относится к способу лечения онкологического заболевания в клетке, ткани, органе, животном или пациенте. В конкретных вариантах реализации данного изобретения, данное изобретение относится к способу лечения солидного рака у человека. Типовыми онкологическими заболеваниями являются те, которые характеризуются экспрессией CD47 в клетке, относящейся к раковой (то есть "онкологическое заболевание, характеризующееся экспрессией CD47"). Примеры онкологических заболеваний включают, но не ограничиваются ими, солидные опухоли, опухоли мягких тканей, гематопозитические опухоли, которые вызывают солидные опухоли, и метастатические поражения. Примеры гематопозитических опухолей, которые могут привести к образованию солидных опухолей, включают, но не ограничиваются ими, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), фолликулярную лимфому, миелодиспластический синдром (MDS), лимфому, болезнь Ходжкина, злокачественную лимфому неходжкинскую лимфому, лимфому Беркитта, множественную миелому, синдром Рихтера (трансформацию Рихтера) и тому подобное. Примеры солидных опухолей включают, но не ограничиваются ими, злокачественные новообразования, например саркомы (включая саркому мягких тканей и остеосаркому), аденокарциномы и карциномы различных систем органов, например головы и шеи (включая глотку), щитовидной железы, легкого (мелкоклеточный или немелкоклеточный рак легкого (NSCLC)), молочной железы, лимфоидных тканей, желудочно-кишечного тракта (например, ротовой полости, пищевода, желудка, печени, поджелудочной железы, тонкого кишечника, толстого кишечника и прямой кишки, анального канала), половых органов и мочеполового тракта (например, почки, уретера, мочевого пузыря, яичника, матки, цервикального отдела, эндометрия, простаты, яичка), центральной нервной системы (например, поражающие нервные или глиальные клетки, например, нейробластома или глиому), кожи (например, меланому) и тому подобное. В некоторых вариантах реализации данного изобретения солидная опухоль представляет собой положительную по отношению к NMDA-рецептору терапию. В других вариантах реализации данного изобретения онкологическое заболевание выбрано из рака молочной железы, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы (например, нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы (PNET) или аденокарциномы протоков поджелудочной железы (PDAC)), рака желудка, рака матки и рака яичников.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения онкологическое заболевание выбрано из, но не ограничивается этим, лейкозов, таких как острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический миелогенный лейкоз (CML), лейкоз ворсистых клеток (HCL), Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (T-PLL), лейкоз из больших зернистых лимфоцитов, Т-клеточный лейкоз взрослых и острый моноцитарный лейкоз (AMoL).

В одном варианте реализации данного изобретения онкологическое заболевание представляет собой солидную опухоль, которая связана с асцитом. Асцит является симптомом многих видов онкологических заболеваний и также может быть вызван рядом состояний, таких как прогрессирующее заболевание печени. Типы онкологических заболеваний, которые могут вызывать асцит, включают, но не ограничиваются ими, рак молочной железы, легкого, толстого кишечника (толстой кишки), желудка, поджелудочной железы, яичника, матки (эндометрия), брюшной полости и тому подобное. В некоторых вариантах реализации данного изобретения солидная опухоль, связанная с асцитом, выбрана из рака молочной железы, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака матки и рака яичника. В некоторых вариантах реализации данного изобретения онкологическое заболевание связано с плевральными выпотами, например, раком легкого.

Дополнительные гематологические онкологические заболевания, которые вызывают солидные опухоли, включают, но не ограничиваются ими, неходжкинскую лимфому (например, диффузную В-крупноклеточную лимфому, мантийноклеточную лимфому, В-лимфобластную лимфому, периферическую Т-клеточную лимфому и лимфому Беркитта); В-клеточный хронический лимфолейкоз/мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому; лимфоплазмоцитарную лимфому; В-клеточную лимфому маргинальной зоны селезенки ($\pm$ ворсинчатые лимфоциты); плазмноклеточную миелому/плазмоцитому; экстранодальную В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны типа MALT; узловую В-клеточную лимфому из клеток краевой зоны ($\pm$ моноцитоподобные В-клетки); фолликулярную лимфому; диффузную В-крупноклеточную лимфому; лимфому Беркитта; Т-лимфобластную лимфому из клеток-предшественников; Т-клеточную лимфому взрослых (HTLV 1-положительную); экстранодальную NK/Т-клеточную лимфому назального типа; Т-клеточную лимфому энтеропатического типа; гепатоспленную γ - δ Т-клеточную лимфому; подкожную панникулитоподобную Т-клеточную лимфому; фунгоидный микоз/синдром Сезари; первичную кожную анапластическую крупноклеточную лимфому с Т/0-клетками; первичную системную анапластическую крупноклеточную лимфому с Т/0-клетками; периферическую Т-клеточную лимфому, неутонченную; ангиоиммуннобластную Т-клеточную лимфому, множественную миелому, истинную полицитемию или миелофиброз, кожную Т-клеточную лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), лимфому маргинальной зоны, лимфому ЦНС, иммунобластную крупноклеточную лимфому, В-лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников и тому подобное.

В конкретных вариантах реализации данного изобретения онкологическое заболевание представляет собой саркому, колоректальный рак, рак головы и шеи, рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак желудка, меланому и/или рак молочной железы.

Антитела против CD47 и экранированные антитела, как описано в данном документе, также можно использовать для лечения нарушений, связанных с онкологическим заболеванием, например, энцефалопатии, вызванной онкологическим заболеванием.

Способы и композиции по данному изобретению можно использовать в сочетании с другими терапевтическими агентами и/или способами. Под термином "в комбинации", используемым в контексте данного документа, подразумевается, что две (или более) различных терапии предоставляются субъекту в течение болезни субъекта заболеванием, так что эффекты терапий пациента перекрываются в определенный момент времени. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предоставление одной терапии все еще происходит, когда начинается предоставление второй, так что существует с точки зрения введения препаратов есть наложение. Это иногда упоминается в данном документе как "одновременная" или "совместная доставка препарата". В других вариантах реализации данного изобретения предоставление одной терапии заканчивается до начала предоставления другой терапии. В некоторых вариантах реализации того или другого случая терапия является более эффективной из-за комбинированного введения. Например, вторая терапия является более эффективной, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшем количестве второй терапии, или вторая терапия уменьшает симптомы в большей степени, чем это было бы, если бы вторая терапия проводилось в отсутствие первой терапии, или аналогичная ситуация наблюдается с первой терапией. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предоставление терапии является таким, что уменьшение симптома или другого параметра, связанного с нарушением, больше, чем то, которое наблюдалось бы при одной терапии, предоставленной в отсутствие другой. Эффект двух терапий может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или большим, чем аддитивный (то есть синергетический ответ). Предоставление терапии может быть таким, что эффект от первой предоставленной терапии все еще можно обнаружить, когда предоставлена вторая терапия.

В одном варианте реализации данного изобретения способы по данному изобретению включают введение субъекту антитела против CD47 или экранированного антитела, как описано в данном докумен-

те, например, композиции или препараты, в сочетании с одной или более дополнительными терапиями, например хирургическим вмешательством, лучевой терапией или введением другого терапевтического препарата. В одном варианте реализации данного изобретения дополнительная терапия может включать химиотерапию, например цитотоксический агент. В одном варианте реализации данного изобретения дополнительная терапия может включать направленную терапию, например ингибитор тирозинкиназы, ингибитор протеасомы или ингибитор протеазы. В одном варианте реализации данного изобретения дополнительная терапия может включать противовоспалительное, антиангиогенное, антифиброзное или антипролиферативное соединение, например стероид, иммуномодулятор биологического действия, такой как ингибитор молекул иммунных контрольных точек, моноклональное антитело, фрагмент антитела, аптамер, мРНК, нечувствительную молекулу, белок слияния, цитокин, рецептор цитокина, бронходилататор, статин, противовоспалительный агент (например, метотрексат) или NSAID. В другом варианте реализации данного изобретения дополнительная терапия может включать комбинирование лекарственных препаратов разных классов. Препараты антитела против CD47 или экранированного антитела и дополнительные терапии могут вводиться одновременно или последовательно.

"Молекула иммунной контрольной точки", как используется в контексте данного документа, относится к молекуле в иммунной системе, которая либо усиливает сигнал (стимулирующая молекула), либо понижает сигнал (ингибирующая молекула). Многие виды онкологических заболеваний избегают иммунной системы, подавляя передачу сигналов Т-клеток.

Иллюстративные молекулы иммунной контрольной точки включают, но не ограничиваются этим, белок запрограммированной смерти клетки 1 (PD-1), лиганд запрограммированной смерти клетки 1 (PD-L1), PD-L2, цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4 (CTLA-4), белок 3, содержащий домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), ген активации лимфоцитов 3 (LAG-3), карциномэмбриональную антигензависимую молекулу клеточной адгезии 1 (CEACAM-1), CEACAM-5, V-доменный иммуноглобулиновый супрессор активации Т-клеток (VISTA), В- и Т-лимфоцитарный аттенуатор (BTLA), Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT), иммуноглобулиноподобный рецептор, ассоциированный с лейкоцитами (типа 1) (LAIR1), CD160, TGF α , A2-рецептор аденозина (A2AR), B7-H3 (также известный как CD276), B7-H4 (также называемый VTCN1), индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), 2B4, иммуноглобулиноподобный рецептор естественных киллеров (KIR) и тому подобное.

Используемый в контексте данного документа термин "ингибитор иммунной контрольной точки" относится к молекуле (например, малой молекуле, моноклональному антителу, фрагменту антитела и т.д.), которая ингибирует и/или блокирует одну или более ингибирующих молекул контрольной точки.

Иллюстративные ингибиторы иммунной контрольной точки включают, но не ограничиваются ими, следующие моноклональные антитела: Ингибиторы PD-1, такие как пембролизумаб (Keytruda, Merck) и ниволумаб (Opdivo, Bristol-Myers Squibb); ингибиторы PD-L1, такие как атезолизумаб (Tecentriq, Genentech), авелумаб (Bavencio, Pfizer), дурвалумаб (Imfinzi, AstraZeneca); и ингибиторы CTLA-1, такие как ипилимумаб (Yervoy, Bristol-Myers Squibb).

Иллюстративные цитотоксические агенты включают антимиелотуберкулезные агенты, ингибиторы топоизомеразы, антиметаболиты, ингибиторы синтеза и деградации белка, митотические ингибиторы, алкилирующие агенты, платинирующие агенты, ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот, ингибиторы гистондеацетилазы (ингибиторы HDAC, например, воринокат (SAHA, MK0683), энтинокат (MS-275), панобинокат (LBH589), трихостатин А (TSA), моцетинокат (MGCD0103), белинокат (PXD101), ромидеписин (FK228, депсипептид)), ингибиторы ДНК-метилтрансферазы, азотистые иприты, нитрозомочевинны, этиленимины, алкилсульфонаты, триазены, аналоги фолата, аналоги нуклеозидов, ингибиторы рибонуклеотидредуктазы, алкалоиды барвинка, таксаны, эпотилоны, интеркалирующие агенты, агенты, способные вмешиваться в путь трансдукции сигналов, агенты, способствующие апоптозу и облучению, или конъюгаты молекул антител, которые связывают поверхностные белки для доставки токсичного агента. В одном варианте осуществления цитотоксический агент, который можно вводить с препаратом, описанным в данном документе, представляет собой агент на основе платины (такой как цисплатин), циклофосфамид, дакарбазин, метотрексат, фторурацил, гемцитабин, капецитабин, гидроксимочевину, топотекан, иринотекан, азацитидин, азацитидин, иксабепилон, бортезомиб, таксаны (например, паклитаксел или доцетаксел), цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, винорелбин, колхицин, антрациклины (например, доксорубицин или эпирубицин) даунорубицин, дигидрокси антрацин дион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, адриамицин, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пурамицин, ригин или майтанзиноиды.

Способы и композиции по данному изобретению могут быть использованы при лечении субъектов с CD47-положительным онкологическим заболеванием. В одном варианте реализации данного изобретения CD47-положительное онкологическое заболевание, характеризуется экспрессией одной или более матричных металлопротеиназ (ММП). Иллюстративные ММП включают, но не ограничиваются ими, ММП1-ММП28. В частности, иллюстративные ММП включают ММП2 и ММП9. В одном варианте изобретения CD47-положительное онкологическое заболевание представляет собой опухоль, в которой при-

сутствуют инфильтрирующие макрофаги.

Способы и композиции по данному изобретению могут быть использованы при лечении субъектов с CD47-положительным онкологическим заболеванием, которое характеризуется экспрессией одной или более ММП и содержит инфильтрирующие макрофаги.

Способы определения наличия CD47-положительных онкологических образований, экспрессии ММП и наличия макрофагов, инфильтрирующих опухоль, известны в данной области техники.

Оценка CD47-положительных онкологических заболеваний у субъекта может быть определена обычными способами, которые включают иммуногистохимию (ИГХ), вестерн-блоттинг, проточную цитометрию или способы сиквенирования РНК. С помощью ИГХ, вестерн-блоттинга и проточной цитометрии можно анализировать любые антитела против CD47, известные в данной области техники, а также антитела против CD47, описанные в данном документе.

Оценка инфильтрации макрофагов в тканях может проводиться путем мониторинга поверхностных маркеров макрофагов, включая F4/80 для макрофагов мыши или CD163, CD68 или CD11b, с помощью традиционных способов, которые включают иммуногистохимию (игх), вестерн-блотТИНГ, проточную цитометрию или способы сиквенирования РНК.

Оценка протеаз в тканях может контролироваться с использованием различных способов, включая как те, которые контролируют активность протеазы, так и те, которые могут обнаруживать протеолитическую активность. Обычные способы, которые могут обнаружить присутствие протеаз в ткани, которые могут включать как неактивные, так и активные формы протеазы, включают ИГХ, сиквенирование РНК, вестерн-блоттинг или способы на основе ИФА. Дополнительные способы могут быть использованы для обнаружения активности протеазы в тканях, которая включает зимографию, зимографию *in situ* с использованием флуоресцентной микроскопии или использование флуоресцентных протеолитических субстратов. Кроме того, использование флуоресцентных протеолитических субстратов может сочетаться с иммуно-захватом специфических протеаз. Кроме того, антитела, направленные против активного сайта протеазы, можно использовать различными способами, включая ИГХ, флуоресцентную микроскопию, вестерн-блоттинг, ИФА или проточную цитометрию (см. Sela-Passwell et al. *Nature Medicine*. 18:143-147. 2012; LeBeau et al. *Cancer Research*. 75:1225-1235. 2015; Sun et al. *Biochemistry*. 42:892-900. 2003; Shiryaev et al. 2:e80. 2013.)

Во всем описании, где композиции и наборы описанные как имеющие, включающие или содержащие конкретные компоненты, или где процессы и способы описанные как имеющие, включающие или содержащие конкретные этапы, предполагается, что, кроме того, существуют композиции и наборы по данному изобретению, которые по существу состоят или состоят из перечисленных компонентов, и что существуют процессы и способы по данному изобретению, которые состоят по существу или состоят из перечисленных этапов процессов и способов.

IV. Фармацевтические композиции и препараты

Для терапевтического применения антитело против CD47 или экранированное антитело предпочтительно комбинируют с фармацевтически приемлемым носителем. Используемый в контексте данного документа термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает буферы, носители и наполнители, подходящие для использования в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергического ответа или других проблем или осложнений, соразмерных с разумным соотношением выгоды и риска. Носитель(и) должен быть "приемлемым" в том смысле, что он совместим с другими компонентами препаратов и не является вредным для реципиента. Фармацевтически приемлемые носители включают буферы, растворители, дисперсионные среды, покрытия, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты и тому подобное, которые совместимы с фармацевтическим введением. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники.

Соответственно, композиции антител против CD47 или экранированных антител по данному изобретению могут содержать, по меньшей мере, один из любых подходящих наполнителей, таких как, но не ограничиваясь ими, дилуэнт, связывающее вещество, стабилизатор, буферы, соли, липофильные растворители, консервант, адъювант или тому подобное. Фармацевтически приемлемые эксципиенты являются предпочтительными. Неограничивающие примеры и способы приготовления таких стерильных растворов хорошо известны в данной области техники, например, но не ограничиваясь этим, описанные в Gennaro, Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, Pa.) 1990. Фармацевтически приемлемые носители могут быть обычно выбраны из тех, которые являются подходящими для способа введения, растворимости и/или стабильности молекулы антитела, фрагмента или варианта композиции, которые хорошо известны в данной области техники или описаны в данном документе.

Фармацевтические эксципиенты и добавки, используемые в данной композиции, включают, но не ограничиваются ими, белки, пептиды, аминокислоты, липиды и углеводы (например, сахара, включая моносахариды, ди-, три-, тетра- и олигосахариды; дериватизированные сахара, такие как альдиты, альдоновые кислоты, этерифицированные сахара и тому подобное и полисахариды или сахарные полимеры), которые могут присутствовать по отдельности или в комбинации, содержащей один или в комбинации 1-

99,99% по массе или объему. Иллюстративные белковые эксципиенты включают сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин (HSA), рекомбинантный человеческий альбумин (гНА), желатин, казеин и тому подобное. Иллюстративные компоненты молекулы аминокислота/антитело, которые также могут функционировать в буферной емкости, включают аланин, глицин, аргинин, бетаин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, цистеин, лизин, лейцин, изолейцин, валин, метионин, фенилаланин, аспартам и тому подобное.

Углеводные эксципиенты, подходящие для использования в изобретении, включают, например, моносахариды, такие как фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-манноза, сорбоза и тому подобное; дисахариды, такие как лактоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза и тому подобное; полисахариды, такие как рафиноза, мелезитоза, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и тому подобное; и альдиты, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактит, ксилит, сорбит (глюцит), миоинозит и тому подобное. Предпочтительными углеводными эксципиентами для использования в данном изобретении являются маннит, трегалоза и рафиноза.

Композиции молекул антител также могут включать буфер или агент, регулирующий pH; обычно буфер представляет собой соль, полученную из органической кислоты или основания. Иллюстративные буферы включают соли органических кислот, такие как соли лимонной кислоты, уксусной кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой кислоты, углекислоты, виноградной кислоты, янтарной кислоты или фталевой кислоты; Трис, трометамин гидрохлорид или фосфатные буферы.

Кроме того, композиции молекул антител по данному изобретению могут включать полимерные эксципиенты/добавки, такие как поливинилпирролидоны, фикоиллы (полимерный сахар), декраты (например, циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин), полиэтиленгликоли, ароматизаторы, антимикробные агенты, подсластители, антиоксиданты, антистатики, поверхностно-активные вещества (например, полисорбаты, такие как "Твин 20" и "Твин 80"), липиды (например, фосфолипиды, жирные кислоты), стероиды (например, холестерин) и хелатирующие агенты (например, EDTA).

Эти и дополнительные известные фармацевтические эксципиенты и/или добавки, подходящие для использования в композициях молекул антител по данному изобретению, известны в данной области техники, например, как указано в "Remington: The Science & Practice of Pharmacy," 19th ed., Williams & Williams, (1995), и в "Physician's Desk Reference," 52nd ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998). Предпочтительными носителями или эксципиентами являются карбогидраты (например, сахараиды и альдиты) и буферы (например, цитратный) или полимерные агенты.

Данное изобретение относится к стабильным композициям, содержащим, по меньшей мере одну, молекулу антитела против CD47 в фармацевтически приемлемой композиции. Консервированные препараты содержат, по меньшей мере, один известный консервант или он необязательно выбран из, по меньшей мере, одного фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, фенилртути нитрита, феноксиэтанола, формальдегида, хлорбутанола, хлорида магния (например, гексагидрата) алкилпарабена (метил, этил, пропил, бутил и тому подобное), бензалкония хлорида, бензетония хлорида, дегидроацетата натрия и тимеросала или их смеси в водном дилуэнте. Любая подходящая концентрация или смесь может использоваться, как известно в данной области техники, например, 0,001-5%, или любым диапазоне или значении в нем, например, но не ограничиваясь этим, 0,001, 0,003, 0,005, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или любым диапазоне или значении в нем. Неограничивающие примеры включают, без консерванта, 0,1-2% м-крезола (например, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9 или 1,0%), 0,1-3% бензилового спирта (например, 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0 или 2,5%), 0,001-0,5% тимеросала (например, 0,005 или 0,01%), 0,001-2,0% фенола (например, 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9 или 1,0%), 0,0005- 1,0% алкилпарабена(ов) (например, 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9 или 1,0%), и тому подобное.

Фармацевтические композиции, содержащие антитело против CD47 или экранированное антитело, как описано в данном документе, могут быть представлены в единичной дозированной форме и могут быть получены любым подходящим способом. Фармацевтическая композиция должна быть составлена так, чтобы она была совместима с предполагаемым путем введения. Примерами путей введения являются внутривенное (в/в), внутрикожное, ингаляционное, трансдермальное, местное, трансмукозальное и ректальное введение. Предпочтительным путем введения моноклональных антител является в/в инфузия. Полезные препараты могут быть получены способами, известными в области фармацевтики. Например, см. Remington's Pharmaceutical Sciences (1990), цитировано выше. Компоненты композиции, подходящие для парентерального введения, включают стерильный дилуэнт, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; буферы, такие как ацетатный, цитратный или фосфатный; и агенты для регулирования тонуса, такие как хлорид натрия или декстроза.

Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор,

бактериостатическую воду, Кремофор EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Носитель должен быть стабильным в условиях изготовления и хранения и должен быть защищен от микроорганизмов. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

Фармацевтические препараты предпочтительно являются стерильными. Стерилизация может быть осуществлена любым подходящим способом, например фильтрацией через стерильные фильтрующие мембраны. Если композиция лиофилизирована, стерилизацию на фильтре можно проводить до или после лиофилизации и восстановления.

Композиции по данному изобретению могут иметь различные формы. Они включают, например, жидкие, полутвердые и твердые дозированные лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии и липосомы. Предпочтительная лекарственная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Типичные предпочтительные композиции находятся в форме растворов для инъекций или инфузий. Предпочтительным способом введения является парентеральный (например, внутривенный, подкожный, внутриглазной, внутрибрюшинный, внутримышечный). В предпочтительном варианте реализации данного изобретения препарат вводят с помощью внутривенной инфузий или инъекции. В предпочтительном варианте реализации данного изобретения препарат вводят с помощью внутривенной инфузий или инъекции.

Фразы "парентеральное введение" и "вводить парентерально", используемые в контексте данного документа, означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, но не ограничиваясь ими, внутривенную, внутримышечную, подкожную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, интраорбитальную, интравитреальную, интракардиальную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, ингаляционную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию.

В данном изобретении предлагается набор, содержащий упаковочный материал и, по меньшей мере, один флакон, содержащий раствор, по меньшей мере, одного антитела против CD47 или экранированного антитела с предусмотренными буферами и/или консервантами, необязательно в водном дилуенте. Водный дилуент необязательно дополнительно содержит фармацевтически приемлемый консервант. Консерванты включают те, которые выбраны из фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, алкилпарабена (метил, этил, пропил, бутил и тому подобное), бензалкония хлорида, бензетония хлорида, дегидроацетата натрия и тимеросала или их смеси. Концентрация консерванта, используемого в препарате, является концентрацией, достаточной для получения антимикробного эффекта. Такие концентрации зависят от выбранного консерванта и легко определяются специалистом в данной области техники.

Другие эксципиенты, например изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, усилители консервантов, могут быть необязательно и предпочтительно добавлены в дилуент. Изотонический агент, такой как глицерин, обычно используется в известных концентрациях. Физиологически переносимый буфер предпочтительно добавляют для улучшения контроля pH. Препараты могут охватывать широкий диапазон pH, например, от около 4,0 до около 10,0, от около 5,0 до около 9,0 или от около 6,0 до около 8,0.

Другие добавки, такие как фармацевтически приемлемые солюбилизаторы, такие как Твин 20 (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат), Твин 40 (полиоксиэтилен (20) сорбитан монопальмитат), Твин 80 (полиоксиэтилен (20) сорбитан моноолеат), Плурионик F68 (блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена) и ПЭГ (полиэтиленгликоль) или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20 или 80 или полоскамер 184 или 188, полилы Pluronic®, другие блок-сополимеры и хелаторы, такие как ЭДТА и ЭГТК, могут быть необязательно добавлены к препаратам или композициям для уменьшения агрегации. Эти добавки особенно полезны, если для введения препарата используется помпа или пластиковая емкость. Наличие фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества снижает склонность белка к агрегации.

Различные системы доставки могут быть использованы для введения антител против CD47 или экранированных антител субъекту. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения введение антитела против CD47 или экранированного антитела осуществляется с помощью внутривенной инфузии. В некоторых вариантах реализации данного изобретения введение представляет собой двухчасовую внутривенную инфузию.

Любое из препаратов, описанных выше, может храниться в жидкой или замороженной форме и может быть необязательно подвергнуто процессу консервации. В некоторых вариантах реализации данного изобретения препараты, описанные выше, являются лиофилизированными, то есть они подвергаются лиофилизации. В некоторых вариантах реализации данного изобретения препараты, описанные выше, подвергают процессу консервации, например лиофилизации, и затем восстанавливают подходящей жидкостью, например водой. Под лиофилизацией подразумевается, что композиция была лиофилизирована в

вакууме. Лиофилизация обычно достигается путем замораживания конкретного препарата, так что растворенные вещества отделяются от растворителя(ей). Затем растворитель удаляют сублимацией (т.е. первичной сушкой), а затем десорбцией (то есть вторичной сушкой).

Препараты по данному изобретению могут быть использованы со способами, описанными в данном документе, или с другими способами лечения заболевания. Препараты антител против CD47 или экранированных антител могут быть дополнительно разбавлены перед введением субъекту. В некоторых вариантах реализации данного изобретения препараты разбавляют физиологическим раствором и хранят в пакетах или шприцах для внутривенного вливания перед введением субъекту. Соответственно, в некоторых вариантах реализации данного изобретения способы лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, у субъекта будут включать введение субъекту, нуждающемуся в этом, еженедельной дозы фармацевтической композиции, содержащей антитело против CD47 или экранированное антитело.

Специалистам в данной области техники будет очевидно, что другие подходящие модификации и адаптации способов, описанных в данном документе, могут быть выполнены с использованием подходящих эквивалентов без отклонения от объема вариантов реализации данного изобретения, описанных в данном документе. Теперь, подробно описав некоторые варианты реализации данного изобретения, они будут более понятны при ссылке на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения. Все патенты, патентные заявки и ссылки, описанные в данном документе, включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме и для всех целей.

Примеры

Пример 1. Получение антитела.

Были получены гуманизированные варианты мышиного антитела против CD47 B6H12. Последовательности варьируемых доменов антител для генерации ДНК и вектора были синтезированы с использованием нематричной ПЦР. Если коротко, то последовательность виртуального гена преобразуется в последовательности олигонуклеотидов с использованием патентованного программного пакета ATUM. Олигонуклеотиды синтезируются, объединяются и амплифицируются с помощью ПЦР. Полноразмерный ампликон из реакции ПЦР клонируют в вектор с использованием сайта SapI, трансформируют в E.coli и выделяют уникальные колонии. Колонии выращивают в течение ночи в жидкой среде и выделяют плазмидную ДНК, очищают с помощью набора Machery-Nagel Midi Prep Kit) и последовательность проверяют с использованием секвенирования по Сенгеру. Варибельные домены легкой цепи клонируют в вектор Карпа-Нс, а домены тяжелой цепи клонируют в векторы IgG1.01-Fc-Hs. Для экспрессии антител соотношение векторов тяжелой и легкой цепей антитела 1:1 разводят в среде LifeTech OptiMax с реагентом для трансфекции PolyPlus FectoPro. Затем реагент ДНК/трансфекция добавляют к Atum-специфическим клеткам HEK293 в среде LifeTech ExpiExpression и культивируют в течение 5 дней. Культуру собирают центрифугированием и фильтрацией через поры 0,2 мкм. Для очистки IgG обязательно используется MabSelect от GE для очистки антител. Перед элюированием смолу промывают 10CV 1 M NaCl в PBS и 10CV PBS. IgG элюируют с использованием 20 mM Na-цитратного буфера с pH 3,2. Образец заменяется буфером с использованием колонок Zeba от Pierce в PBS. Затем образец стерилизуют на фильтре перед тем, как взять образец для исследования. Исследованием включает концентрацию A280 и электрофорез в восстановленном и невосстановленном состоянии с использованием Agilent P200 Tape Station 2200 на чипах Tapescree p200.

Специфические мутации исходного антитела B6H12 описаны в таблицах 10-13, как изложено ниже.

Таблица 10

Гуманизирующие Мутации в Вариантах Тяжелой Цепи hB6H12

vH Вариант	Последовательность Экзона Акцептора IGHV	Остатки Каркасной Донорной Мышиной Последовательности	Остатки Акцепторной CDR Последовательности Человека
hVH1	IGHV3-23/HJ4	H44, H49, H89, H91, H94	отсутствуют
hVH2	IGHV3-23/HJ4	H49, H91, H94	H31, H33, H60
hVH3	IGHV3-23/HJ4	H49, H82, H91, H94	H31, H33, H60
hVH4	IGHV3-48/HJ4	H49	H31, H60
hVH5	IGHV3-66/HJ4	H29, H49, H82	H60
hVH6	IGHV3-74/HJ4	H49	H31, H58, H60

Таблица 11

Гуманизирующие мутации в вариантах легкой каппа-цепи hB6H12

Вариант vH	Последовательность Экзона Акцептора IGKV	Остатки Каркасной Донорной Мышиной Последовательности	Остатки Акцепторной CDR Последовательности Человека
hvK1	IGKV6-21/KJ2	L4, L21, L85	отсутствуют
hvK2	IGKV6-21/KJ2	L4, L21	отсутствуют
hvK3	IGKV6-21 /KJ2	L4, L21, L69	отсутствуют
hvK4	IGKV1-27 /KJ2	L21, L49, L69	L31, L34, L53, L54, L55

Таблица 12

Специфические мутации мышинных каркасных последовательностей в вариантах тяжелой цепи hB6H12

Вариант	29	44	49	82	89	91	94	% Остатков Человеческой Последовательно сти
hvH1	F	R*	A*	M	I*	F*	R*	87,8
hvH2	F	G	A*	M	V	F*	R*	92,9
hvH3	F	G	A*	I*	V	F*	R*	91,8
hvH4	F	G	A*	M	V	Y	R	92,9
hvH5	F*	G	A*	I*	V	Y	R	89,8
hvH6	F	G	A*	M	V	Y	R	92,9

*Остатки мышинной последовательности

Таблица 13

Специфические мутации мышинных каркасных последовательностей в вариантах легкой каппа-цепи hB6H12

Вариант	4	21	49	69	85	% Остатков Человеческой Последовательности
hvK1	M*	L*	K	T	V*	85,3
hvK2	M*	L*	K	T	T	86,3
hvK3	M*	L*	K	S*	T	85,3
hvK4	M	L*	K*	S*	T	89,5

*Остатки мышинной последовательности.

Пример 2. Гуманизированные антитела против CD47.

Получение антитела.

Антитела экспрессировали посредством временной трансфекции клеток Expi HEK или Expi CHO или стабильной трансфекции CHO-DG44 и очищали с использованием колонок MabSelect SuRe (GE Healthcare). Дополнительная подготавливающая очистка способами эксклюзионной хроматографии с использованием колонок Superdex (GE Healthcare) была проведена для экранированных антител, которые были менее чем на 90% мономерными.

Исследование насыщения связывания с использованием проточной цитометрии и ИФА.

Гуманизированные антитела против CD47 B6H12 с различными последовательностями тяжелой и легкой цепей оценивали по их аффинности связывания с CD47 человека либо с помощью насыщающего ИФА, либо с помощью клеточного анализа FACS, а также рассчитывали EC50 или Kd. Только антитела,

состоящие из последовательности тяжелой цепи 1 (hVH1) (группа А; антитела 1-4) или последовательности тяжелой цепи 5 (hVH5) (группа В, антитела 17-20) были способны связываться с CD47. Антитела из этих групп связаны с аналогичной аффинностью с Kd (фиг. 2А) и EC₅₀ (фиг. 2В) как у мышиного антитела mB6H12 и альтернативного гуманизированного антитела Ab47.

Для клеточного анализа FACS раковые клетки лимфомы L450су подвергали воздействию увеличивающимися концентрациями гуманизированных антител B6H12, которые, как было обнаружено, сохраняли связывание с CD47 с определенными значениями Kd. Альтернативные гуманизированные каркасные области сохранили сходное связывание с Kd как у мышиного исходного и альтернативного гуманизированного антитела Ab47 (фиг. 2А).

В дополнение к клеточному связыванию, оценка аффинности гуманизированных антител B6H12 к CD47 была определена с использованием ИФА. Планшеты, покрытые CD47 человека, обрабатывали увеличивающимися концентрациями гуманизированных антител B6H12, которые, как было обнаружено, сохраняли связывание с CD47 с определенными значениями EC₅₀. Альтернативные гуманизированные каркасные области сохранили сходное связывание с Kd как у мышиного исходного и альтернативного гуманизированного антитела Ab47 (фиг. 2В).

В дополнение к оценке связывания EC₅₀ в анализе ИФА также оценивали кинетику связывания. Неожиданно антитела в Группе А (hB6H12.3 и hB6H12.4) показали значительно более высокое значение максимального связывания (BMax), чем исходное антитело, mB6H12, антитела в Группе В (hB6h12.19 и hB6H12.20) или альтернативное гуманизированное антитело Ab47 (фиг. 2С).

Исследование насыщения связывания с использованием проточной цитометрии 2×10^5 указанных клеток (SW780 или эритроцитов человека) комбинировали с серийным разведением указанного антитела в окрашивающем буфере (PBS, 5% FBS, 0,2% NaN₃). Образцы инкубировали в течение 1 ч на льду и дважды промывали охлажденным окрашивающим буфером. Клетки ресуспендировали с антителом против IgG человека AF647 (JacksonImmunoResearch, разведение 1:200 в окрашивающем буфере) в течение 1 ч на льду. Клетки дважды промывали охлажденным окрашивающим буфером и ресуспендировали в окрашивающем буфере. Меченые клетки исследовали с помощью проточной цитометрии на проточном цитометре Invitrogen Attune NxT, предназначенном для исключения нежизнеспособных клеток, и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo 10. Kd рассчитывали с использованием GraphPad Prism 6 с использованием нелинейной регрессии.

Исследование насыщения связывания с использованием ИФА.

Растворимый рекомбинантный человеческий CD47-Fc (R&D Systems) разбавляли до соответствующей концентрации в 50 мМ карбонатном буфере, pH 9,6. В каждую лунку 96-луночного планшета для ИФА Maxisorb добавляли 100 мкл растворимого антигена. Планшет закрывали и хранили при 4°C в течение ночи. Затем планшет промывали 3-5 раз PBS-Т буфером (PBS, pH 7,4+0,05% Твин-20). Лунки блокировали, используя 300 мкл/лунку буфера PBS-Т, содержащего BSA, в течение 1 ч при комнатной температуре, затем 3-5 раз промывали PBS-Т. Разведения антител готовили в блокирующем буфере и добавляли в каждую лунку в объеме 100 мкл. Антитела инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем 3-5 раз промывали PBS-Т. Затем добавляли конъюгированные с HRP вторичные антитела (либо против Fc человека, либо против легкой каппа-цепи человека) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывали 3-5 раз PBS-Т. ИФА был выполнен путем добавления 100 мкл раствора ТМВ и выдерживания в течение 3-15 минут при комнатной температуре. Чтобы остановить реакцию, в каждую лунку добавляли 100 мкл 1 н. серной кислоты. Поглощение при 450 нм определяли с использованием планшет-ридера Spectramax 190 (Molecular Biosciences) и данные наносили на график с использованием GraphPad Prism 6.

B6H12-опосредованный фагоцитоз.

Была проведена функциональная характеристика гуманизированных антител против B6H12, включая фагоцитоз в эритроцитах человека и гемагглютинацию. Эритроциты человека, меченные флуоресцентным красным красителем RKN, опсонизировали в течение 30 мин с увеличением концентрации гуманизированных антител против B6H12 из Групп А и В. Эритроциты промывали и подпитывали в соотношении 10:1 к моноцитарным макрофагам в течение 2 ч. Образцы промывали 3 раза буфером гипотонического лизиса АСК, который позволяет лизировать и удалять непоглощенные эритроциты. Образцы подвергали проточной цитометрии и оценивали фагоцитоз. Антитела из Группы А и В демонстрировали сходную способность опосредовать фагоцитоз эритроцитов человека. Удивительно, что антитело hB6H12.3 из Группы А опосредовало фагоцитоз лучше, чем мышиное исходное антитело и наравне с альтернативным гуманизированным антителом Ab47.

Гуманизированные антитела B6H12 из Групп антител А и В опосредуют фагоцитоз CD47-положительных эритроцитов человека аналогичным образом. hB6H12.3 стимулировал большую фагоцитоз-стимулирующую активность, при 1 мкг/мл по сравнению с мышиным mB6H12 и сходную фагоцитоз-стимулирующую активность по сравнению с Ab47 (фиг. 3А и фиг. 3В).

B6H12-опосредованная гемагглютинация.

Отличительной чертой B6H12 является способность стимулировать гемагглютинацию эритроцитов

человека. Гемагглютинация является примером гомотипического взаимодействия, которое позволяет двум клеткам, экспрессирующим CD47, агрегировать или слипаться при воздействии антителом против CD47. Агглютинирующий каркас поддерживает эритроцитарную массу во взвешенном расположении, которое можно количественно определить визуально с помощью анализа изображения или уровня агрегации, отслеживаемого с помощью проточной цитометрии. Эритроциты человека, суспендированные в PBS и помещенные в 96-луночный круглодонный планшет, подвергались воздействию повышенных концентраций антител против CD47. Через 30 мин при 37°C гемагглютинацию контролировали оптически по изменению плотности эритроцитов и с использованием проточной цитометрии как увеличение клеточной агрегации. Антитела в Группе А, в частности hB6H12.3, показали снижение гемагглютинации по сравнению с исходным антителом mB6H12 и альтернативным гуманизированным антителом Ab47 (фиг. 4А).

Для оценки гемагглютинации проводили стандартный захват изображения и оценивали образование диспергированных неосажденных эритроцитов. Кроме того, планшеты сканировали с использованием анализатора GE In Cell и оценивали диаметр видимого пятна внутри лунки. В целях оценки гемагглютинации в анализе, который поддается для клинического мониторинга, была использована проточная цитометрия, и гемагглютинация была оценена как общее увеличение наблюдаемого параметра SSC/FSC эритроцитов, который является способом мониторинга агрегации. Этот способ был использован для оценки гемагглютинации, вызванной гуманизированными антителами против CD47 hB6H12.3 и Ab47 (фиг. 4А и фиг. 4В).

В6H12-опосредованная активация рецепторов Fcγ.

In vivo моноциты, макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки могут опосредовать АЗКФ через FcγRIIa, FcγRI и FcγRIIIa. Хотя все три рецептора могут участвовать в АЗКФ, считается, что FcγRIIa является преобладающим рецептором Fcγ, вовлеченным в этот процесс. Клетки Jurkat, стабильно трансфицированные человеческим FcγRI или высокоаффинным FcγRIIa-H, связанным с репортерной конструкцией NFAT-люциферазы, подвергали воздействию клеток WIL2S, покрытых увеличивающимися концентрациями, либо мышиных B6H12, Ab47, либо hB6H12.3. Активацию FcγR контролировали по продуцированию люциферазы. Результаты представлены на фиг. 5А и 5В. Клетки, покрытые как Ab47, так и hB6H12.3, дозозависимо активировали рецептор FcγRI, однако только hB6H12.3 был способен управлять активацией FcγRIIa-H, рецептора, который наиболее тесно связан с непосредственным опосредованием активности АЗКФ.

Опосредованную антителами активацию рецепторов Fcγ, вовлеченных в антитело-зависимый клеточный фагоцитоз, оценивали с использованием сконструированных клеток Jurkat, стабильно экспрессирующих FcγRI или FcγRIIa-H (высокоаффинный вариант H131), и элемента ответа NFAT, управляющего экспрессией люциферазы светлячка в качестве эффекторных клеток. Биологическую активность антител определяли количественно через люциферазу, продуцируемую в результате активации пути NFAT; активность люциферазы в эффекторных клетках количественно определяли по показаниям люминесценции (фиг. 5А и 5В).

Опосредованная NK-клетками активность АЗКЦ.

Была исследована опосредованная NK-клетками антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ) и активация FcγRIIIa mB6H12, Ab47 и hB6H12.3. Меченные хромом клетки Wils-2, покрытые увеличивающимися концентрациями антител, подвергали воздействию первичных естественных киллеров (NK-клеток) в течение 4 ч и оценивали специфический лизис по высвобождению радиоактивного хрома в среду культуры ткани. Альтернативно, клетки Wils-2, покрытые увеличивающейся концентрацией mB6H12, Ab47 или hB6H12.3, подвергали воздействию клеток Jurkat, стабильно экспрессирующих V/V-вариант с высокой аффинностью FcγRIIIa, и активацию рецептора оценивали как активность люциферазы, управляемую NFAT. hB6H12.3 продемонстрировал более высокую активацию АЗКЦ и FcγRIIIa по сравнению как с Ab47, так и с мышиным исходным антителом B6H12. Результаты представлены на фиг. 6А и 6В. Каркас IgG1 hB6H12.3 опосредует активность АЗКЦ и управляет передачей сигналов FcγRIII, функциональность которого отсутствует у современных клинических антител IgG4.

Для проведения анализа АЗКЦ очищенные человеческие NK-клетки, негативно отобранные из Astarte Biologies, оттаивали и ресуспендировали в RPMI/1% FBS в концентрации $7,2 \times 10^5$ CD16+клетки/мл (так, чтобы 70 мкл содержали приблизительно 5×10^4 эффекторных клеток). 5×10^6 клеток-мишеней (клеток WIL2S) собирали, центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл FBS. К клеткам добавляли 100 мкл (приблизительно 100 мкКи) Cr-51 и осторожно перемешивали. Клетки помещали в CO₂-инкубатор с системой увлажнения при 37°C для нанесения метки на 1 час. Клетки время от времени встряхивали, чтобы держать в подвешенном состоянии. Клетки трижды промывали RPMI/1% FBS, соблюдая осторожность, чтобы удалить радиоактивный супернатант в соответствующую емкость для отходов. Затем клетки ресуспендировали в 10 мл RPMI/1% FBS и подсчитывали. $7,2 \times 10^5$ клеток удаляли и суспендировали в общем объеме аналитической среды 10 мл, так что 70 мкл было эквивалентно приблизительно 5×10^3 клеткам-мишеням.

Для разведения антител и сборки планшета антитела разводили в среде для анализа (Prep @ 3X). Антитела добавляли в планшет непосредственно перед добавлением Ст-меченных клеток-мишеней. Для контроля лунок вместо антител добавляли 70 мкл и 140 мкл среды для анализа. Эти лунки представляют собой контроль общего и экспериментального высвобождения, соответственно. Клетки-мишени смешивали и добавляли 70 мкл в каждую тестовую и контрольную лунку 96-луночного планшета. Мишени с антителами инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 30 мин. 70 мкл (5×10^4) эффекторных клеток добавляли в каждую тестовую лунку. В лунки с общим высвобождением добавляли 70 мкл 3% тритона X-100 и пипетировали три раза вверх и вниз для перемешивания. Планшеты возвращали в 37°C в CO₂-инкубатор с системой увлажнения на 4 ч.

Взятые вместе, данные демонстрируют, что новые гуманизированные антитела против CD47 по данному изобретению обладают превосходными и неожиданными свойствами по сравнению с мышиным исходным антителом. Гуманизированные антитела против CD47 демонстрируют превосходную фагоцитарную/АЗКФ способность, что демонстрируется фагоцитозом эритроцитов (фиг. 3B) и передачей сигналов FcγRII (фиг. 5B). Гуманизированные антитела против CD47 демонстрируют превосходный лизис клеток/АЗКЦ, что демонстрируется клеточным лизисом, опосредованным NK-клетками (фиг. 6A) и передачей сигналов FcγRIII (фиг. 6B). Гуманизированные антитела против CD47 демонстрируют превосходную передачу сигналов FcγRI (фиг. 5A). И наконец, гуманизированные антитела против CD47-антитела также демонстрируют превосходный профиль токсичности, что демонстрируется сниженной гемагглютинацией, как продемонстрировано в анализах гемагглютинации (фиг. 4A и фиг. 4B). Обнаружено, что гуманизированное антитело против CD47, hB6H12.3, особенно эффективно.

Супрессорная функция антител против CD47.

В дополнение к блокированию фагоцитарной активности взаимодействие CD47 с SIRPα также снижает выработку воспалительных цитокинов посредством активации SHP1 и инактивации нижестоящих сигналов, таких как Vav. Моноциты человека подвергали воздействию LPS для стимуляции выработки цитокинов в присутствии исходного и различных гуманизированных антител против CD47. Воздействие всеми CD47-нацеленными антителами способно значительно усиливать LPS-управляемые цитокины. Одним из следствий лучшей выработки цитокинов и врожденной клеточной активации является способность стимулировать вторичные Т-клеточные ответы. Известно, что ассоциированные с опухолью макрофаги обладают подавляющим фенотипом, который не способен поддерживать и может активно подавлять вторичную активацию Т-клеток. Мононуклеарные клетки человека дифференцировали и поляризовали с помощью IL10 и MSCF, чтобы направить их к иммуносупрессивному TAM-подобному фенотипу. Эти дифференцированные моноциты способны подавлять CD3/CD28-управляемую пролиферацию аутологических Т-клеток. Добавление воздействия антител против CD47 в эту парадигму способно активировать TAM и переместить их к фенотипу M0/M1 (увеличение CD86/MHCII). Смотри, например, фиг. 7A, 7B и 7C. Это изменение в TAM-подобном фенотипе коррелировало со способностью поддерживать CD3/CD28-опосредованную пролиферацию и активацию Т-клеток. Смотри, например, фиг. 7D.

Для анализа супрессии использовали моноциты человека, дифференцированные в опухолеподобные макрофаги с IL-10, которые совместно культивировали с аутологичными Т-клетками и оценивали способность поддерживать опосредованную Т-клеточными рецепторами активацию. CD47 был добавлен к культурам, и было обнаружено, что он вызывает повышенную регуляцию маркеров активации макрофагов, что измеряется по положительной регуляции CD86 и MHCII. Кроме того, поддержку TCR-опосредованной активации Т-клеток оценивали по положительной регуляции MHCII на Т-клетках и секреции ИНФγ (фиг. 7A-фиг. 7D).

Сравнение с другими антителами против CD47.

hB6H12.3 сравнивали с другими известными антителами против CD47, 5F9 и CC-9002 (см., WO 2011/143624). В сравнении, активность FcγRI и FcγRII была измерена в том же анализе NFAT-люциферазных клеток Jurkat, как описано выше. hB6H12.3 продемонстрировало превосходную способность активировать FcγRI и FcγRII по сравнению с антителами IgG4 5F9 и CC-90002 (фиг. 8A и фиг. 8B).

Кроме того, NK-опосредованную секрецию АЗКЦ и ИНФγ измеряли, как описано выше. И снова hB6H12.3 продемонстрировало превосходную способность опосредовать АЗКЦ и стимулировать секрецию ИНФγ по сравнению с 5F9 и CC-90002 (фиг. 8C и фиг. 8D).

Пример 3. Гуманизированные антитела против CD47 с экранирующим фрагментом.

Расщепление экранированного антитела с использованием рекомбинантных человеческих ММП для исследования связывания и функции.

Все рекомбинантные ММП активировали путем инкубации с 1,25 мМ 4-аминофенил ацетатом ртути (APMA) в течение 1-2 ч при 37°C. Как правило, 1-2 мкг активированной рчММП2 добавляли к 0,25-0,5 мг экранированного антитела и инкубировали в течение 4-16 часов при 37°C. Степень расщепления антител оценивали, используя обращенно-фазовую ЖХ-МС восстановленных антител, используя UPLC Waters Acquity/Xevo, снабженную колонкой PLRP-MS 3 мкм (Agilent). Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения UNIFI (Waters). Реактивация с помощью ММП приводит к сайт-специфическому расщеплению экранирующего фрагмента в предполагаемом сайте расщепления.

После полной реактивации экранированных антител расщепленные продукты очищали с использованием смолы MabSelect SuRe Protein A перед использованием в анализах связывания.

Данные масс-спектрометрии были получены для повторно ММП2-активированного экранированного антитела. Установлена масса легкой цепи после деконволюции для Vel-IPV-hB6H12.3 до (Фиг. 9А) и после (Фиг. 9В) расщепления рекомбинантной ММП2 человека. Ожидаемое значение m/z для интактной легкой цепи составляет 28681 (регистрируется: 28680,8). Ожидаемое значение m/z для ММП2-расщепленного антитела (LRSG-hB6H12.3) составляет 23969 (регистрируется: 23968,4).

Антитела против CD47, несущие последовательность фрагмента из аминокислотных остатков сайта расщепления на N-конце, который оставался бы после протеолиза, также генерировались путем временной экспрессии в клетках Expi-HEK или Expi-CHO. Например, для экранированного антитела, использующего последовательность расщепления ММП IPVS-LRSG, последовательность LRSG остается после ММП-активации.

Оценка протеазной специфичности последовательностей расщепления на основе ММП.

ММП активировали путем инкубации с 1,25 mM 4-аминофенил ацетатом ртути (APMA) при 37°C в течение 1 ч и до 24 ч. Легумаин активировали через 2 ч инкубации при 37°C в 50 mM ацетата натрия, 100 mM NaCl, pH 4,0.

Для оценки профиля расщепления последовательностей расщепления антитела (10 мкг) инкубировали в течение ночи при 37°C с нормализованными протеазами 400 пмоль/мин, как указано в отчетах, полученных производителем. Степень расщепления антител оценивали с помощью обращенно-фазовой ЖХ-МС восстановленных антител, используя UPLC Waters Acquity/Xevo, снабженную колонкой PLRP-MS 3 мкм (Agilent). Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения UNIFI (Waters).

Профиль расщепления протеазой двух сайтов расщепления протеазой (IPV и M2) тестировали в сравнении с панелью ассоциированных с опухолью протеаз, таких как ММП человека и мыши/крысы, семейства ADAM, uPA, матриптаза и легумаин. Кроме того, расщепление последовательностей внеклеточными протеазами tPA и фактором Ха также было протестировано. Профили расщепления протеазой в этих трех сайтах расщепления протеазой представлены в табл. 14.

Пептиды (N-конец которых слит с остовом антитела hBU12) инкубировали при 37°C в течение ночи с 400 пмоль/мин нормализованной протеазы и оценивали на расщепление. Сайт M2 был расщеплен большинством ММП, а также uPA и матриптазой. Сайт IPV был расщеплен почти всеми ММП, кроме ММП13, и не был затронут другими классами протеаз.

Таблица 14
Профили расщепления протеазой в двух разных сайтах расщепления протеазой

Фермент	Последовательность Расщепления:	
	M2	IPV
	GPLG*VR**	IPVS*LR**SG
Человеческая ММП2	Полное расщепление	Полное расщепление
Человеческая ММП7	Полное расщепление	Полное расщепление
Человеческая ММП9	Полное расщепление	Полное расщепление
Человеческая ММП13	Полное расщепление	Минимальное расщепление
Мышиная ММП2	Полное расщепление	Частичное расщепление
Мышиная ММП7	Частичное расщепление	Полное расщепление
ММП9 крысы	Частичное расщепление	Полное расщепление
uPA	Частичное расщепление	Отсутствует
Матриптаза	Полное расщепление	Минимальное расщепление
Легумин	Отсутствует	Минимальное расщепление
tPA	--	Отсутствует
Фактор Ха	Минимальное расщепление	Отсутствует
ADAM (человека, мыши)	Отсутствует	Отсутствует

Сайт расщепления ММП обозначен *, а сайты расщепления uPA/ матриптазой/легумином обозначены **. Расщепления на любом сайте достаточно для восстановления связывания антител.

Насыщение экранированными антителами против CD47.

Было выполнено насыщение антителами против CD47 клеток рака мочевого пузыря человека SW780. Антитела hB6H12, экранированные Vel-IPV, тестировали вместе с предварительно ММП2-активированными компарторами. Расщепленные Vel-IPV-антитела имели фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления - LRSG на N-концах антитела (фиг. 10 и табл. 15).

Таблица 15
Определение аффинности связывания (Kd) с клетками SW780, полученное путем насыщения их антителами (фиг. 10).

Антитело	Kd (нМ)
Расщепленное Vel-IPV-hB6H12.3	11,4
Расщепленное Vel-IPV-hB6H12.4	9,2
Расщепленное Vel-IPV-hB6H12.19	26,6
Расщепленное Vel-IPV-hB6H12.20	30,2
Vel-IPV-hB6H12.3	> 2000
Vel-IPV-hB6H12.4	> 2000
Vel-IPV-hB6H12.19	> 2000
Vel-IPV-hB6H12.20	> 2000

Антитела hB6H12, экранированные Vel-IPV, тестировали вместе с предварительно ММП2-активированными компарторами. Расщепленные Vel-IPV антитела и IPV-антитела с фрагментом из ами-

ноокислотных остатков сайта расщепления содержали остаток последовательности LRSG на N-конце антитела. Расщепленное антитело было получено путем расщепления с помощью ММП2, тогда как IPV-антитела с фрагментом из аминокислотных остатков сайта расщепления было получено рекомбинантно (Фиг. 11 и табл. 16). Используемый в контексте данного документа термин "фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления", "антитело с фрагментом из аминокислотных остатков сайта расщепления" или "антигенсвязывающий фрагмент с фрагментом из аминокислотных остатков сайта расщепления" относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту после расщепления ММП или антителу или антигенсвязывающему фрагменту, который был получен рекомбинантным способом, т. е. получен без суперспирального домена и, следовательно, расщепление не проводилось. Расщепление ММП приводит к короткому фрагменту аминокислотной последовательности сайта расщепления. Для сайта расщепления IPV фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления должен быть LRSG или SG. Для сайта расщепления M2 фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления должен быть VR.

Таблица 16

Определение аффинности связывания (K_d) с клетками SW780, полученное путем насыщения их антителами (фиг. 11).

Антитело	K_d (нМ)
hB6H12.3	19,2
Ab47	8,0
Vel-IPV-hB6H12.3	> 2000
фрагментIPV-hB6H12.3	18,1
Расщепленное Vel-IPV-hB6H12.3	14,2

Было выполнено насыщение антителами проти CD47 эритроцитов человека. Антитела hB6H12, экранированные Vel-IPV, были протестированы вместе с повторно активированными компарторами (IPV-hB6H12.3 с фрагментом из аминокислотных остатков сайта расщепления или ММП2-расщепленное Vel-IPV-hB6H12.3). Расщепленные Vel-IPV антитела и IPV-антитела с фрагментом из аминокислотных остатков сайта расщепления содержали остаток последовательности LRSG на N-конце антитела. Расщепленное антитело было получено путем расщепления с помощью ММП2, тогда как IPV-антитело с фрагментом из аминокислотных остатков сайта расщепления было получено рекомбинантно (фиг. 12 и табл. 17).

Таблица 17

Определение аффинности связывания (K_d) с эритроцитами, полученное путем насыщения их антителами (фиг. 12).

Антитело	K_d (нМ)
hB6H12.3	58,2
Ab47	26,5
Vel-IPV-hB6H12.3	> 2000
фрагментIPV-hB6H12.3	46,8
Расщепленное Vel-IPV-hB6H12.3	41,7

Насыщающее антителами против CD47 рч CD47 осуществляли с помощью ИФА. Vel-IPV-hB6H12.3 проявляло значительно ослабленное связывание. Связывание может быть восстановлено после расщепления рчММП2 (фиг. 13 и табл. 18).

Таблица 18

Определение аффинности связывания (K_d) с рч CD47 с помощью ИФА (фиг. 13)

Антитело	K_d (нМ)
hB6H12.3	1,7
Vel-IPV-hB6H12.3	1,7
Расщепленное Vel-IPV-hB6H12.3	> 250

Насыщение антителами против CD47 рч CD47 с помощью ИФА проводили с hB6H12,3 G91A, который имеет точечную мутацию G91A в LCDR3. Как hB6H12.3, так и hB6H12.3 G91A показало более вы-

сокое V_{max} , чем Ab47 (фиг. 14 и табл. 19).

Таблица 19

Определение аффинности связывания (K_d) с рс CD47 с помощью ИФА (фиг. 14)

Антитело	K_d (нМ)
Ab47	1,0
hB6H12.3	1,4
HB6H12,3 G91A	2,7

Было выполнено насыщение антителами против CD47 клеток рака мочевого пузыря человека SW780. Связывание Ab47 и hB6H12.3 сравнивали с вариантами, несущими мутацию G91A в LCDR3 (фиг. 15 и табл. 20)

Таблица 20

Определение аффинности связывания (K_d) с клетками рака мочевого пузыря человека SW780, полученное путем их насыщения (фиг. 15)

Антитело	K_d (нМ)
Ab47	6,8
Ab47 G91A	19,8
hB6H12.3	20,5
HB6H12.3 G91A	62,3

Было выполнено насыщение антителами проти CD47 эритроцитов человека. Связывание Ab47 и hB6H12.3 сравнивали с вариантами, несущими мутацию G91A в LCDR3 (фиг. 16 и табл. 21)

Таблица 21

Определение аффинности связывания (K_d) с эритроцитами, полученными путем насыщения их антителами (фиг. 16)

Антитело	K_d (нМ)
Ab47	12,1
Ab47 G91A	100,3
hB6H12.3	68,9
HB6H12.3 G91A	> 150

Пример 4. Эксперименты *in vivo*.

Оценка инфильтрации макрофагов в тканях может проводиться путем мониторинга поверхностных маркеров макрофагов, включая F4/80 для макрофагов мыши или CD163, CD68 или CD11b, с помощью традиционных способов, которые включают иммуногистохимию (игх), вестерн-блотТИНГ, проточную цитометрию или способы сиквенирования РНК.

Оценка протеаз в тканях может контролироваться с использованием различных способов, включая как те, которые контролируют активность протеазы, так и те, которые могут обнаруживать протеолитическую активность. Обычные способы, которые могут обнаружить присутствие протеаз в ткани, которые могут включать как неактивные, так и активные формы протеазы, включают ИГХ, сиквенирование РНК, вестерн-блоттинг или способы на основе ИФА. Дополнительные способы могут быть использованы для обнаружения активности протеазы в тканях, которая включает зимографию, зимографию *in situ* с использованием флуоресцентной микроскопии или использование флуоресцентных протеолитических субстратов. Кроме того, использование флуоресцентных протеолитических субстратов может сочетаться с иммуно-захватом специфических протеаз. Кроме того, антитела, направленные против активного сайта протеазы, можно использовать различными способами, включая ИГХ, флуоресцентную микроскопию, вестерн-блоттинг, ИФА или проточную цитометрию (см. Sela-Passwell et al. Nature Medicine. 18:143-147. 2012; LeBeau et al. Cancer Research. 75:1225-1235. 2015; Sun et al. Biochemistry. 42:892-900. 2003; Shiryayev et al. 2:e80. 2013.)

Была определена активность антител против CD47 на ксенотрансплантатной модели лимфомы L428 у мышей NSG. Эта ксенотрансплантатная модель имеет высокую макрофагальную инфильтрацию, что подтверждается сильной степенью окрашивания с использованием маркера макрофагов мыши F4/80 при ИГХ. См. например, фиг. 17В. Антитела вводили в/б q4dx4 с использованием дозировки 1 или 10 мг/кг. Экранированное антитело Vel-IPV-hB6H12.3, а также неэкранированные антитела Ab47 и

hB6H12.3 эффективно уменьшали объем опухоли в течение периода исследования с использованием дозировки 10 мг/кг. В дозе 1 мг/кг как Vel-IPV-hB6H12.3, так и неэкранированное hB6H12.3 обеспечивают задержку роста опухоли. Экранированное антитело Vel-IPV-hB6H12.3 было несколько менее активным, чем неэкранированное hB6H12.3 в этой дозе. (фиг. 17A).

Была определена активность антител против CD47 на ксенотрансплантатной модели рака головы и шеи Detroit 562 у мышей NSG. Эта ксенотрансплантатная модель имеет высокую макрофагальную инфильтрацию, что подтверждается сильной степенью окрашивания с использованием маркера макрофагов мыши F4/80 при ИГХ. Смотри фиг. 18B. q4dx4 с использованием дозировки 5 мг/кг. Антитела Ab47, hB6H12.3 и Vel-IPV-hB6H12.3 эффективно уменьшали объем опухоли в течение периода исследования (фиг. 18 A).

Была определена активность антител против CD47 в ксенотрансплантатной модели фибросаркомы HT1080 (Фиг. 19A и 19B) и ксенотрансплантатной модели печеночноклеточного рака HEPG2 (фиг. 19C и 19D) у мышей NSG. Эти ксенотрансплантатные модели имеют низкую макрофагальную инфильтрацию, о чем свидетельствует ограниченное окрашивание с использованием маркера макрофагов мыши F4/80 при ИГХ. q4dx4 с использованием дозировки 10 мг/кг. Антитела Ab47, hB6H12.3 и Vel-IPV-hB6H12.3 эффективно уменьшали объем опухоли и/или замедляли рост опухоли в течение периода исследования.

В дополнение к оценке противоопухолевой активности и ее корреляции с макрофагальной инфильтрацией, были оценены уровни ММП в этих опухолях, а также количественная оценка при удалении экранирующего фрагмента с антител. Опухоли из ксенотрансплантатных и сингенных моделей опухоли отбирали и подвергали оценке белка и последовательности РНК для мониторинга уровней ММП в этих опухолях, а также для понимания корреляции между уровнями РНК и белка в ТМЕ. Анализ белка с использованием мультиплексной платформы Luminex показал, что все опухоли, используемые для исследования противоопухолевой активности Vel-IPV-hB6H12.3, содержали устойчивые уровни как ММП2, так и 9 (табл. 22). Кроме того, когда мы сравнили уровни ММП в опухоли с уровнями, присутствующими в системах клеточных культур, мы обнаружили заметное повышение уровней ММП в локализации опухоли, которое значительно превышало уровни, наблюдаемые только в условиях культивирования тканей *in vitro* (фиг. 35A и 35B).

Таблица 22

Уровни ММП2 и ММП9 в выбранных опухолях (пг/мл)

		Опухоли		
Ксенотрансплантатные Модели	ММП	HT1080	HEPG2	L428
	ММП2	7506	787	204
	ММП9	2020	771	47
Сингенные Модели	ММП	HT1080	HEPG2	L428
	ММП2	8453	27765	47899
	ММП9	28137	20845	22661

Активность антител против CD47-антител в модели опухоли с низким внутренним содержанием макрофагов может быть усилена в сочетании с ADC-ауристатин, содержащий MMAE, который, как известно, управляет макрофагальной инфильтрацией. Это было продемонстрировано на ксенотрансплантатной модели опухоли HEPG2 у мышей NSG. Антитела против CD47 вводили в/б q4dx4 с использованием дозировки 5 мг/кг, в то время как ADC MMAE вводили один раз с использованием дозировки 1 мг/кг. Комбинация антител была более эффективной в уменьшении объема опухоли, чем одно из антител (фиг. 20). Дополнительные эксперименты с другими MMAE-содержащими ауристатинами (LIV1A и CD30) продемонстрировали сходную совместимость с антителом против CD47 в ксенотрансплантатной модели рака молочной железы MCSF7 для ADC Liv1A и модели лимфомы L428 для ADC CD30 (фиг. 36A и 36B).

Мышиное реактивное антитело против CD47 mIAP301 (Oldenborg et al., J. Exp. Med. 193:855-861, 2001) можно экранировать, используя те же последовательности VEL и IPV, которые использовались для человеческого антитела hB6H12.3. Экранирование с использованием этих конструкций блокировало связывание антител с мышиными CD47-положительными опухолями (фиг. 21A) и предотвращало функциональность, измеренную с помощью фагоцитоза эритроцитов (фиг. 21B).

Анти-мышинное антитело против CD47 mIAP301 вызывает уменьшение количества тромбоцитов у мышей BALB/c при введении однократной в/в дозы 10 мг/кг. Напротив, такое уменьшение не наблюдалось, когда мышам вводили экранированные антитела Vel-IPV-mIAP301 и Vel-M2-mIAP301 в дозе 10 мг/кг внутривенно (фиг. 22A).

Экранированное антитело Vel-IPV-mIAP301 значительно улучшило фармакокинетику в плазме мышей BALB/c по сравнению с неэкранированным mIAP301, демонстрируя, что экранированное антитело способно избежать опосредованного мишенью расположения лекарственного средства, на которое

наталкиваются типичные антитела против CD47. Антитела Vel-IPV-mIAP301 и mIAP301 метили с использованием ^3H -пропионата посредством конъюгации с лизином и вводили в/в мышам BALB/c в дозе 1 мг/кг. Концентрацию антител определяли с использованием сцинтилляционных измерений плазмы, взятой в разные моменты времени (фиг. 22B). Концентрация mIAP301 в плазме была ниже определяемых количеств в течение 15 минут, тогда как концентрации Vel-IPV-mIAP301 можно было измерять до 7 дней после введения дозы.

Биораспределение экранированных Vel-IPV-mIAP301 и Vel-M2-mIAP301 и неэкранированного mIAP301 было проверено на мышах BALB/c, несущих A20, с использованием ^3H -меченных антител в дозах 1 и 10 мг/кг. Антитела вводили, как только опухоли достигли 250 мм³. В назначенные моменты времени мышей умерщвляли, а концентрацию антител в плазме, крови, опухоли, селезенке и печени определяли с использованием сцинтилляционных измерений. Как представлено на фиг. 37A и 37B, концентрация mIAP301 в плазме является незначительной в течение одного часа после введения. Между тем, значительно меньше экранированного антитела присутствует в селезенке по сравнению с неэкранированным антителом mIAP301 (фиг. 37C и 37D). Аналогичные результаты были получены при исследовании антител в печени. (Данные не показаны.) Напротив, избегая опосредованного мишенью расположения CD47 в нормальных тканях, экранированные антитела Vel-IPV-mIAP301 и Vel-M2-mIAP301 демонстрируют повышенные уровни в опухоли по сравнению с mIAP301 (фиг. 37E и 37F).

Анти-мышинное антитело против CD47 mIAP301 проявляло противоопухолевую активность в модели лимфомы A20, но вызывало сопутствующее уменьшение количества эритроцитов (фиг. 23 A и фиг. 23B). Экранированное антитело Vel-IPV-mIAP301 проявляло сходную активность, но нейтрализовало влияние на изменение количества эритроцитов. Антитело Vel-IPV-mIAP301 избегало поглощения антигена эритроцитов, но также сохраняло связывание с опухолью (Фиг. 23C и фиг. 23D). Модель лимфомы A20 более подробно описана в Donnou et al. (Advances in Hematology, Article ID 701704, 2012) и Liu et al. (Nature Medicine, 21:1209-1215, 2015).

Анти-мышинное антитело против CD47 mIAP301 проявляло противоопухолевую активность в модели рака толстой кишки MC38, которая, как известно, чувствительна к иммуноонкологическим агентам. Активность экранированного антитела против mIAP301 в этой модели продемонстрировала превосходную эффективность согласно животным, проявляющим полный ответ (фиг. 24). Повторное заражение этого животного приводило к полному отторжению опухоли, демонстрируя индукцию долгоживущего ответа Т-клеток памяти (данные не показаны). Модель рака толстой кишки MC38 более подробно описана в Liu et al. (цитировано выше).

В дополнение к тестированию комбинаторной активности человеческого антитела против CD47 с ADC в сравнении с Liv1a или CD30, мы также оценили комбинаторную активность с другими иммуномодулирующими агентами. Чтобы достичь этого, мы перешли к полной иммунной системе мыши и использовали анти-мышинное суррогатное антитело mIAP против CD47. Используя модель A20, мы продемонстрировали, что экранированное антитело против CD47 действовать синергически с суррогатным антителом против PD-1, а также с анти-SEA-CD40 антителом, SEA-1C10. Эти данные свидетельствуют о том, что взаимодействие как врожденной, так и адаптивной ветви иммунной системы вместе с экранированным CD47-нацеленным агентом способно усиливать стимулирование устойчивых противоопухолевых реакций.

Исходное и экранированное анти-мышинное антитело против CD47 mIAP301 вызывало повышенную противоопухолевую активность в сочетании с суррогатным антителом против PD-1, в результате чего 4/6 животных демонстрировали ПО (See, Dahan et al. Cancer Cell. 28: 285-295. 2015, для ссылки на антитело PD-1, клон RMP1-14) (фиг. 25A). Исходное анти-мышинное антитело против CD47 mIAP301 вызывало повышенную противоопухолевую активность в сочетании с активирующим макрофаги CD40-нацеленным суррогатным SEA-усиленным антителом 1C10 (см. WO 2016/069919 для ссылки на антитело 1C10; см. Lindberg et al. J. Biol. Chem. 269: 1567-1570. 1994, для ссылки на антитело mIAP301) (фиг. 25B).

Данные, демонстрирующие воздействие антитела против CD47 в сочетании с антителом против PD-1 или антителом против CD40, указывают на то, что терапия с использованием антитела против CD47 может усиливать активность агентов, которые повышают активность Т-клеток, как в контексте антител к ингибитору контрольной точки (антитела против PD-1) а также агентов, которые усиливают активность врожденных клеток (антитела против CD40 или другие ингибиторы CD40). Это подтверждает мнение о том, что антитело против CD47 может быть спарено с несколькими иммуномодулирующими агентами в клинике, которые поддерживают как адаптивные, так и врожденные ветви противоопухолевого ответа.

Пример 5. Суперспиральный домен экранированных антител.

Стабильность экранированных гуманизированных антител B6H12, несущих разные суперспиральные домены, оценивали с использованием внутривенного введения мышам BALB/c. Антитела вводили с использованием дозировки 5 мг/кг. В заданный момент времени (3 дня) плазму собирали у зараженных мышей. Человеческое антитело очищали от плазмы с использованием смолы IgSelect. Захваченное антитело восстанавливали и разделяли с помощью ДСН-ПААГ, а затем зондировали с помощью вестерн-блоттинга, используя конъюгированное с HRP антитело против человеческого Fc. Процент расщепленного антитела оценивали по денситометрии полос, соответствующих экранированным и неэкранированным

ным тяжелым цепям, которые различаются по размеру примерно на 5 кДа (фиг. 26).

В табл. 23 показаны эффекты экранирования различными парами пептидов, образующих суперспираль, включенными в гуманизированное антитело B6H12, содержащее тяжелую цепь (SEQ ID NO: 2) и легкую цепь (SEQ ID NO: 10) и протестированное на разных клеточных линиях. В примерах антитело также называется Ab47. Kd (нМ) показан для каждого антитела, которое было получено в результате насыщения на каждой соответствующей клеточной линии. Высокая концентрация 2000 нМ была использована для каждого эксперимента по связыванию. Как представлено в табл. 23, различные суперспиральные домены были способны ингибировать связывание Ab47 с CD47, экспрессируемым на поверхности клетки, даже при тестировании в концентрациях, превышающих 2 микромоля, тогда как неэкранированное антитело Ab47 показало IC₅₀ 3,3 -21 нМ.

Стабильность и активацию экранированных гуманизированных антител B6H12, несущих суперспираль Vel-IPV и последовательность расщепления, оценивали у бестимусных мышей, несущих ксенотрансплантат фибросаркомы человека HT1080. Антитела вводили в/б с использованием дозировки 5 мг/кг. В определенные моменты времени (дни 1, 3, 4) мышей умерщвляли и производили забор ткани и плазмы. Ткани гомогенизировали и человеческое антитело очищали от биологических образцов с использованием смолы IgSelect. Захваченное антитело восстанавливали и разделяли с помощью ДСН-ПААГ, а затем зондировали с помощью вестерн-блоттинга, используя конъюгированное с HRP антитело против человеческого Fc. Процент расщепленного антитела оценивали по денситометрии полос, соответствующих экранированным и неэкранированным тяжелым цепям, которые различаются по размеру примерно на 5 кДа (фиг. 38A и 38B). Очень малое количество неэкранированных антитела (<5%) было обнаружено в плазме или печени в любой контрольный момент времени. Между тем, в опухолях было обнаружено более 20-30% расщепления, причем максимальное количество расщепления происходило через 3-4 дня после введения дозы. Кроме того, опухоли HT1080, собранные от мышей, которых подвергали воздействию Ab47 или Vel-IPV-Ab47 в течение 4 или 7 дней, подвергали проточной цитометрии для определения степени антитела, которое было способно связываться и насыщать клетки опухоли, которые экспрессируют CD47 (фиг. 38B).

Таблица 23

Аффинность (нМ), измеренная с помощью насыщения соединения при проточной цитометрии, гуманизированного антитела B6H12 (Ab47), содержащего различные экранирующие домены антитела

Суперспираль	HT1080	SW780	HCT116	Raji
Ab47	21	9,6	7,8	3,3
A2B1	> 2000	> 2000	1775	
CA2B1	> 2000	> 2000	> 2000	
Vel	> 2000	> 2000	> 2000	
CVel	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000
M11	> 2000	> 2000	> 2000	
CM11	> 2000	> 2000	> 2000	
M15	> 2000	> 2000	> 2000	
CM15	> 2000	> 2000	> 2000	
Fos-Jun	> 2000	> 2000	> 2000	
CFos-Jun	> 2000	> 2000	> 2000	
A4B4	1181	1684	1116	466
Hinge	> 2000	476	118	104

Активность и фармакокинетика гуманизированных антител против CD47 и демонстрация улучшенной переносимости благодаря экранированию у макак циномоглус.

Чтобы проверить способность экранирующего фрагмента улучшить фармакокинетику и переносимость вариантов IgG1-антител против CD47, была проведена серия исследований с использованием однократной в/в инъекции макакам циномоглус. Тестируемые IgG1-антитела против CD47 были перекрестно-реактивными с CD47 человека и макак циномоглус, которые высоко консервативны у этих видов по экспрессии и последовательности. Оценка активности протеазы с помощью гелевой зимографии *in situ* панели макак циномоглус и тканей человека показала, что уровни активности протеазы также были вы-

соко консервативными для этих видов. Кроме того, макаки циномолгус имеют очень сходные взаимодействия FcγR с антителами IgG1 и считаются токсикологически предиктивными для связанных с эффекторной функцией эффектов человеческих антител IgG1, что делает их подходящей моделью для оценки эффектов IgG1-антител против CD47 (Warncke et al. J. Immunol. 188:4405-4411. 2012). В своей совокупности, макак циномолгус представляет собой соответствующий вид для оценки различной активности антител против CD47 и, кроме того, для оценки как эта активность изменяется при экранировании и модифицировании эффекторной функции.

Альтернативно гуманизированное B6H12, Ab47.

Чтобы определить переносимость и ФК B6H12 на альтернативно гуманизированной конструкции IgG1 и дополнительно продемонстрировать доказательство способности экранирующего фрагмента Vel-IPV и последовательности расщепления изменять переносимость и фармакокинетику, макакам циномолгус вводили внутривенно 0,1, 1, 10 и 30 мг/кг альтернативно гуманизированного антитела IgG1 B6H12 против CD47, Ab47. Гуманизированное антитело Ab47 на основе IgG1 продемонстрировало повышенную активность, продемонстрированную в виде потери массы эритроцитов при гематологическом анализе, по сравнению с опубликованными данными антитела для mB6H12 на гуманизированной платформе IgG4 (Liu, 2015). В то время как IgG4 B6H12, у которого отсутствует эффекторная функция для обеспечения высокой активности АЗКЦ, АЗЦФ и КЗЦ, в дополнение к блокированию взаимодействий с CD47, продемонстрировал переносимость доз до 30 мг/кг у макак циномолгус (Liu, 2015), Ab47 не переносился при дозе более 1 мг/кг (фиг. 27А).

Ab47 в сравнении с Vel-IPV-Ab47.

Чтобы продемонстрировать способность экранирующего фрагмента Vel-IPV уменьшать активность Ab47, макакам циномолгус вводили дозы 0,1, 1 и 10 мг/кг. Примечательно, что дозы, приблизительно в 10 раз более высокие, переносились лучше, чем неэкранированное Ab47, о чем свидетельствуют аналогичные уровни потери массы эритроцитов в образцах крови, собранных для гематологического анализа у животных, подвергшихся воздействию 1,0 мг/кг Ab47 и 10 мг/кг Vel-IPV-Ab47 (фиг. 27В). Животные, подвергшиеся воздействию Ab47, демонстрировали постоянные клинические признаки, связанные с гемолизом и недостаточной переносимостью (красные выделения из мочеполовой системы, гемолизированные образцы, рвота и гипоактивность), в то время как у животных, подвергшихся воздействию экранированным антителом, наблюдалось полное отсутствие нежелательных клинических признаков. Это увеличение переносимости с экранированным Ab47 было также продемонстрировано в способности экранирующего фрагмента уменьшать увеличение цитокинов, циркулирующих в плазме, таких как моноцитарный хемоаттрактантный белок-1, МХБ-1. Самые высокие дозы тестируемого Vel-IPV-Ab47 (10 мг/кг) продемонстрировали уровни, аналогичные контрольным и самой низкой дозы протестированного Ab47, 0,1 мг/кг (фиг. 39А). Кроме того, экранирование значительно улучшило ФК молекулы. Когда доза 1 мг/кг Ab47 была ниже предела обнаружения при использовании неспецифического ИФА всех антител (общее антитело) в День исследования 3, 1 мг/кг Vel-IPV-Ab47 можно было обнаружить в течение всего курса исследования, День исследования 15 (фиг. 28). При неспецифическом ИФА всех антител используется 96-луночные планшеты для микротитрования, покрытые анти-человеческим mAb против легкой каппа-цепи, которое связывается с легкой каппа-цепью человека Ab47 и Vel-IPV-Ab47. Оно не дает перекрестную реакцию с легкой каппа-цепью обезьяны циномолгус. Исследуемые образцы разводили в динамическом диапазоне анализа для Ab47 (10 (LLOQ) до 1280 нг/мл (ULOQ)) или Vel-IPV-Ab47 (20 (LLOQ) до 2560 нг/мл (ULOQ)) с объединенной K₂EDTA плазмой Обезьян циномолгус. Разбавленные образцы вместе с QC и калибровочные маркеры подвергали минимально необходимому разбавлению (MRD) 1:20 с помощью буфера для анализа перед добавлением в заблокированные и промытые планшеты. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре чашки промывали и детектировали связанный аналит (Ab47 или Vel-IPV-Ab47) с помощью биотинилированного анти-человеческого mAb против легкой каппа-цепи (идентичного клону в качестве реагента захвата) с последующим добавлением полимерной пероксидазы хрена, конъюгированной со стрептавидином (поли-HRP-SA). После инкубации и промывки субстрат HRP 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) добавляли в планшеты и окрашивали в течение 10 минут. Реакцию останавливали 1 н. HCl и планшеты считывали на планшет-ридере Spectromax M5 при 450-630 нм. Чистые значения поглощения были импортированы в Watson LIMS v. 7.4.2, и была проведена нелинейная регрессия 5-PL для преобразования поглощения в нг/мл всех антител, присутствующих в образцах.

Ab47 в сравнении с hB6H12.3.

Гуманизированное B6H12.3, которое характеризуется дифференциальным K_d, повышенным V_{max} и сниженной гемагглютинацией, вводили однократно внутривенно болюсно в дозе 1 мг/кг макакам циномолгус для тестирования на дифференциальную активность *in vivo*. В то время как hB6H12.3 и Ab47 в концентрации 1 мг/кг приводят к сходным уровням уменьшения количества эритроцитов (фиг. 29), Ab47 также продемонстрировало уменьшение количества приблизительно до 40% от уровня тромбоцитов перед введением дозы 1 мг/кг, тогда как hB6H12.3 вызывало уменьшение количества только на 20%, аналогично контрольным уровням, вероятно, из-за ошибки выборки (фиг. 30). Увеличение количества тромбоцитов, начинающееся на 7-й день исследования, наблюдалось после лечения обоими антителами, вероят-

но, из-за общего стимулирования костного мозга.

hB6H12.3 в сравнении с Vel-IPV-hB6H12.

Чтобы продемонстрировать способность экранирующего фрагмента Vel-IPV уменьшать активность hB6H12.3, макакам циномоглус вводили дозы 10 и 20 мг/кг. 20 мг/кг, самая высокая испытанная доза, ее гематологическое тестирование продемонстрировало аналогичное снижение потери массы эритроцитов, которое наблюдалось с 1 мг/кг hB6H12.3, однако с более высокой переносимостью, чем у неэкранированного hB6H12.3 при в 20-раз меньшей дозе (Фиг. 31). Точно так же, экранирование hB6H12.3 также продемонстрировало снижение циркулирующих в плазме цитокинов, включая МХБ-1, требуя 20-кратной дозы экранированного hB6H12.3 для получения ответов, аналогичных тем, которые были достигнуты с неэкранированным hB6H12.3 (Фиг. 39В). Животные, которым вводили Vel-IPV-hB6H12.3, не имели клинических симптомов, связанных с воздействием антитела, тогда как клинические симптомы, связанные с гемолизом, наблюдались при использовании неэкранированного hB6H12.3 в дозе 1 мг/кг. Фармакокинетический анализ с использованием неспецифического ИФА всех антител продемонстрировал улучшенный фармакокинетический профиль по сравнению с неэкранированными hB6H12.3 (фиг. 39С).

Vel-IPV-hB6H12.3 в сравнении с SEA-Vel-IPV-hB6H12.3.

Для дальнейшего усиления активности IgG1 экранированного антитела против CD47, Vel-IPV-hB6H12.3, антитело было получено с использованием запатентованной технологии Seattle Genetics для получения антител с определенным гликозилированием, SEA (sugar engineered antibodies), нефукозилированных антител с повышенной эффекторной функцией (США). 8163551). Относительную противоопухолевую активность в ксенотрансплантатных моделях Vel-IPV-hB6H12.3 и SEA-Vel-IPV-hB6H12.3, а также фукозилированного и нефукозилированного SEA-hB6H12.3 оценивали в моделях с высоким (Detroit562) и низким (HT1080) содержанием макрофагов. Устранение фукозилирования остова и получение в результате SEA-hB6H12.3 и SEA-Vel-IPV-hB6H12.3 не предоставило доказательств преимуществ противоопухолевой активности в обеих моделях (фиг. 40А и 40В). Так как эти модели работают на бестимусных мышах, они могут не в полной мере использовать усиленную эффекторную функцию, придаваемую остову SEA, мышинное суррогатное антитело mAP301 также нефукозилировано, и противоопухолевую активность с фукозилированным и нефукозилированным vel-IPV-mAP301 тестировали на сингенной модели лимфомы A20 с высокой активностью, а также на сингенной модели CT26 активности с более низкой активностью. Устранение фукозилирования остова для получения SEA-антитела, по видимому, не дает дополнительного противоопухолевого эффекта.

В то время как технология SEA с другими антителами привела к увеличению активности, когда антитело экранировано, версии SEA и не-SEA хорошо переносятся с аналогичной потерей массы эритроцитов при гематологическом анализе с идентичным испытанным уровнем максимальной дозы, 20 мг/кг. (фиг. 32). Никаких неблагоприятных клинических признаков не наблюдалось во время воздействия любым антителом, однако уровни циркулирующего цитокина МХБ-1 были повышены для SEA-антитела (фиг. 41А). Фармакокинетический анализ с использованием неспецифического ИФА всех антител продемонстрировал в целом сходные фармакокинетические профили между антителами SEA и не-SEA Vel-IPV-hB6H12.3, причем оба антитела улучшились по сравнению с неэкранированными hB6H12.3 (фиг. 41В).

Пример 6. Лечение опухолей у субъектов с использованием селективных биомаркеров.

В раскрытии дополнительно предусмотрено лечение субъектов с опухолями с использованием антител против CD47 по данному изобретению на основе селективных биомаркеров у указанных субъектов. Выбор субъектов для лечения с использованием антител против CD47 по данному изобретению будет основан на 1) более высоких уровнях и активности ММП в раковой ткани по сравнению с окружающей тканью, не являющейся раковой; 2) более высокие уровни экспрессии CD47 в раковой ткани по сравнению с окружающей тканью, не являющейся раковой; и 3) более высокий уровень инфильтрации макрофагов в раковой ткани по сравнению с окружающей тканью, не являющейся раковой.

Способы определения уровней и активности отдельных биомаркеров включают иммуногистохимический и энзимологический анализ. Например, уровни инфильтрации макрофагов могут быть определены иммуногистохимией с использованием антитела против CD163 в качестве маркера.

Чтобы продемонстрировать способность обнаруживать макрофаги, инфильтрирующие опухоль, в образце раковой ткани по сравнению с образцом ткани, не являющееся раковой, использовали образцы опухолевого ядра рака молочной железы и образцы нормальной ткани молочной железы. Иммуногистохимию проводили с использованием антитела против CD163. Результаты демонстрируют, что макрофаги, инфильтрирующие опухоль, могут быть легко обнаружены в образцах опухоли по сравнению с образцами ткани, не являющейся раковой (фиг. 33).

Пример 7. Фагоцитоз и агрегация CD47-положительных клеток с помощью Vel-IPV-hB6H12.3.

Фагоцитоз CD47-положительных эритроцитов контролировали, чтобы оценить влияние экранирования на функциональность антител. Эритроциты человека метили флуоресцентным красителем PKH и опсонизировали в течение 30 мин с 1 мкг/мл неэкранированного hB6H12.3, экранированного Vel-IPV-hB6H12.3 или ММП-активированного Vel-IPV-hB6H12.3. Эритроциты промывали, затем инкубировали с моноцитарными макрофагами в соотношении 10:1 в течение двух часов. Затем образцы три-

жды промывали гипотоническим лизирующим буфером АСК. Степень фагоцитоза оценивали путем мониторинга поглощения флуоресцентно меченных эритроцитов человека макрофагами человека посредством проточной цитометрии.

Как изображено на фиг. 42, экранированное Vel-IPV-hB6H12.3 не проявило увеличения фагоцитоза выше фоновых уровней эритроцитов, которые не подвергались воздействию, тогда как hB6H12.3 и ММП-активированное Vel-IPV-hB6H12.3 показали сходные уровни фагоцитоза эритроцитов.

Активирование гемагглютинации эритроцитов человека экранированными антителами Ab47 тестировали, как описано в Примере 2. Эритроциты человека подвергались воздействию повышенных концентраций экранированного Vel-IPV-Ab47 или ММП-расщепленного Vel-IPV-Ab47 в течение тридцати минут при 37°C. Гемагглютинацию контролировали с помощью оптической оценки диаметра видимого пятна в каждой лунке.

Как представлено на фиг. 43, гемагглютинация ингибировалась, когда Ab47 был экранирован, и гемагглютинация восстановилась, когда экранирующий фрагмент был удалена с помощью ММП.

Пример 8. hB6H12.3 непосредственно вызывает апоптоз.

Лигирование CD47 на клеточной поверхности может вызывать апоптоз. Сообщалось, что антитело против CD47 mAb клон B6H12 может вызывать апоптоз только при иммобилизации на поверхности; однако, hB6H12.3 продемонстрировал апоптотическую активность, не будучи связанным с поверхностью. Восемь различных клеточных линий (A431, HEK293, Hela, HepG2, HPAF11, I540Cy, MCF7 и THP1) высевали по 50,000 клеток на лунку на 24 ч. Клетки подвергали воздействию hB6H12.3, 5F9 или контрольным изотипом IgG1 в концентрациях от 5 до 0,05 мкг/мл в течение 18 часов. Затем клетки собирали, дважды промывали, окрашивали с использованием маркера апоптоза аннексинном V, и апоптоз определяли количественно с помощью проточной цитометрии.

Как показано на фиг. 44, во всех восьми типах клеток клетки, которые подверглись воздействию hB6H12.3, демонстрировали более высокие уровни апоптоза, что определяется связанными уровнями окрашивания аннексинном, чем клетки того же типа, обработанные 5F9 или контрольным изотипом IgG1.

Пример 9. Стабильность hB6H12.3 в цельной крови и плазме.

Свежесобранные образцы цельной крови (4% цитрата натрия) от 17 пациентов с различными типами рака (10 саркома, 3 NSCLC, 3 рака толстой кишки и 1 меланома) были получены от BioIVT. hB6H12.3 и экранированные антитела Vel-IPV-hB6H12.3 непосредственно метили флуоресцеин-изотиоцианатом (ФИТЦ, FITC). Образцы свежей цельной крови инкубировали с увеличивающимися концентрациями (максимальная концентрация, 20 мкг/мл) ФИТЦ-меченного hB6H12.3 или ФИТЦ-меченного Vel-IPV-hB6H12.3, в течение 20 ч при 37°C. Связывание антител с клетками крови характеризовалось с использованием проточной цитометрии.

Часть каждого из образцов цельной крови от пациентов с саркомой использовали для экстракции плазмы, и добавляли к образцам плазмы 20 мкг/мл рекомбинантного CD47. Образцы плазмы, содержащие рекомбинантный CD47, затем инкубировали с 20 мкг/мл hB6H12.3 или экранированного Vel-IPV-hB6H12.3 в течение четырех дней при 37°C. Степень расщепления экранирующего фрагмента Vel-IPV оценивали с использованием ИФА через связывания с CD47, как описано в Примере 2. Vel-IPV-hB6H12.3 не связывалось с рекомбинантным CD47 в концентрации, проникшей в плазму (20 мкг/мл); следовательно, любое связывание антитело-CD47, обнаруженное в плазме, инкубированной с Vel-IPV-hB6H12.3, обусловлено связыванием расщепленного Vel-IPV-hB6H12.3 с CD47.

Из 17 протестированных образцов крови экранированное Vel-IPV-hB6H12.3 продемонстрировало более чем 10%-ное связывание только с одним образцом с аномальным значением (от пациента с саркомой, см. фиг. 45B) при максимальной концентрации. Ни в одном из 16 других образцов не было обнаружено связывания экранированного Vel-IPV-hB6H12.3 (репрезентативные данные, представленные на фиг. 45A). Как представлено на фиг. 45C, не более 2% экранированных Vel-IPV-hB6H12.3 было расщеплено в любом из десяти образцов плазмы от пациентов с саркомой.

Пример 10. Выработка цитокинов в ответ на hB6H12.3.

Образцы свежей цельной крови от больных с онкологическим заболеванием (10 с саркомой, 3 с NSCLC, 3 с раком толстой кишки и 1 с меланомой) инкубировали с увеличивающимися концентрациями (максимальная концентрация, 20 мкг/мл) ФИТЦ-меченного hB6H12.3, или ФИТЦ-меченного Vel-IPV-hB6H12.3 или с 0,1 мкг/мл LPS в течение 20 ч при 37°C. Уровни цитокинов оценивали с использованием 38-плексной панели цитокинов и хемокинов на основе магнитных шариков.

В большинстве протестированных образцов пациентов умеренная выработка цитокинов индуцировалась hB6H12.3, и минимальная выработка цитокинов индуцировалась Vel-IPV-hB6H12.3. Цитокины IP-10, IL-1 α , MIP-1 α и MIP-1 β чаще всего индуцировались hB6H12.3. Уровни IL-1 α (фиг. 46B), MIP-1 α и MIP-1 β были ниже 200 пг/мл при максимальной концентрации тестируемого hB6H12.3, тогда как уровни IP-10 достигали 4000-5000 нг/мл (фиг. 46A). Уровни цитокинов, продуцируемых Vel-IPV-hB6H12.3, были ниже, чем уровни, продуцируемые hB6H12.3, во всех случаях и обычно были в 100-1000 раз ниже.

Пример 11. hB6H12.3 индуцирует апоптоз in vivo.

Бестимусным мышам, несущим опухоли-ксенотрансплантата фибросаркомы человека HT1080, вво-

дили в/б дозу 5 мг/кг hB6H12.3, Vel-IPV-hB6H12.3 или контрольный изотип hlgG1, когда опухоли достигали 200 мм³. В определенные моменты времени (после 24 и 96 часов) мышей умерщвляли и производили забор опухолей. Опухоли гомогенизировали, и опухолевые клетки ксенотрансплантата фибросаркомы человека HT1080 ресуспендировали при 1 млн клеток/мл в 1X буфере для окрашивания аннексином V (10-кратном буфере для окрашивания, содержащем 50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12,5 mM CaCl₂, pH 7,4, с разведением 1:10 в воде). Клетки переносили в круглодонный 96-луночный планшет (100 мкл/лунку) и в каждую лунку добавляли 5 мкл окрашивающего реагента ФИТЦ Аннексин V (Annexin V-FITC) и 1 мкл 100 мкг/мл раствора для ультрафиолетового окрашивания Live/Dead. Клетки окрашивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Образцы центрифугировали при 1550 g в течение 5 мин, супернатант удаляли и клетки промывали 3 раза 1x охлажденным буфером для окрашивания аннексином V. Клетки ресуспендировали в 100 мкл 1X буфера для окрашивания аннексином V. Апоптоз оценивали проточной цитометрией на цитометре LSRII как процент клеток, положительных по связыванию аннексина V с поверхностным фосфатидилсерином. Клетки, которые окрашены положительно Live/Dead красителем, были исключены из анализа.

Как показано на фиг. 47, в опухолях, подвергшихся воздействию как hB6H12.3, так и Vel-IPV-hB6H12.3, наблюдалось увеличение аннексии V+апоптотных клеток через 96 часов после воздействия по сравнению с образцами опухолей, которые не подвергались воздействию или подвергались воздействию контрольным изотипом.

Некоторые неограничивающие варианты реализации данного изобретения

Вариант реализации 1. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

CDR, представленные как SEQ ID NO: 16 (GYGMS), 17 (TITSGGTYTYYPDSVKG), и 18 (SLAG-NAMDY); и каркасную последовательность IGHV3-23/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 88, при этом положения каркасной последовательности H44, H49, H82, H89, H91 и H94, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора.

Вариант реализации 2. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

CDR, представленные как SEQ ID NO: 16 (GYGMS), 17 (TITSGGTYTYYPDSVKG), и 18 (SLAG-NAMDY); и

каркасную последовательность IGHV3-48/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 89, при этом положение каркасной последовательности H49, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляет собой остаток донора.

Вариант реализации 3. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

CDR, представленные как SEQ ID NO: 16 (GYGMS), 17 (TITSGGTYTYYPDSVKG), и 18 (SLAG-NAMDY); и

каркасную последовательность IGHV3-66/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 90, при этом положения каркасной последовательности H29, H49, и H82, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора; или

Вариант реализации 4. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

CDR, представленные как SEQ ID NO: 16 (GYGMS), 17 (TITSGGTYTYYPDSVKG), и 18 (SLAG-NAMDY); и

каркасную последовательность IGHV3-74/HJ4 человека, представленную в SEQ ID NO: 91, при этом положение каркасной последовательности H49, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляет собой остаток донора.

Вариант реализации 5. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации данного изобретения 1-4, при этом указанная переменная область легкой цепи содержит:

CDR, представленные как SEQ ID NO: 31 (RASQTISDY LH), 32 (FASQSI S), и 33 (QNGHGFPR T); и

каркасную последовательность IGKV6-21/KJ2 человека, представленную в SEQ ID NO: 92, при этом положения каркасной последовательности L4, L21 L69 и L85, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора.

Вариант реализации 6. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по лю-

бому из вариантов реализации данного изобретения 1-4, при этом указанная вариабельная область легкой цепи содержит:

CDR, представленные как SEQ ID NO: 31 (RASQTISDYLN), 32 (FASQSSIS), и 33 (QNGHGFPRRT); и каркасную последовательность IGKV1-27/KJ2 человека, представленную в SEQ ID NO: 93, при этом положения каркасной последовательности L21, L49 и L69, в соответствии с нумерацией по Кабату, представляют собой остатки донора.

Вариант реализации 7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации данного изобретения 1-4, при этом H29 занято F, H44 занято R или G, H49 занято A, H82 занято M или I, H89 занято I или V, H91 занято F или Y и H94 занято R, в соответствии с нумерацией по Кабату.

Вариант реализации 8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту реализации данного изобретения 5, при этом L4 занято M, L21 занято L, L49 занято K, L69 занято T или S, L85 занято V или T, в соответствии с нумерацией по Кабату.

Вариант реализации 9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации данного изобретения 1-4, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую идентичность последовательности, по меньшей мере, 90% относительно любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую идентичность последовательности, по меньшей мере, 90% относительно любой из SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 и 15.

Вариант реализации 10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту реализации данного изобретения 5, дополнительно включающее мутацию G91A в LCDR3, в соответствии с нумерацией по Кабату.

Вариант реализации 11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации данного изобретения 1-4, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой изотип IgG1.

Вариант реализации 12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации данного изобретения 1-4, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают повышенной антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ) по сравнению с их исходным антителом.

Вариант реализации 13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации данного изобретения 1-4, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают повышенным антителозависимым клеточным фагоцитозом (АЗКФ) по сравнению с их исходным антителом.

Вариант реализации 14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации данного изобретения 1-4, имеющие пониженное фукозилирование остова по сравнению с их исходным антителом.

Вариант реализации 15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации данного изобретения 1-4, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует взаимодействие между CD47 и SIRP α .

Вариант реализации 16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации данного изобретения 1-4, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеют пониженную гемагглютинацию эритроцитов по сравнению с исходным антителом.

Вариант реализации 17. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации данного изобретения 1-4.

Вариант реализации 18. Антигенсвязывающий фрагмент по варианту реализации данного изобретения 1, содержащий Fab, Fab', F(ab')₂, фрагмент Fv, диатело, одноцепочечное антитело, фрагмент scFv или scFv-Fc.

Вариант реализации 19. Способ лечения онкологического заболевания, характеризующегося CD47, у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего экранирующий агент, при этом экранирующий агент содержит один или более суперспиральных пептидов, которые снижают аффинность связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с CD47 человека по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента.

Вариант реализации 20. Способ по варианту реализации данного изобретения 19, в котором пригодный для расщепления протеазой линкер присоединяет экранирующий агент к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту.

Вариант реализации 21. Способ по варианту реализации данного изобретения 20, в котором пригодный для расщепления протеазой линкер имеет аминокислотную последовательность, содержащую IPVSLRSG (SEQ ID NO: 73) или GPLGVR (SEQ ID NO: 57).

Вариант реализации 22. Способ по варианту реализации данного изобретения 20, в котором пригодный для расщепления протеазой линкер содержит сайт расщепления матриксной металлопротеазой (ММП).

Вариант реализации 23. Способ по варианту реализации данного изобретения 22, в котором сайт расщепления ММП выбран из группы, состоящей из сайта расщепления ММП2, сайта расщепления

ММП7, сайта расщепления ММП9 и сайта расщепления ММП13.

Вариант реализации 24. Способ по варианту реализации данного изобретения 22, в котором экранирующий агент высвобождается из антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента после расщепления сайта расщепления ММП в микроокружении опухоли с помощью ММП.

Вариант реализации 25. Способ по варианту реализации данного изобретения 24, в котором расщепленное антитело против CD47 имеет фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления ММП.

Вариант реализации 26. Способ по варианту реализации данного изобретения 25, в котором фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления содержит последовательность LRSG, SG или VR на N-конце антитела.

Вариант реализации 27. Способ по варианту реализации данного изобретения 19, в котором один или более суперспиральных пептидов содержат одну или более последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 и 56.

Вариант реализации 28. Способ по варианту реализации данного изобретения 19, в котором связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента с CD47 уменьшается, по меньшей мере, в около 100 раз по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента.

Вариант реализации 29. Способ по варианту реализации данного изобретения 19, в котором связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента с CD47 уменьшается от в около 200 раз до в около 1500 раз по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента.

Вариант реализации 30. Способ по варианту реализации данного изобретения 19, в котором онкологическое заболевание, характеризующееся экспрессией CD47, представляет собой гемобластоз, который вызывает солидный рак.

Вариант реализации 31. Способ по варианту реализации данного изобретения 30, в котором гемобластоз выбран из группы, состоящей из неходжкинской лимфомы, В-лимфобластной лимфомы; В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза/лимфомы из малых лимфоцитов, синдрома Рихтера, фолликулярной лимфомы, множественной миеломы, миелофиброза, истинной полицитемии, Т-клеточной лимфомы кожи, моноклональной гаммапатии неустановленной этиологии (MGUS), миелодиспластического синдрома (MDS), иммунобластной крупноклеточной лимфомы, В-лимфобластного лейкоза из клеток-предшественников, острого миелоидного лейкоза (AML) и анапластической крупноклеточной лимфомы.

Вариант реализации 32. Способ по варианту реализации данного изобретения 19, в котором онкологическое заболевание, характеризующееся экспрессией CD47, представляет собой солидный рак.

Вариант реализации 33. Способ по варианту реализации данного изобретения 32, в котором солидный рак выбран из группы, состоящей из рака легких, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака печени, рака яичника, рака яичка, рака почки, рака мочевого пузыря, рака позвоночника, рака головного мозга, рака шейки матки, рака эндометрия, колоректального рака, рака анального канала, рака пищевода, рака желчного пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, саркомы, рака головы и шеи, меланомы, рака кожи, рака простаты, рака гипофиза, рака матки, рака влагалища и рака щитовидной железы.

Вариант реализации 34. Способ по варианту реализации данного изобретения 32, в котором солидный рак выбран из группы, состоящей из рака легких, саркомы мягких тканей, колоректального рака, рака головы и шеи и рака молочной железы.

Вариант реализации 35. Способ по варианту реализации данного изобретения 19, в котором субъект представляет собой человека, болеющего солидным раком.

Вариант реализации 36. Способ по варианту реализации 19 данного изобретения, в котором антитело против CD47 вводят в комбинации с ингибитором молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из одного или более из белка запрограммированной смерти клетки 1 (PD-1), лиганда запрограммированной смерти клетки 1 (PD-L1), PD-L2, цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA-4), белка 3, содержащего домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), ген активации лимфоцитов 3 (LAG-3), карциномэмбриональной антигензависимой молекулы клеточной адгезии 1 (CEACAM-1), CEACAM-5, V-доменного иммуноглобулинового супрессора активации Т-клеток (VISTA), В- и Т-лимфоцитарного аттенуатора (BTLA), Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT), иммуноглобулино-подобного рецептора, ассоциированного с лейкоцитами (типа 1) (LAIR1), CD160, 2B4 или TGFR.

Вариант реализации 37. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с белком CD47 человека, содержащее экранирующий агент, при этом экранирующий агент содержит один или более суперспиральных пептидов, содержащих последовательность

SEQ ID NO: 95 (QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLGS) и/или

SEQ ID NO: 94 (QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGs), и при этом один или более суперспиральных пептидов снижают аффинность связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с белком CD47 человека по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента.

Вариант реализации 38. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту реализации дан-

ного изобретения 37, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую идентичность последовательности, по меньшей мере, 90% относительно любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую идентичность последовательности, по меньшей мере, 90% относительно любой из SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 и 15.

Вариант реализации 39. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту реализации данного изобретения 37, при этом экранирующий агент присоединяется к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту через пригодный для расщепления протеазой линкер.

Вариант реализации 40. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту реализации данного изобретения 39, при этом пригодный для расщепления протеазой линкер имеет аминокислотную последовательность, содержащую IPVSLRSG (SEQ ID NO: 73) или GPLGVR (SEQ ID NO: 57).

Вариант реализации 41. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту реализации данного изобретения 39, при этом пригодный для расщепления протеазой линкер содержит сайт расщепления матриксной металлопротеазой (ММП).

Вариант реализации 42. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту реализации данного изобретения 41, при этом сайт расщепления ММП выбран из группы, состоящей из сайта расщепления ММП2, сайта расщепления ММП7, сайта расщепления ММП9 и сайта расщепления ММП3.

Вариант реализации 43. Антитело по варианту реализации данного изобретения 37, при этом экранирующий агент удаляется из антитела против CD47 после расщепления сайта расщепления ММП с помощью ММП.

Вариант реализации 44. Антитело по варианту реализации данного изобретения 43, при этом антитело против CD47 имеет фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления ММП после расщепления сайта расщепления ММП с помощью ММП.

Вариант реализации 45. Антитело по варианту реализации данного изобретения 44, при этом фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления содержит последовательность LRSG, SG или VR на N-конце антитела.

Вариант реализации 46. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту реализации данного изобретения 37, при этом связывание уменьшается, по меньшей мере, в около 100 раз по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента.

Вариант реализации 47. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту реализации данного изобретения 37, при этом связывание уменьшается от в около 200 раз до в около 1500 раз по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента.

Вариант реализации 48. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту реализации данного изобретения 37, содержащее последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 42 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 43.

Вариант реализации 49. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации данного изобретения 37-48, содержащее вариант Fc-области, которая придает усиленную эффекторную функцию, выбранную из активности АЗКЦ и/или КЗЦ.

Вариант реализации 50. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту реализации данного изобретения 49, которое является афукозилированным.

Вариант реализации 51. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, при этом антитело представляет собой изотип IgG1.

Вариант реализации 52. Антитело по варианту реализации 51 данного изобретения, содержащее повышенную АЗКЦ, повышенный АЗКФ и/или повышенную активность КЗЦ.

Вариант реализации 53. Способ лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, у субъекта, включающий этапы:

а) идентификация субъекта как имеющего повышенные уровни ММП в опухоли по сравнению с окружающей тканью, не являющейся раковой; и

б) введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего экранирующий агент, при этом экранирующий агент содержит суперспиральные пептиды, которые снижают аффинность связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с CD47 человека по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента, если субъект имеет повышенные уровни ММП в опухоли по сравнению с окружающей тканью, не являющейся раковой.

Вариант реализации 54. Способ по варианту реализации данного изобретения 53, в котором ММП выбрана из группы, состоящей из: ММП2, ММП7, ММП9 и ММП13.

Вариант реализации 55. Способ по варианту реализации данного изобретения 53, в котором этап а) включает:

i) получение от субъекта раковой ткани и ткани, не являющейся раковой;

ii) обнаружение ММП в выделенной раковой ткани и в ткани, не являющейся раковой; и

iii) сравнение количественной оценки окрашивания в раковой ткани по сравнению с тканью, не являющейся раковой.

Вариант реализации 56. Способ лечения онкологического заболевания, характеризующегося экс-

прессией CD47, у субъекта, включающий этапы:

- а) идентификация субъекта как имеющего повышенные уровни CD47 в опухоли по сравнению с окружающей тканью, не являющейся раковой; и
- б) введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего экранирующий агент, при этом экранирующий агент содержит суперспиральные пептиды, которые снижают аффинность связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с CD47 человека по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента, если субъект имеет повышенные уровни CD47 в опухоли по сравнению с окружающей тканью, не являющейся раковой.

Вариант реализации 57. Способ по варианту реализации данного изобретения 56, в котором этап а) включает:

- i) получение от субъекта раковой ткани и окружающей ткани, не являющейся раковой;
- ii) обнаружение CD47 в выделенной раковой ткани и окружающей ткани, не являющейся раковой; и
- iii) сравнение количественной оценки окрашивания CD47 в раковой ткани по сравнению с окрашиванием CD47 в ткани, не являющейся раковой.

Вариант реализации 58. Способ лечения онкологического заболевания, характеризующегося экспрессией CD47, у субъекта, включающий этапы:

- а) идентификация субъекта с повышенными уровнями инфильтрации макрофагов в раковой ткани по сравнению с тканью, не являющейся раковой; и
- б) введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего экранирующий агент, при этом экранирующий агент содержит один или более суперспиральный пептид, который снижает аффинность связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с CD47 человека по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без экранирующего агента, если субъект имеет повышенные уровни инфильтрации макрофагов в опухоли по сравнению с тканью, не являющейся раковой.

Вариант реализации 59. Способ по варианту реализации данного изобретения 58, в котором этап а) включает:

- i) получение от субъекта раковой ткани и окружающей ткани, не являющейся раковой;
- ii) обнаружение макрофагов в выделенной раковой ткани и в ткани, не являющейся раковой; и
- iii) сравнение количественной оценки окрашивания в раковой ткани по сравнению с тканью, не являющейся раковой.

Вариант реализации 60. Способ по варианту реализации данного изобретения 58, в котором окрашивание макрофагов проводят с использованием антитела против CD163.

Вариант реализации 61. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают CD47 человека, содержащее вариательную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую идентичность последовательности, по меньшей мере, 90% относительно любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8, и вариательную область легкой цепи (LCVR), имеющую идентичность последовательности, по меньшей мере, 90% относительно любой из SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 и 15, при этом антитело дополнительно содержит последовательность LRSG, SG или VR на N-конце HCVR и/или LCVR.

Вариант реализации 62. Способ лечения онкологического заболевания путем введения комбинации экранированного антитела против CD47 по варианту реализации данного изобретения 37 с агонистическим антителом против CD40.

Вариант реализации 63. Способ по варианту реализации данного изобретения 62, в котором агонистическое антитело против CD40 имеет низкие уровни фукозилирования, например, антитело SEA-CD40.

Вариант реализации 64. Способ лечения онкологического заболевания путем введения комбинации экранированного антитела против CD47 по варианту реализации данного изобретения 37 с конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC), при этом антитело ADC специфически связывается с белком, который экспрессируется на внеклеточной поверхности раковой клетки и антитело конъюгировано с соединением линкер-лекарственное средство, содержащим цитотоксический агент.

Вариант реализации 65. Способ по варианту реализации данного изобретения 64, в котором цитотоксический агент представляет собой ауристатин.

Способ по варианту реализации данного изобретения 64, в котором антитело ADC конъюгировано с соединением линкер-лекарственное средство, выбранным из группы, состоящей из vcMMAE и mcMMAF.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CD47 человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариательную область легкой цепи и вариательную область тяжелой цепи, где вариательная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и вариательная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой изотип IgG1.

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

(i) повышенной антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) по сравнению с исходным антителом, и/или

(ii) повышенным антителозависимым клеточным фагоцитозом (ADCP) по сравнению с исходным антителом, и/или

(iii) повышенной комплемент-зависимой цитотоксичностью (CDC) по сравнению с их исходным антителом.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой Fab, Fab', F(ab')₂, фрагмент Fv, диатело, одноцепочечное антитело, фрагмент scFv или scFv-Fc.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют апоптоз клеток, экспрессирующих CD47, *in vitro* и/или *in vivo*.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, имеющие пониженное фукозилирование остова по сравнению с исходным антителом или которые являются афукозилированными.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокируют взаимодействие между CD47 и SIRP α .

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют пониженную гемагглютинацию эритроцитов по сравнению с Ab47, содержащим вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 2 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 10.

9. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8.

10. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.9.

11. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.9 или вектор экспрессии по п.10.

12. Клетка-хозяин, которая экспрессирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8.

13. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8, включающий культивирование клетки-хозяина по п.11 или 12.

14. Способ по п.13, дополнительно включающий выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

15. Композиция для индукции апоптоза клетки, экспрессирующей CD47, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8.

16. Композиция по п.15, в которой клетки находятся *in vitro*.

17. Композиция по п.15, в которой клетки находятся *in vivo*.

18. Экранированное антитело, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8 и по меньшей мере один экранирующий домен.

19. Экранированное антитело по п.18, где по меньшей мере один экранирующий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 44-55, 75-86, 94 и 95.

20. Экранированное антитело по п.18 или 19, где по меньшей мере один экранирующий домен снижает аффинность связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с белком CD47 человека по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без по меньшей мере одного экранирующего домена.

21. Экранированное антитело по п.20, где аффинность связывания снижается по меньшей мере в около 100 раз или от около 200 раз до около 1500 раз по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом без по меньшей мере одного экранирующего домена.

22. Экранированное антитело по любому из пп.18-21, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь и легкую цепь, где

тяжелая цепь связана с первым экранирующим доменом; или где

легкая цепь связана со вторым экранирующим доменом; или где

тяжелая цепь связана с первым экранирующим доменом и легкая цепь связана со вторым экранирующим доменом.

23. Экранированное антитело по п.22, где

первый экранирующий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 44, 46, 48, 50, 52, 54, 75, 77, 79, 81, 83, 85 и 94; и

второй экранирующий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 45, 47, 49, 51, 53, 55, 76, 78, 80, 82, 84, 86 и 95.

24. Экранированное антитело по п.23, где первый экранирующий домен и второй экранирующий домен представляют собой пару экранирующих доменов, выбранных из SEQ ID NO: 44 и 45; SEQ ID NO: 46 и 47; SEQ ID NO: 48 и 49; SEQ ID NO: 50 и 51; SEQ ID NO: 52 и 53; SEQ ID NO: 54 и 55; SEQ ID NO:

75 и 76; SEQ ID NO: 77 и 78; SEQ ID NO: 79 и 80; SEQ ID NO: 81 и 82; SEQ ID NO: 83 и 84; SEQ ID NO: 85 и 86; и SEQ ID NO: 94 и 95.

25. Экранированное антитело по любому из пп.22-24, где первый экранирующий домен связан с N-концом тяжелой цепи и второй экранирующий домен связан с N-концом легкой цепи.

26. Экранированное антитело по любому из пп.22-25, где каждый экранирующий домен содержит расщепляемый протеазой линкер и связан с тяжелой цепью или легкой цепью через расщепляемый протеазой линкер.

27. Экранированное антитело по п.26, где расщепляемый протеазой линкер содержит сайт расщепления матриксной металлопротеазой (ММР).

28. Экранированное антитело по п.27, где сайт расщепления ММР выбран из сайта расщепления ММР2, сайта расщепления ММР7, сайта расщепления ММР9 и сайта расщепления ММР13.

29. Экранированное антитело по п.27 или 28, где после расщепления с помощью ММР тяжелая цепь и/или легкая цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления ММР.

30. Экранированное антитело по п.29, где фрагмент из аминокислотных остатков сайта расщепления содержит последовательность LRS_G, SG или VR на N-конце антитела.

31. Экранированное антитело по любому из пп.18-30, содержащее тяжелую цепь, связанную с первым экранирующим доменом и имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и легкую цепь, связанную со вторым экранирующим доменом и имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

32. Нуклеиновая кислота, кодирующая экранированное антитело по любому из пп.18-31.

33. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.32.

34. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.32 или вектор экспрессии по п.33.

35. Клетка-хозяин, которая экспрессирует экранированное антитело по любому из пп.18-31.

36. Способ получения экранированного антитела по любому из пп.18-31, включающий культивирование клетки-хозяина по п.34 или 35.

37. Способ по п.36, дополнительно включающий выделение экранированного антитела.

38. Композиция для лечения CD47-экспрессирующего онкологического заболевания у пациента, содержащая анти-CD47 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8 или экранированное антитело по любому из пп.18-31.

39. Композиция для лечения CD40-экспрессирующего онкологического заболевания у пациента, содержащая экранированное антитело по любому из пп.18-31,

где пациент идентифицирован как имеющий повышенные уровни ММР в опухоли по сравнению с окружающей тканью, не являющейся раковой; и

где каждый экранирующий домен экранированного антитела содержит расщепляемый протеазой линкер, где расщепляемый протеазой линкер содержит сайт расщепления матриксной металлопротеазой (ММР).

40. Композиция по п.39, где ММР выбран из ММР2, ММР7, ММР9 и ММР13.

41. Композиция по п.39 или 40, где сайт расщепления ММР выбран из сайта расщепления ММР2, сайта расщепления ММР7, сайта расщепления ММР9 и сайта расщепления ММР13.

42. Композиция по любому из пп.39-41, где идентификация включает

i) взятие у пациента раковой ткани и ткани, не являющейся раковой;

ii) обнаружение ММР в выделенной раковой ткани и в ткани, не являющейся раковой; и

iii) сравнение количественной оценки окрашивания в раковой ткани по сравнению с тканью, не являющейся раковой.

43. Композиция по п.38, где пациент идентифицирован как имеющий CD47-экспрессирующее онкологическое заболевание, которое характеризуется экспрессией CD47.

44. Композиция по п.43, в которой идентификация включает

i) взятие раковой ткани; и

ii) обнаружение CD47 в выделенной раковой ткани.

45. Композиция по п.38, где пациент идентифицирован как имеющий повышенные уровни инфильтрации макрофагов в раковой ткани по сравнению с тканью, не являющейся раковой.

46. Композиция по п.45, где идентификация включает

i) взятие у пациента раковой ткани и окружающей ткани, не являющейся раковой;

ii) обнаружение макрофагов в выделенной раковой ткани и в ткани, не являющейся раковой; и

iii) сравнение количественной оценки окрашивания в раковой ткани по сравнению с тканью, не являющейся раковой.

47. Композиция по п.46, где окрашивание макрофагов проводят с использованием антитела против CD163.

48. Композиция по любому из пп.38-47, где онкологическое заболевание, характеризующееся экспрессией CD47, представляет собой гемобластоз или солидный рак.

49. Композиция по любому из пп.38-48, где CD47-экспрессирующее онкологическое заболевание выбрано из неходжкинской лимфомы, В-лимфобластной лимфомы; В-клеточного хронического лимфо-

цитарного лейкоза/лимфомы из малых лимфоцитов, синдрома Рихтера, фолликулярной лимфомы, множественной миеломы, миелофиброза, истинной полицитемии, Т-клеточной лимфомы кожи, моноклональной гаммапатии неустановленной этиологии (MGUS), миелодиспластического синдрома (MDS), иммунобластной крупноклеточной лимфомы, В-лимфобластного лейкоза из клеток-предшественников, острого миелоидного лейкоза (AML) и анапластической крупноклеточной лимфомы.

50. Композиция по любому из пп.38-48, где CD47-экспрессирующее онкологическое заболевание выбрано из рака легких, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака печени, рака яичника, рака яичка, рака почки, рака мочевого пузыря, рака позвоночника, рака головного мозга, рака шейки матки, рака эндометрия, колоректального рака, рака анального канала, рака пищевода, рака желчного пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, саркомы, рака головы и шеи, меланомы, рака кожи, рака простаты, рака гипофиза, рака матки, рака влагалища и рака щитовидной железы.

51. Композиция по п.50, где CD47-экспрессирующее онкологическое заболевание выбрано из рака легких, саркомы, колоректального рака, рака головы и шеи, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака желудка, меланомы и рака молочной железы.

52. Композиция по любому из пп.38-51, где композицию вводят в комбинации с ингибитором молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из одного или более из: белка запрограммированной смерти клетки 1 (PD-1), лиганда запрограммированной смерти клетки 1 (PD-L1), PD-L2, цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA-4), белка 3, содержащего домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3), карциномэмбриональной антигензависимой молекулы клеточной адгезии 1 (CEACAM-1), CEACAM-5, V-доменного иммуноглобулинового супрессора активации Т-клеток (VISTA), В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA), Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT), иммуноглобулино-подобного рецептора, ассоциированного с лейкоцитами (типа 1) (LAIR1), CD160, 2B4 или TGFR.

53. Композиция по любому из пп.38-52, где композицию вводят в комбинации с агонистическим антителом против CD40.

54. Композиция по п.53, где агонистическое антитело против CD40 имеет низкие уровни фукозилирования или является афукозилированным.

55. Композиция по любому из пп.38-54, где композицию вводят в сочетании с конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC), где антитело ADC специфически связывается с белком, который экспрессируется на внеклеточной поверхности раковой клетки и антитело конъюгировано с соединением линкер-лекарственное средство, содержащим цитотоксический агент.

56. Композиция по п.55, где цитотоксический агент представляет собой ауристатин.

57. Композиция по п.56, где антитело ADC конъюгировано с соединением линкер-лекарственное средство, выбранным из группы, состоящей из vcMMAE и mcMMAF.

58. Композиция по любому из пп.38-57, где экранированное антитело содержит по меньшей мере один экранирующий домен, содержащий расщепляемый протеазой линкер, отличающийся тем, что расщепляемый протеазой линкер расщепляется в микроокружении опухоли.

59. Композиция по п.58, где после расщепления пригодного для расщепления протеазой линкера в микроокружении опухоли экранирующий домен высвобождается из антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента.

60. Композиция по п.58 или 59, где расщепляемый протеазой линкер содержит аминокислотную последовательность IPVSLRSG (SEQ ID NO: 73) или GPLGVR (SEQ ID NO: 57).

61. Композиция по любому из пп.58-60, где расщепляемый протеазой линкер содержит сайт расщепления MMP.

62. Композиция по п.61, где сайт расщепления MMP выбран из группы, состоящей из сайта расщепления MMP2, сайта расщепления MMP7, сайта расщепления MMP9 и сайта расщепления MMP13.

63. Композиция по любому из пп.58-62, где после расщепления в микроокружении опухоли высвободившееся антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с CD47 с аффинностью, которая по меньшей мере в около 100 раз выше, от 200 раз до 1500 раз выше аффинности экранированного антитела к CD47.

64. Композиция по любому из пп.38-63, где антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент или антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент экранированного антитела проявляют пониженную гемагглютинацию *in vitro* по сравнению с исходным антителом против CD47.

65. Композиция по п.64, где исходное антитело представляет собой Ab47, содержащее варируемую область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 2 и варируемую область легкой цепи с SEQ ID NO: 10.

66. Композиция по любому из пп.38-65, где введение антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента или экранированного антитела не вызывает гемагглютинацию у пациента.

67. Композиция по любому из пп.38-66, где антитело против CD47, или его антигенсвязывающий фрагмент, или экранированное антитело вызывает апоптоз клеток, экспрессирующих CD47, *in vitro* и/или *in vivo*.

68. Композиция по п.67, где клетки, экспрессирующие CD47, представляют собой раковые клетки.

045361

[illegible]

Фиг. 1А

	10	20	30	40	50	60
Mu B6H12 vH	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSGYGMSWVRQTPDKRLEWVATITSGGTYYTYPDSVKGRFTI					
Hu IGHV3-48/HJ4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPKGLEWVSYSISGSSTIYYADSVKGRFTI					
hVH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMNWRQAPKGLEWVATITSGGTIYYADSVKGRFTI					
CDR no Кабаты			*****		*****	
IMGT CDRs			+++++++		+++++++	
	70	80	90	100	110	
Mu B6H12 vH	SRDNAKNLTLYLQIDSLKSEDTAIYFCARSLAGNAMDYWGQGTSVTVSS	(SEQ ID NO: 1)				
Hu IGHV3-48/HJ4	SRDNAKNSLYLQMNSLRLEDTAIVYYCAR----	YFDYWGGTLVTVSS	(SEQ ID NO: 89)			
hVH4	SRDNAKNSLYLQMNSLRLEDTAIVYYCARSLAGNAMDYWGQGTILTVSS	(SEQ ID NO: 6)				
CDR no Кабаты			*****			
IMGT CDRs			+++++++			

Фиг. 1В

	10	20	30	40	50	60
Mu B6H12 vH		EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSGYGSWVRQTPDKRLEWVAITISGGTYTYPDSVKGRTFI				
Hu IGHV3-66/HJ4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSNYMSWVRQAFGKGLEWVSIVLYSGGS-TYYADSVKGRTFI					
hvh5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGSWVRQAQGKGLEWVAITISGGTYTYYADSVKGRTFI					
CDR no Kabarty		*****			*****	
IMGT CDRs		+++++++			+++++++	
	70	80	90	100	110	
Mu B6H12 vH		SRDNAKNTLYLQIDSLKSEDTALYFCARSLAGNAMDYWGQGTSTVTSSS	(SEQ ID NO: 1)			
Hu IGHV3-66/HJ4	SRDNSKNTLYLQMNSLRaedTA VYYCAR-----YFDYWGGTLTVTSSS	(SEQ ID NO: 90)				
hvh5	SRDNSKNTLYLQINSLRAEDTA VYYCARSLAGNAMDYWGQGTPLTVTSSS	(SEQ ID NO: 7)				
CDR no Kabarty		*****				
IMGT CDRs		+++++++				

Фиг. 1С

[illegible]

Фиг. 1D

```

          10      20      30      40      50      60
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
hvH1  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGMSWVRQAPGKRLIEWVATITSGGTYTYPDSVKGRFTI
hvH2  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVATITSGGTYTYPDSVKGRFTI
hvH3  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVATITSGGTYTYPDSVKGRFTI
hvH4  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMNWSVRQAPGKGLEWVATITSGGTYTYPDSVKGRFTI
hvH5  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGMSWVRQAPGKGLEWVATITSGGTYTYPDSVKGRFTI
hvH6  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWSVRQAPGKGLVWVATITSGGTYTYPDSVKGRFTI
      CDR no Кабаты
      IMGT CDRs
          ++++++++
          ++++++++

          70      80      90      100     110
|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
hvH1  SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIFYFCARSLAGNAMDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 3)
hvH2  SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVFYFCARSLAGNAMDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 4)
hvH3  SRDNSKNTLYLQINSLRAEDTAVFYFCARSLAGNAMDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 5)
hvH4  SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYFCARSLAGNAMDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 6)
hvH5  SRDNSKNTLYLQINSLRAEDTAVYYFCARSLAGNAMDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 7)
hvH6  SRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYFCARSLAGNAMDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 8)
      CDR no Кабаты
      IMGT CDRs
          ++++++++
          ++++++++

```

Фиг. 1E

```

          10      20      30      40      50      60
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
hB6H12.3 vH (hvH1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGMSWVRQAPGKRLIEWVATITSGGTYTYPDSVKGRFTI
Mu B6H12 vH      EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSGYGMSWVRQTPDKRLIEWVATITSGGTYTYPDSVKGRFTI
Ab47 vH          EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGMSWVRQAPGKGLEWVATITSGGTYTYPDSVKGRFTI
      CDR no Кабаты
      IMGT CDRs
          ++++++++
          ++++++++

          70      80      90      100     110
|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
hB6H12.3 vH (hvH1) SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIFYFCARSLAGNAMDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 3)
Mu B6H12 vH      SRDNAKNTLYLQIDSLKSEDTAIFYFCARSLAGNAMDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 1)
Ab47 vH          SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYFCARSLAGNAMDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 2)
      CDR no Кабаты
      IMGT CDRs
          ++++++++
          ++++++++

```

Фиг. 1F

```

          10      20      30      40      50      60      70
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
Mu B6H12 vK      DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQTISDYLHWYQQKSHESPRLLIKFASQSI SGIPSRFSGSGSGSD
Hu 1GKV6-21/KJ2 EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSI SGVPSRFSGSGSGTD
hvK1             EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQSI SGVPSRFSGSGSGTD
hvK2             EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQSI SGVPSRFSGSGSGTD
hvK3             EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQSI SGVPSRFSGSGSGSD
      CDR no Кабаты
      IMGT CDRs
          ++++++
          +++

          80      90      100
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
Mu B6H12 vK      FTLSINSVEPEDVGVYQCQNGHGFPRTFGGGKLEIKR (SEQ ID NO: 9)
Hu 1GKV6-21/KJ2 FTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLP-TFGGQTKLEIKR (SEQ ID NO: 92)
hvK1             FTLTINSLEAEDAATYYCQNGHGFPRTFGGGQTKLEIKR (SEQ ID NO: 11)
hvK2             FTLTINSLEAEDAATYYCQNGHGFPRTFGGQTKLEIKR (SEQ ID NO: 12)
hvK3             FTLTINSLEAEDAATYYCQNGHGFPRTFGGQTKLEIKR (SEQ ID NO: 13)
      CDR no Кабаты
      IMGT CDRs
          ++++++++
          ++++++++

```

Фиг. 1G

```

      10      20      30      40      50      60      70
Mu B6H12 vK      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Hu IGKV1-27/KJ2  DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQTISDYLHWYQQKSHESPRLLIKFASQSIGIPSRFSGSGSGSD
hvK4             DIQMTQSPSSLSASVGDRTLTTCRASQTISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGSD
CDR no Кабаты   *****
IMGT CDRs       ++++++          +++

      80      90      100
Mu B6H12 vK      FTLTINSVEPEDVGYYCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 9)
Hu IGKV1-27/KJ2  FTLTISSLQPEDVATYYCQKYNAP-TFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 93)
hvK4             FTLTISSLQPEDVATYYCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 14)
CDR no Кабаты   *****
IMGT CDRs       ++++++++

```

Фиг. 1H

```

      10      20      30      40      50      60      70
hvK1             EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLTTCRASQTISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQSIGVPSRFSGSGSGSD
hvK2             EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLTTCRASQTISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQSIGVPSRFSGSGSGSD
hvK3             EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLTTCRASQTISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQSIGVPSRFSGSGSGSD
hvK4             DIQMTQSPSSLSASVGDRTLTTCRASQTISNYLAWYQQKPGKVPKLLIKFASTLQSGVPSRFSGSGSGSD
CDR no Кабаты   *****
IMGT CDRs       ++++++          +++

      80      90      100
hvK1             FTLTINSLEAEDAATYYCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 11)
hvK2             FTLTINSLEAEDAATYYCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 12)
hvK3             FTLTINSLEAEDAATYYCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 13)
hvK4             FTLTISSLQPEDVATYYCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 14)
CDR no Кабаты   *****
IMGT CDRs       ++++++++

```

Фиг. 1I

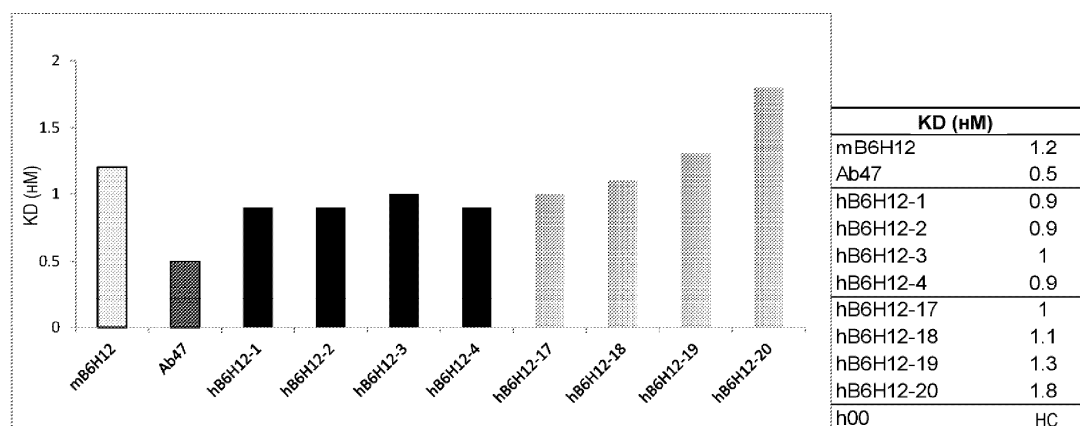
```

      10      20      30      40      50      60      70
hB6H12.3 vK (hvK3) EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLTTCRASQTISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQSIGVPSRFSGSGSGSD
Mu B6H12 vK        DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQTISDYLHWYQQKSHESPRLLIKFASQSIGIPSRFSGSGSGSD
Ab47 vK           EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTISDYLHWYQQKPGQAPRLIKFASQSIGIPARESGSGSGSD
CDR no Кабаты   *****
IMGT CDRs       ++++++          +++

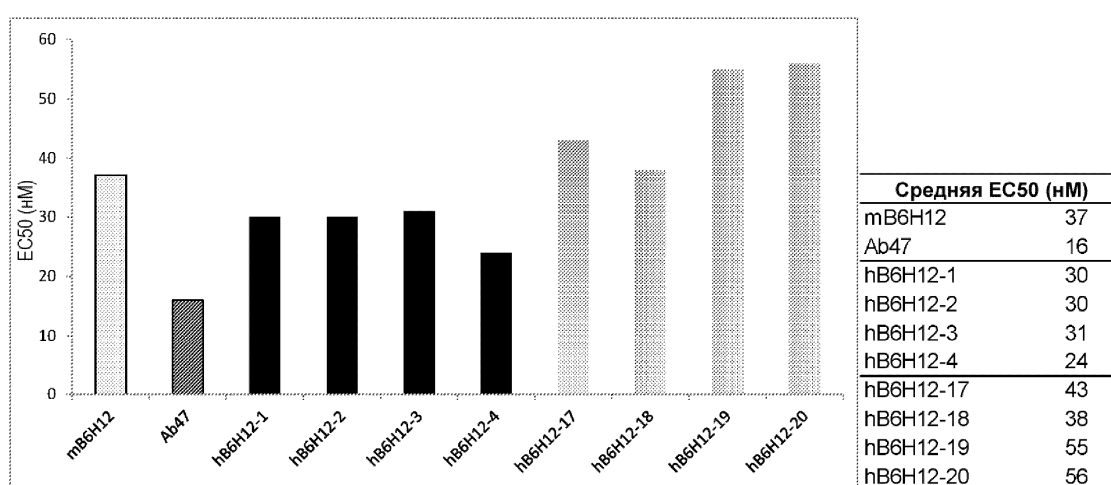
      80      90      100
hB6H12.3 vK (hvK3) FTLTINSLEAEDAATYYCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 13)
Mu B6H12 vK        FTLTINSVEPEDVGYYCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 9)
Ab47 vK           FTLTISSLQPEDFAVYYCQNGHGFPRTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 10)
CDR no Кабаты   *****
IMGT CDRs       ++++++++

```

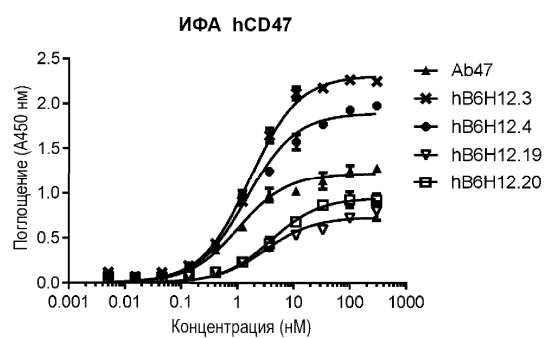
Фиг. 1J



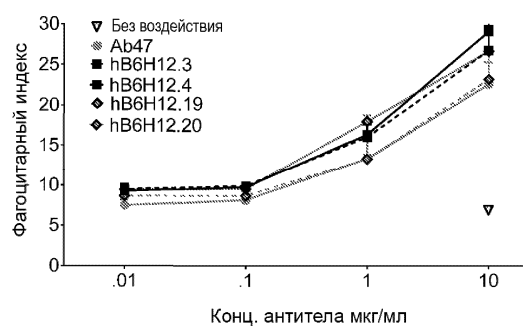
Фиг. 2А



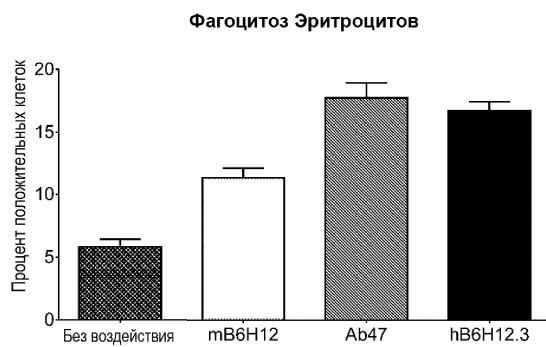
Фиг. 2В



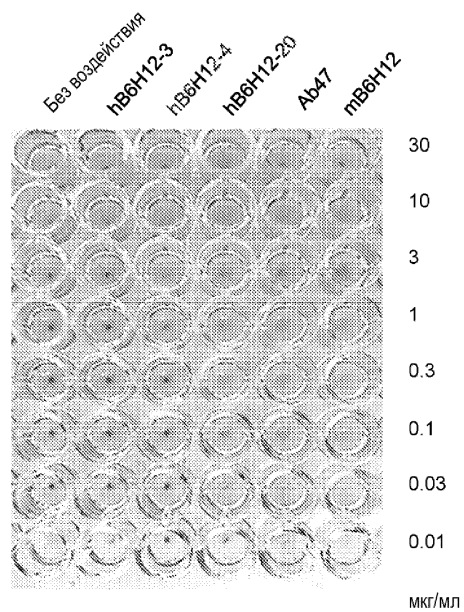
Фиг. 2С



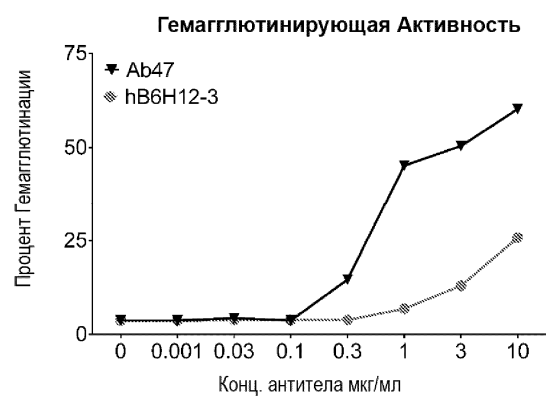
Фиг. 3А



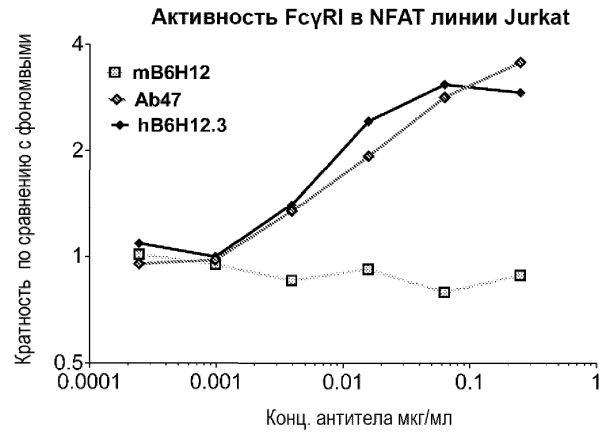
Фиг. 3В



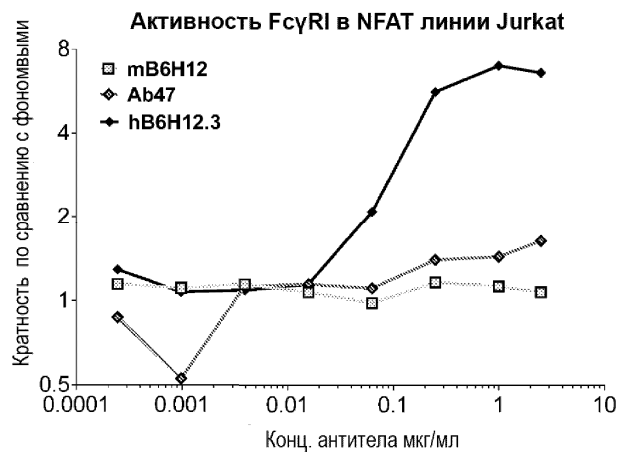
Фиг. 4А



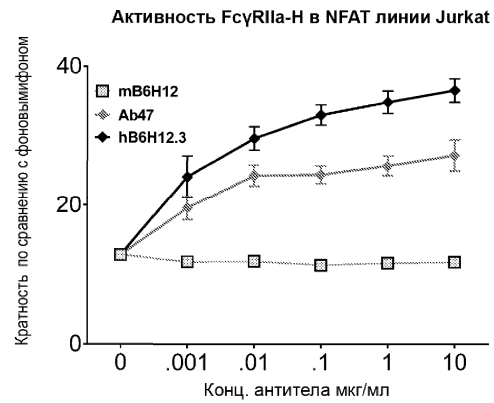
Фиг. 4В



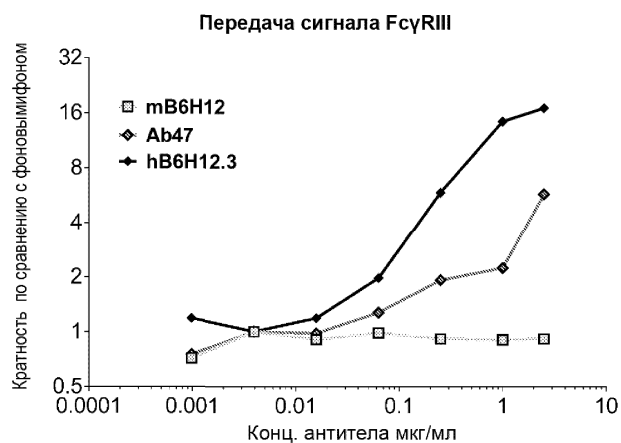
Фиг. 5А



Фиг. 5В



Фиг. 6А



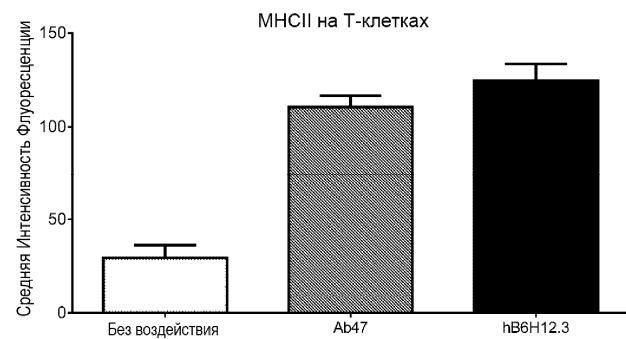
Фиг. 6B



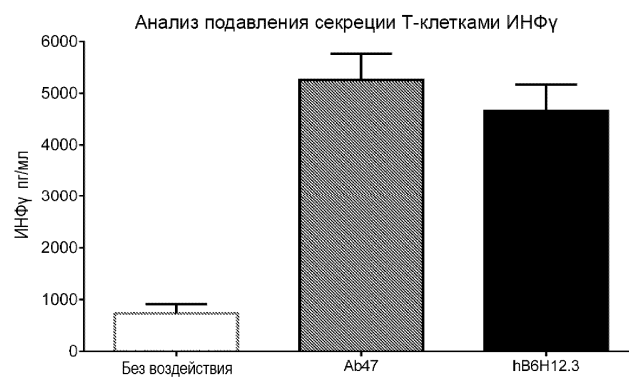
Фиг. 7A



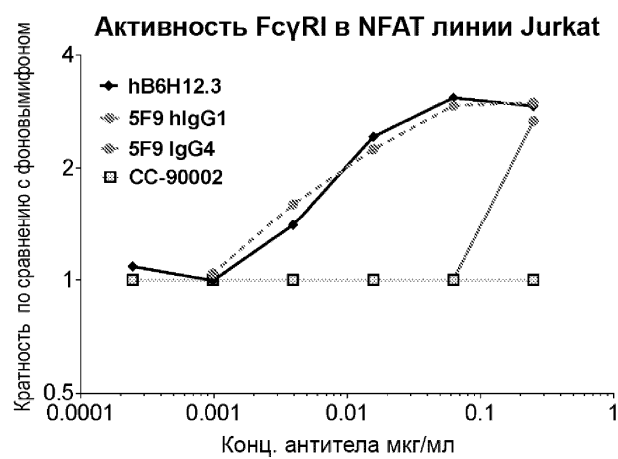
Фиг. 7B



Фиг. 7C

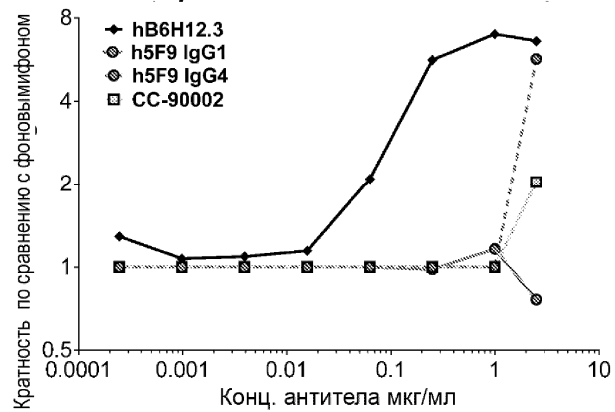


Фиг. 7D

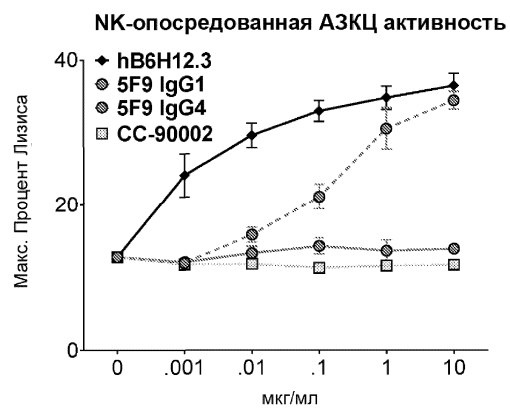


Фиг. 8А

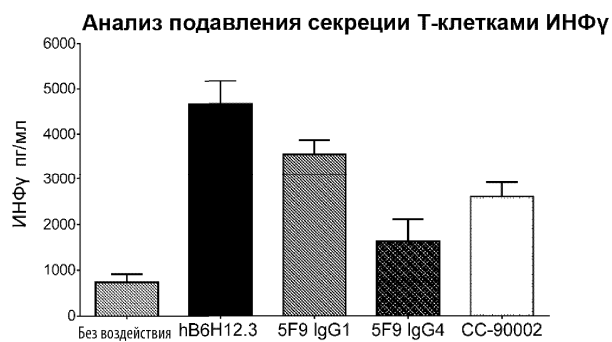
Активность FcγRI в NFAT линии Jurkat – АЗКФ Активность



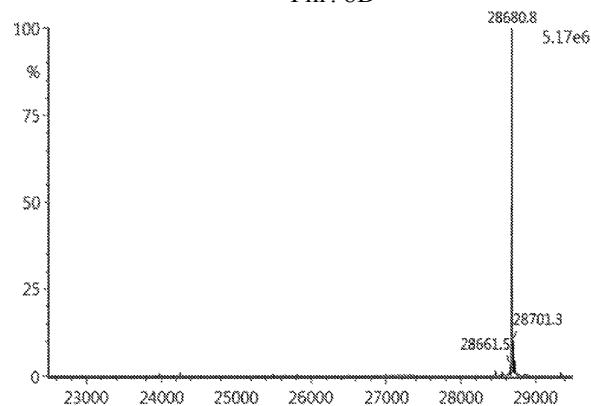
Фиг. 8В



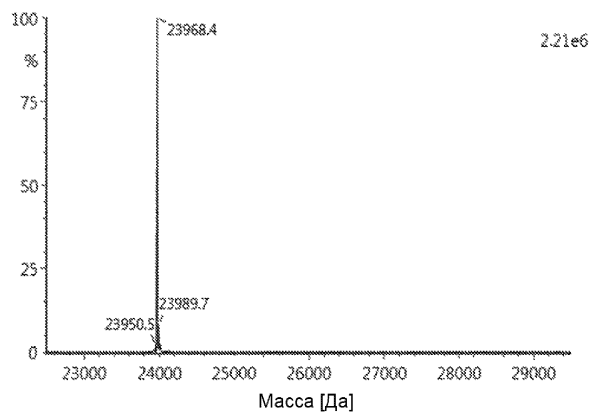
Фиг. 8С



Фиг. 8D

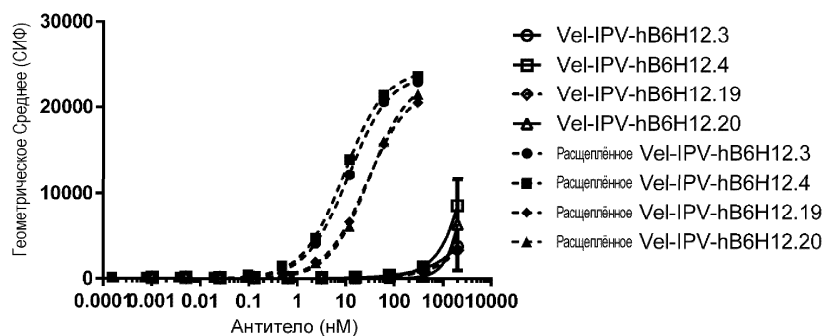


Фиг. 9А

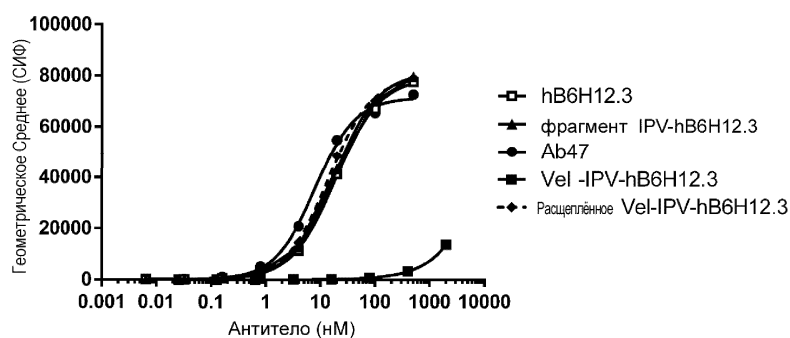


Фиг. 9В

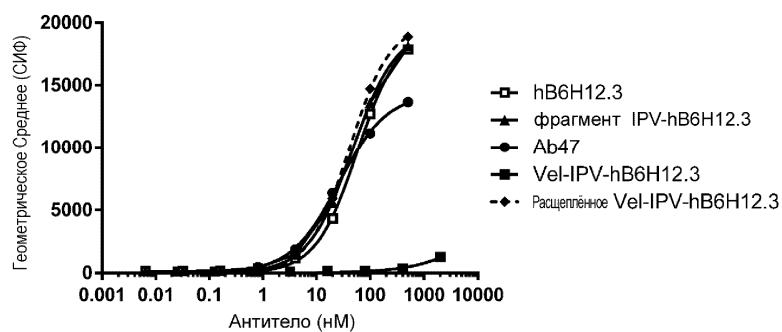
Клетки SW780



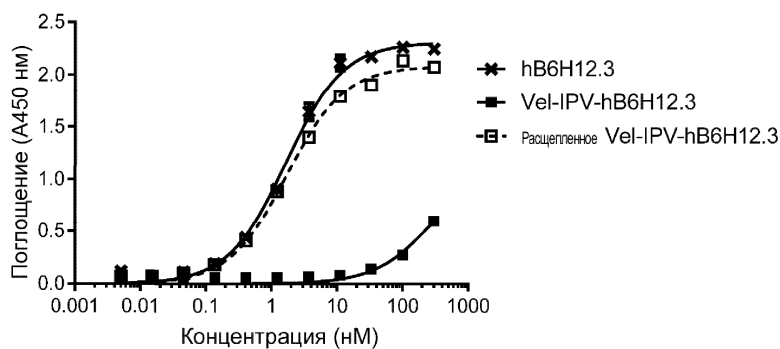
Клетки SW780



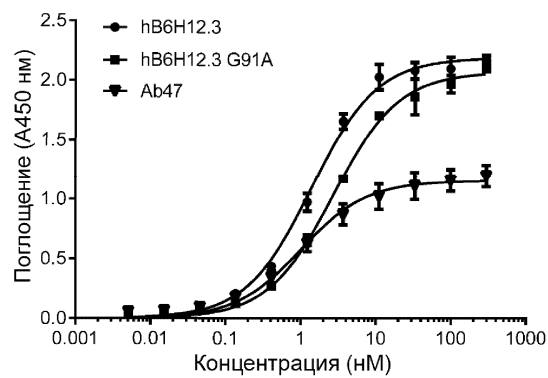
Эритроциты человека



ИФА hCD47

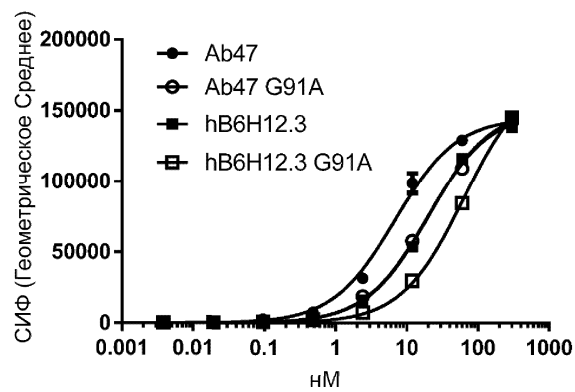


ИФА hCD47



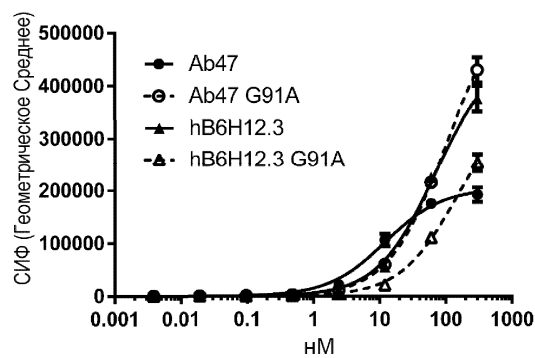
Фиг. 14

Клетки SW780



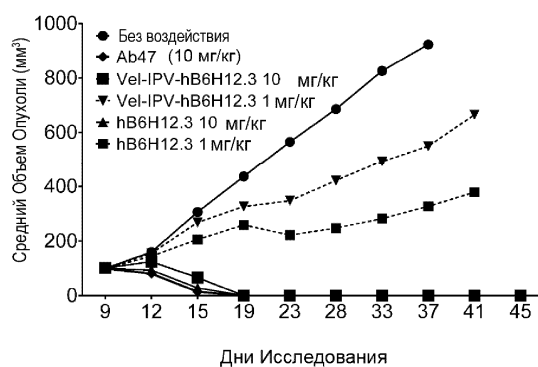
Фиг. 15

Эритроциты



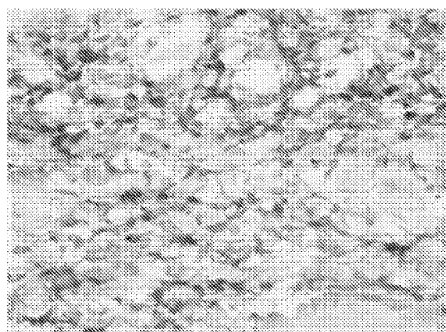
Фиг. 16

L428 Модель Опухоли Лимфомы



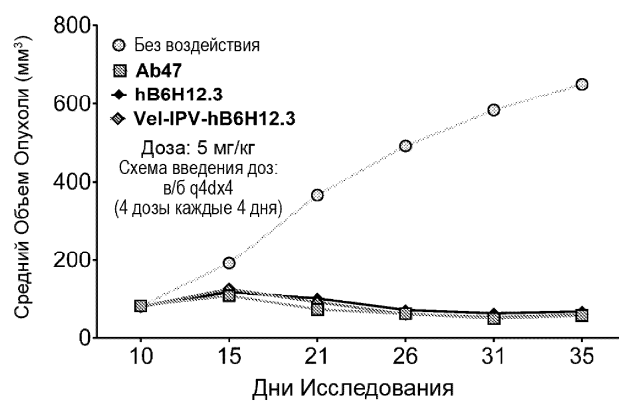
Фиг. 17А

L-428

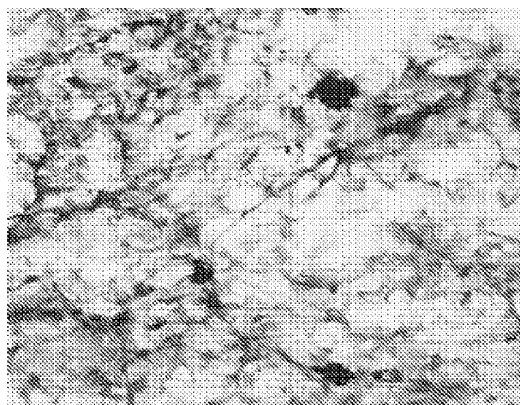


Макрофаг Мыши (детекция с помощью F4/80)

Фиг. 17В

Detroit562 (Ксенотрансплантатная Модель Рака Головы и Шеи)

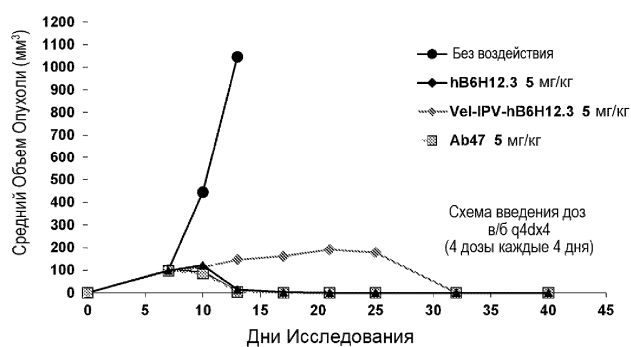
Фиг. 18А

Detroit 562

Макрофаг Мыши (детекция с помощью F4/80)

Фиг. 18В

SUDHL8 (Ксенотрансплантатная Модель Лимфомы)



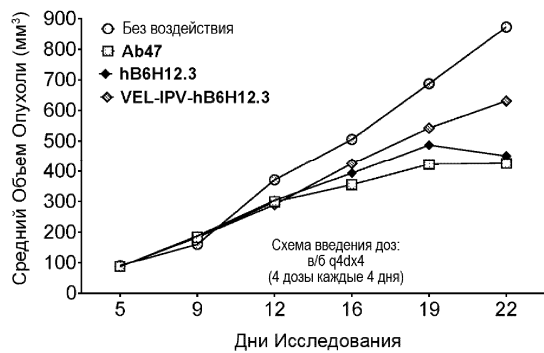
SUDHL8



Макрофаг Мыши (детекция с помощью F4/80)

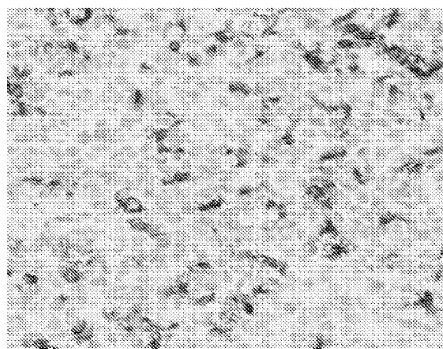
Фиг. 18D

HT1080 (Ксенотрансплантатная Модель Фибросаркомы)



045361

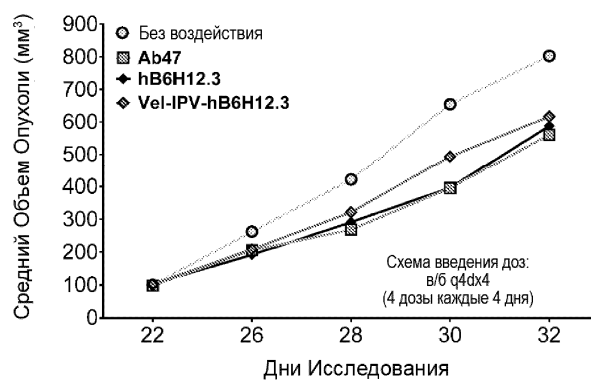
HT1080



Макрофаг Мыши (детекция с помощью F4/80)

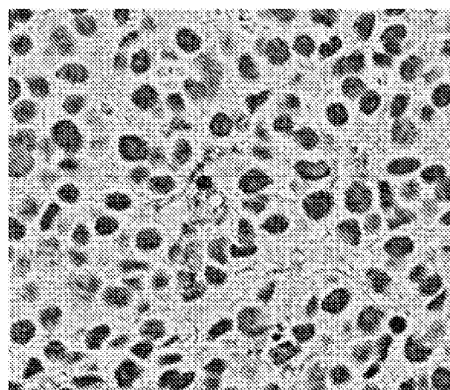
Фиг. 19В

HEPG2 (Ксенотрансплантатная Модель Печеночноклеточного Рака)



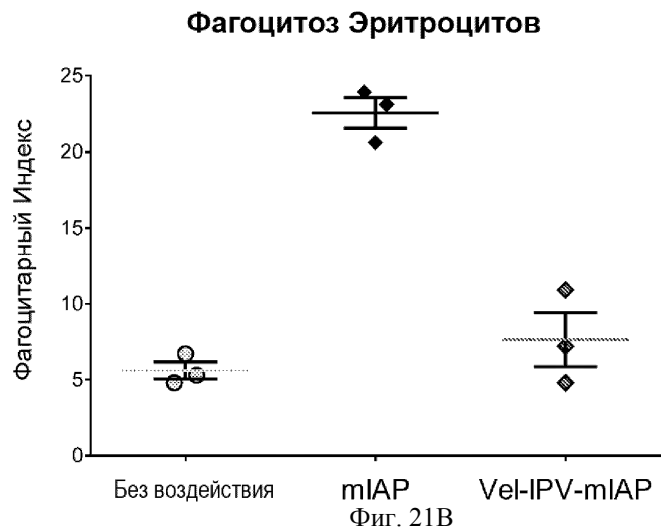
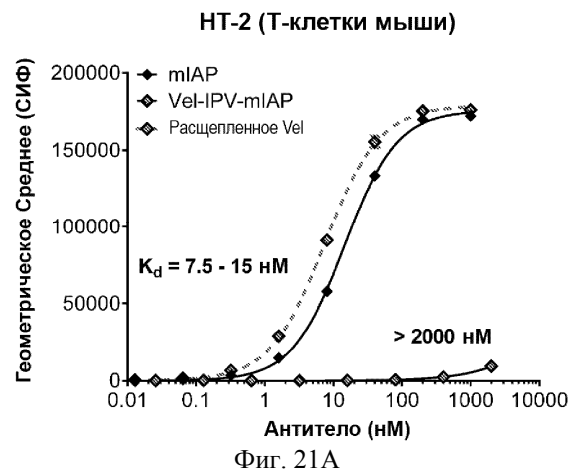
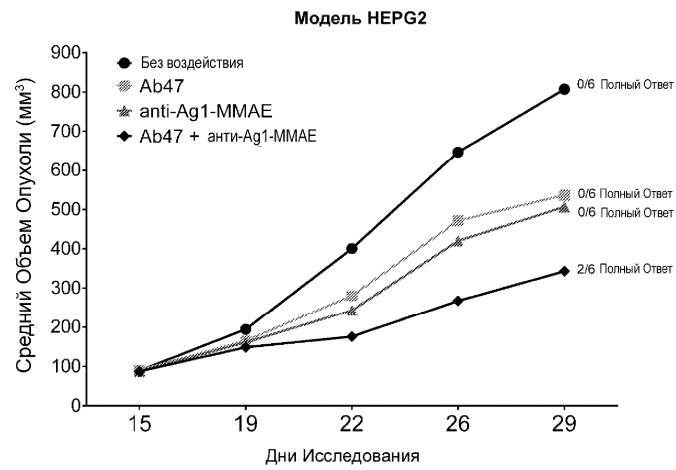
Фиг. 19С

HePG2

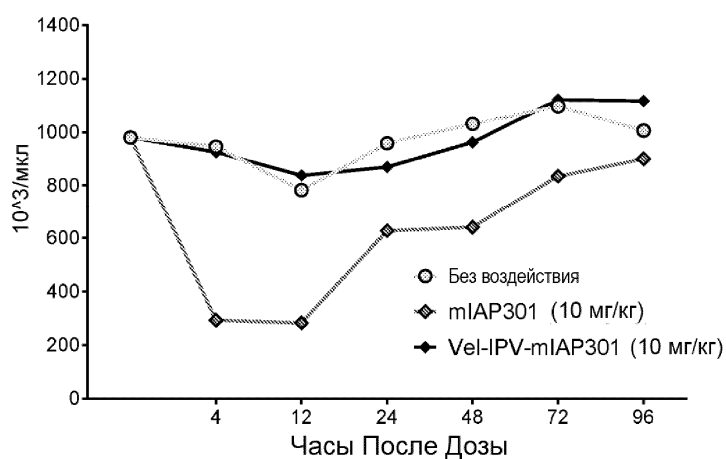


Макрофаг Мыши (детекция с помощью F4/80)

Фиг. 19D

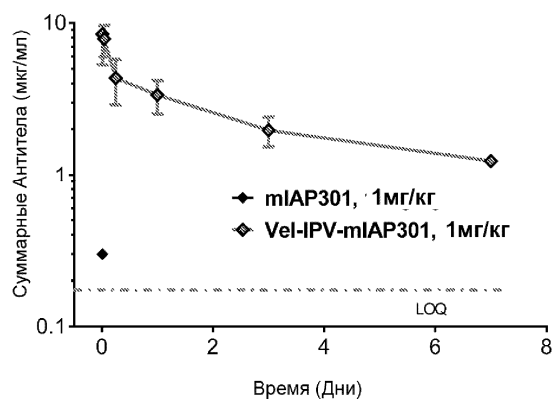


Тромбоциты Мыши



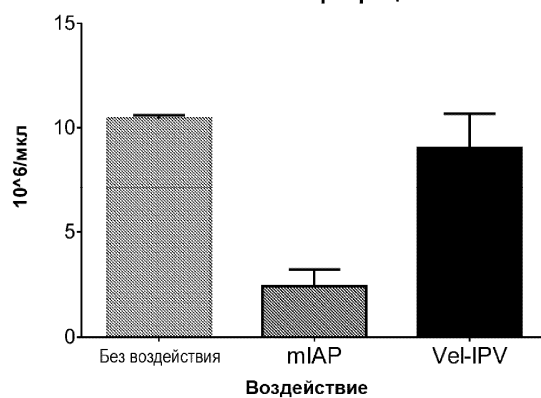
Фиг. 22А

ФК анализ с использованием мышинной модели

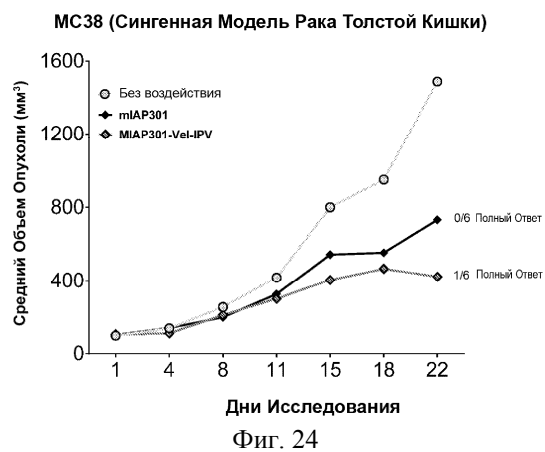
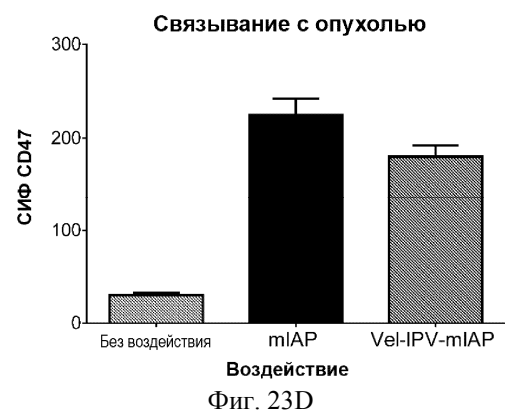
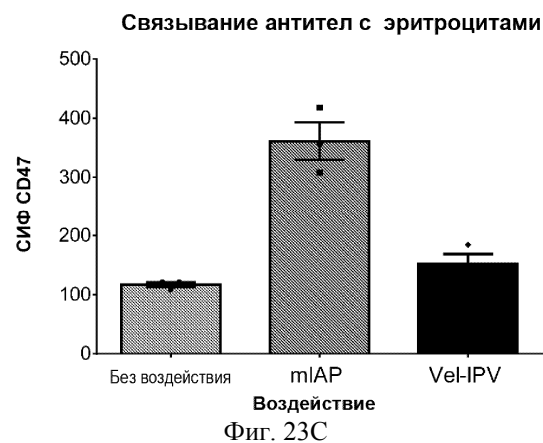
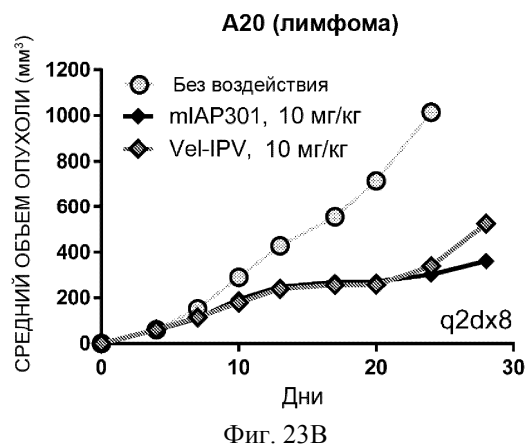


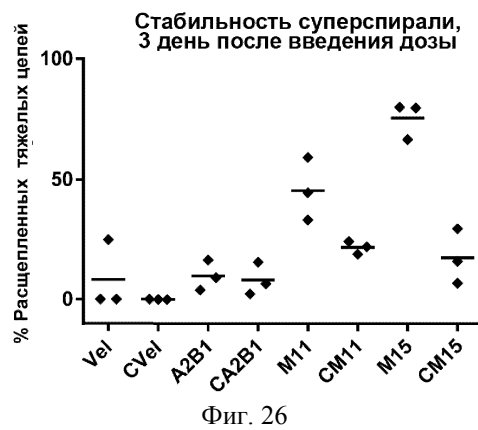
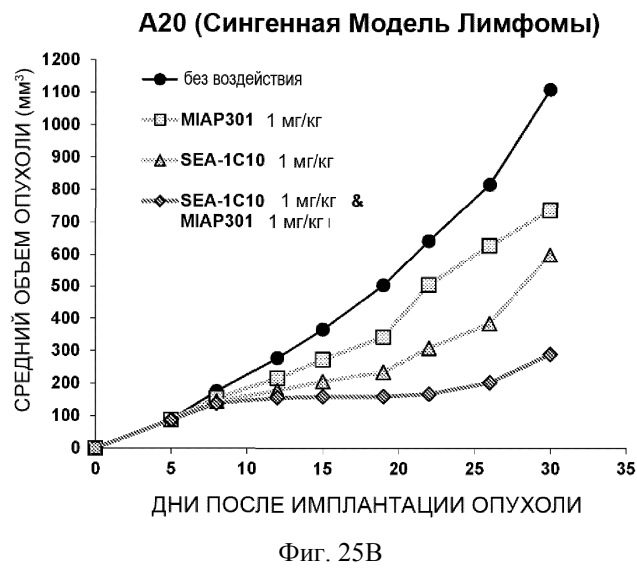
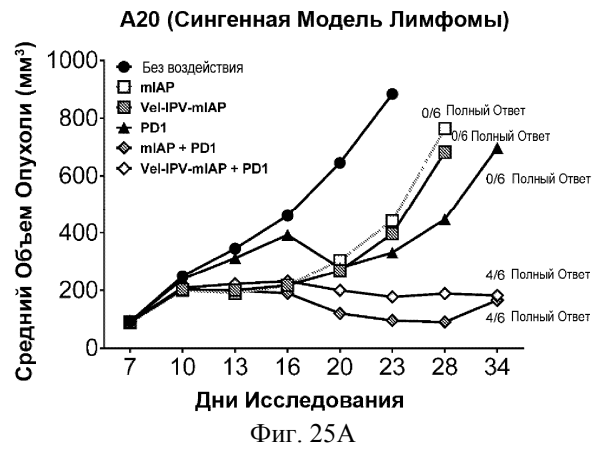
Фиг. 22В

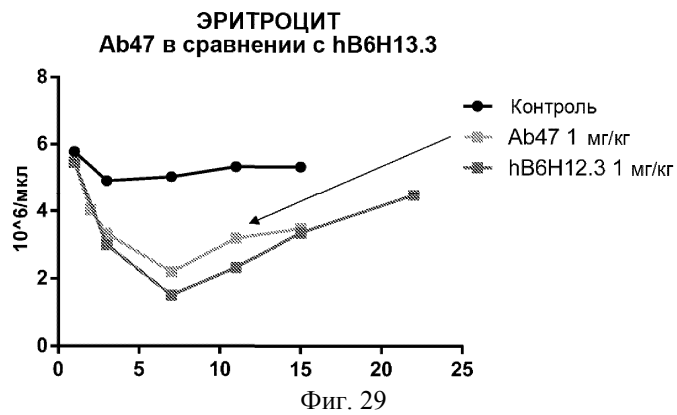
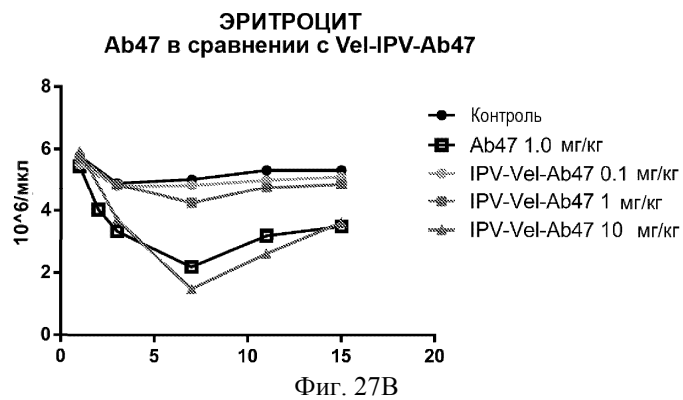
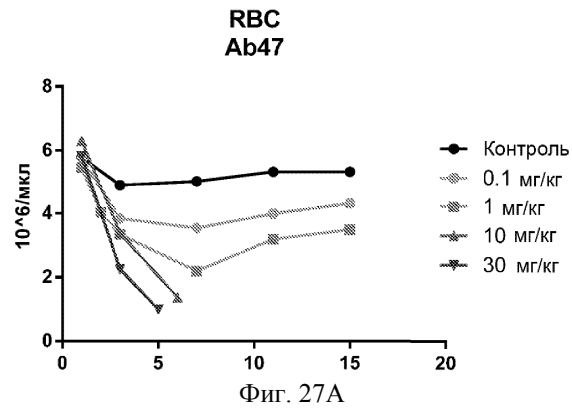
Количество Эритроцитов



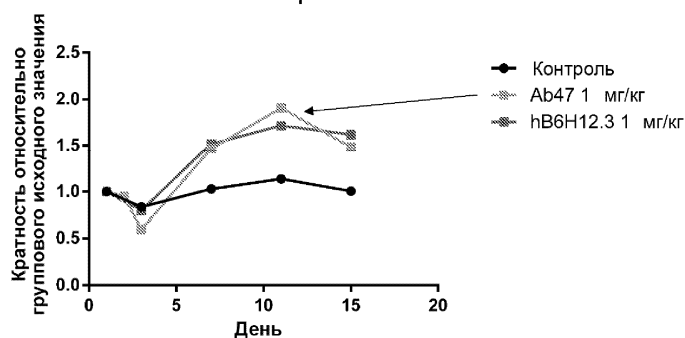
Фиг. 23А





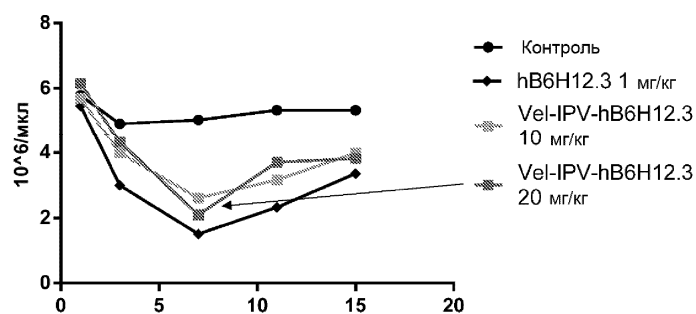


Тромбоциты (Кратность относительно исходного значения)
Ab47 в сравнении с hB6H12.3



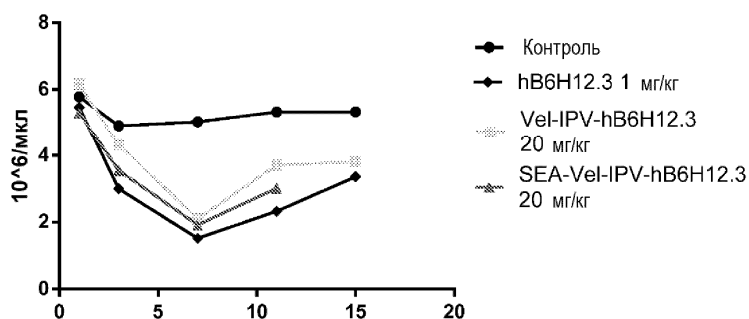
Фиг. 30

ЭРИТРОЦИТ
hB6H12.3 в сравнении с Vel-IPV- hB6H12.3



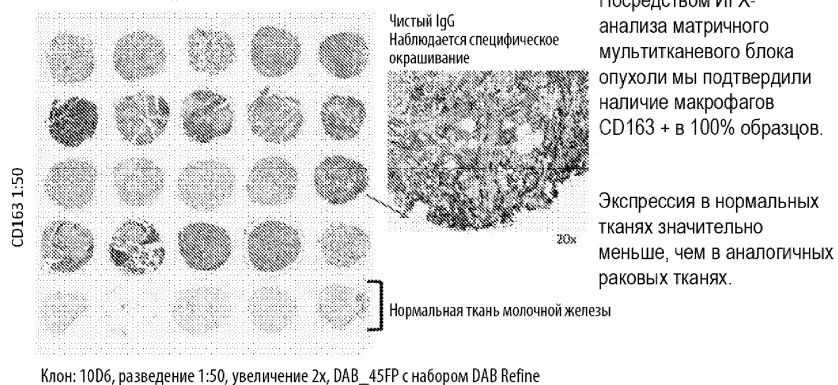
Фиг. 31

ЭРИТРОЦИТ
Vel-IPV- hB6H12.3 в сравнении с SEA-Vel-IPV- hB6H12.3



Фиг. 32

CD163 экспрессируется в 20/20 случаях рака молочной железы



Фиг. 33

ММР2-
расщепляемая последовательность

M11 CC Легкая цепь -LEIRAAFLRQRNTALRTEVAELEQEVQRLENEVSQYETRYSGGGGGPLG*VRGGGGS (SEQ ID NO: 47)
Тяжелая цепь -LEIEAAFLERENTALETRVAELRQRVQRARNRVSYRTRYSGGGGGPLG*VRGGGGS (SEQ ID NO: 46)

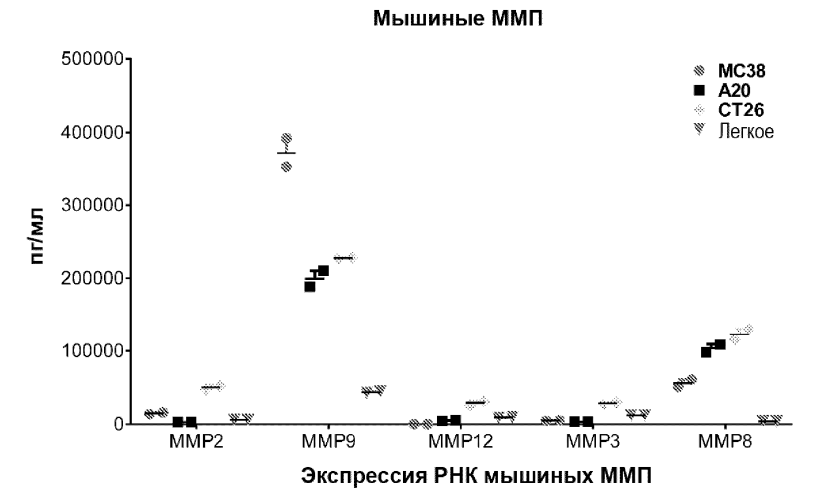
ММР2-
расщепляемая последовательность

M15 CC Легкая цепь -LEIEAAFLEQENTALETEVAELEQEVQRLENIVSQYETRYSGGGGGPLG*VRGGGGS (SEQ ID NO: 49)
Тяжелая цепь -LEIRAAFLRRNTALRTRVAELRQRVQRLRNIVSQYETRYSGGGGGPLG*VRGGGGS (SEQ ID NO: 48)

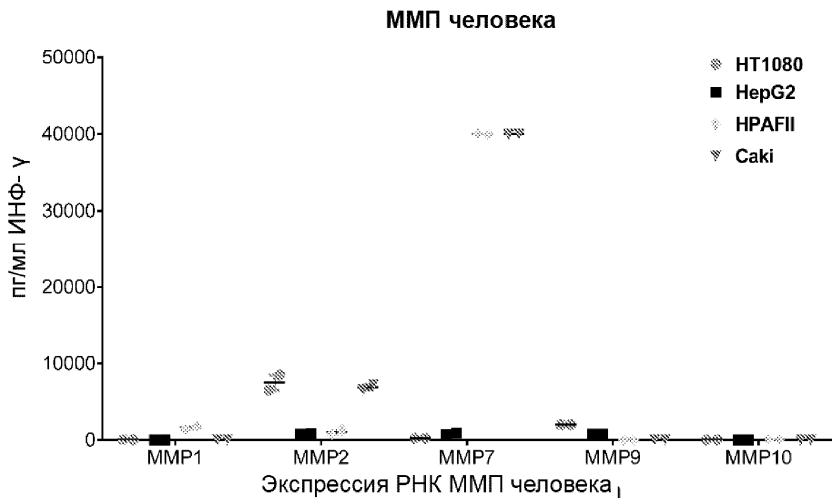
ММР2-
расщепляемая последовательность (IPV)

Vel CC Легкая цепь -GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLGSIPVS*LRSG (SEQ ID NO: 51)
Тяжелая цепь -GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPIVS*LRSG (SEQ ID NO: 50)

Фиг. 34

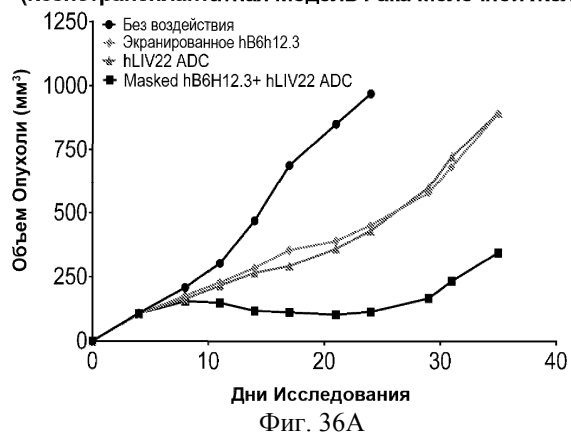


Фиг. 35А

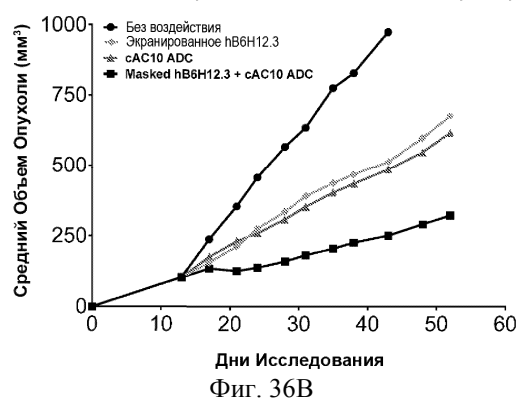


Фиг. 35В

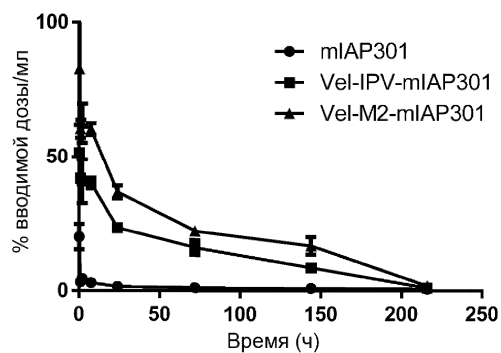
MCSF7
(Ксенотрансплантатная Модель Рака Молочной Железы)



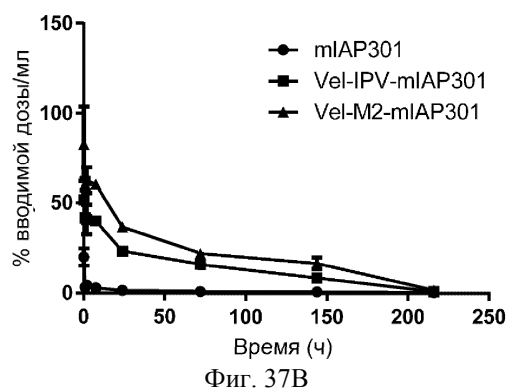
L428
(Ксенотрансплантатная Модель Лимфомы)



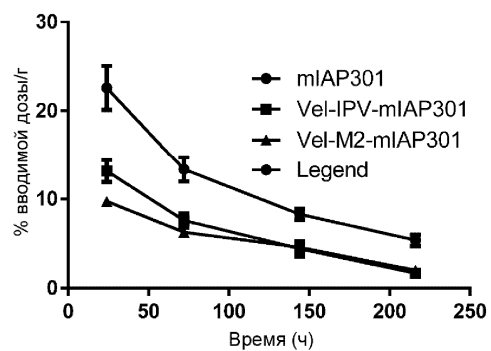
Плазма, 1мг/кг



Плазма, 10мг/кг

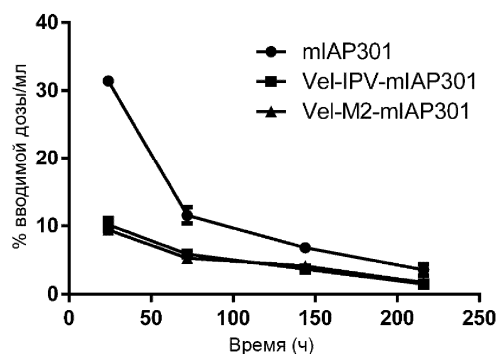


Селезёнка, 1 мг/кг



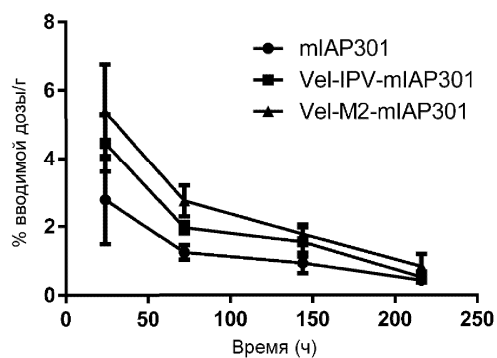
Фиг. 37С

Селезёнка, 10 мг/кг



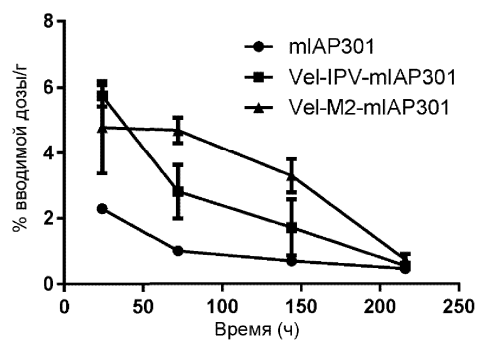
Фиг. 37D

Опухоль, 1 мг/кг



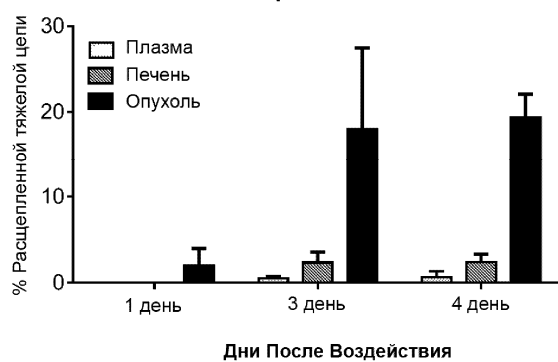
Фиг. 37Е

Опухоль, 10 мг/кг



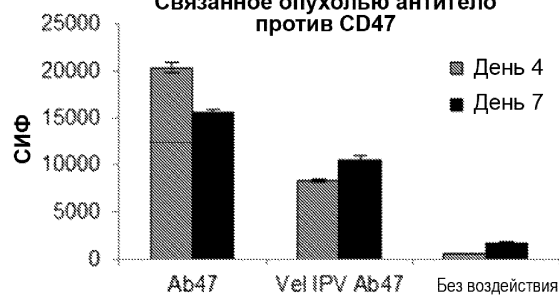
Фиг. 37F

**Процент расщепления экранированного антитела
против CD47**



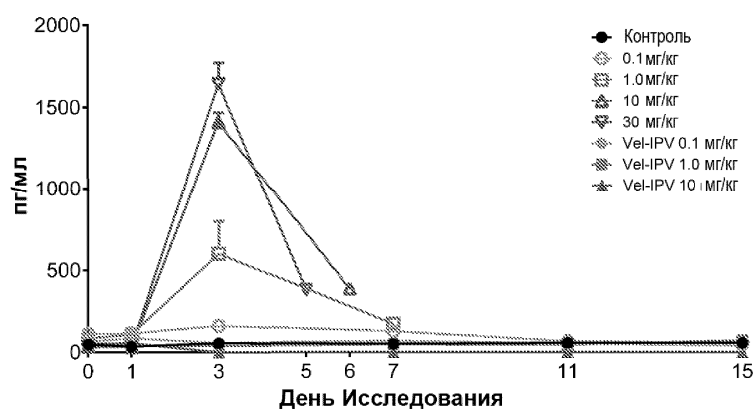
Фиг. 38А

**Связанное опухолью антитело
против CD47**



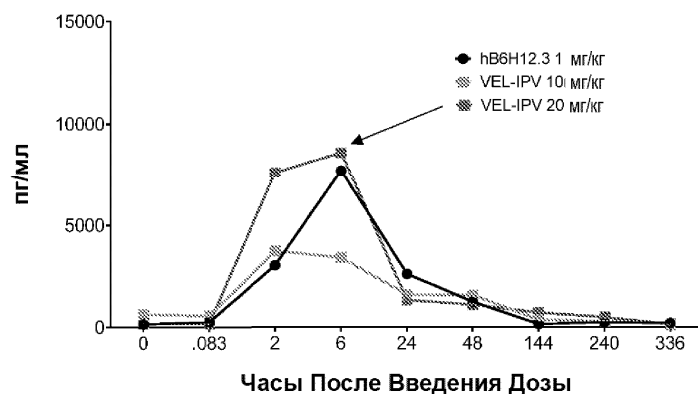
Фиг. 38В

МХБ-1

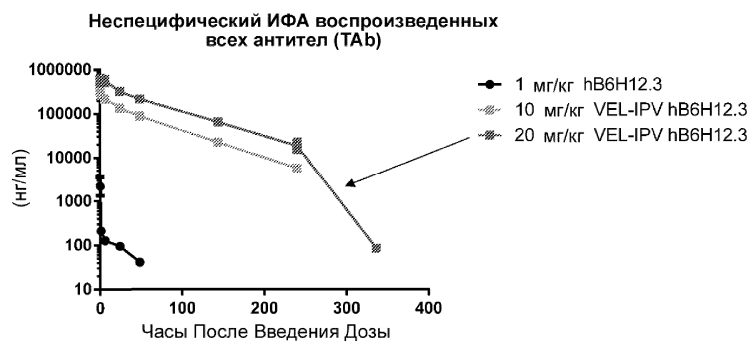


Фиг. 39А

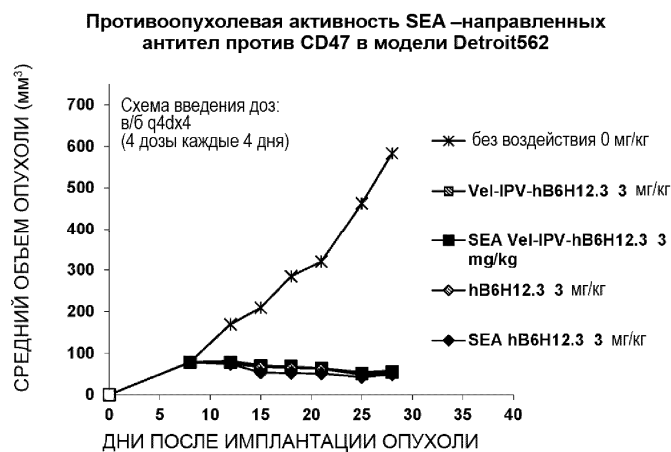
МХБ-1



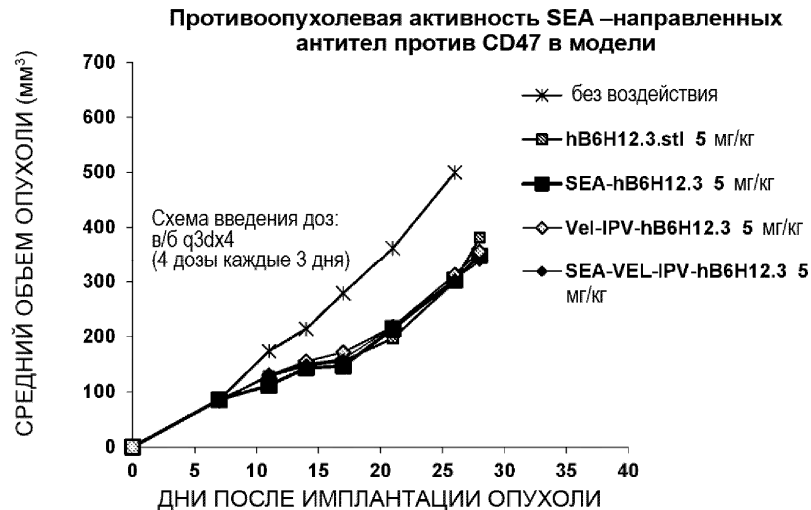
Фиг. 39В



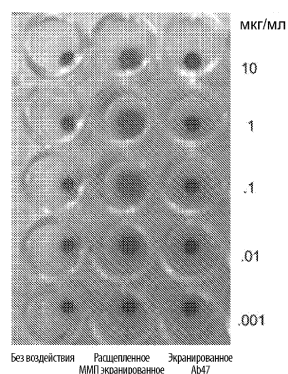
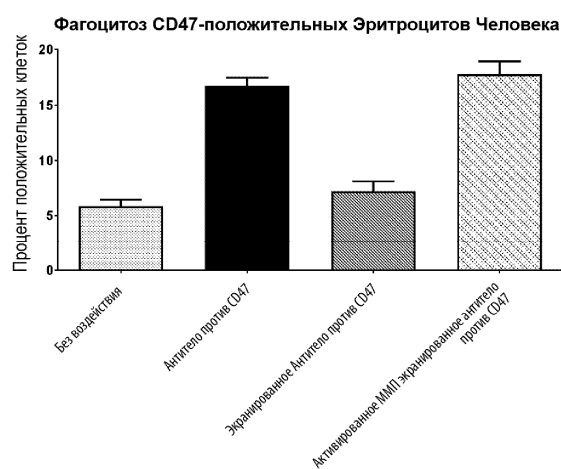
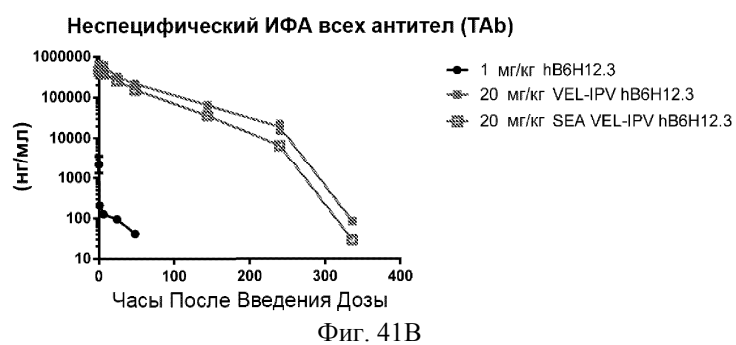
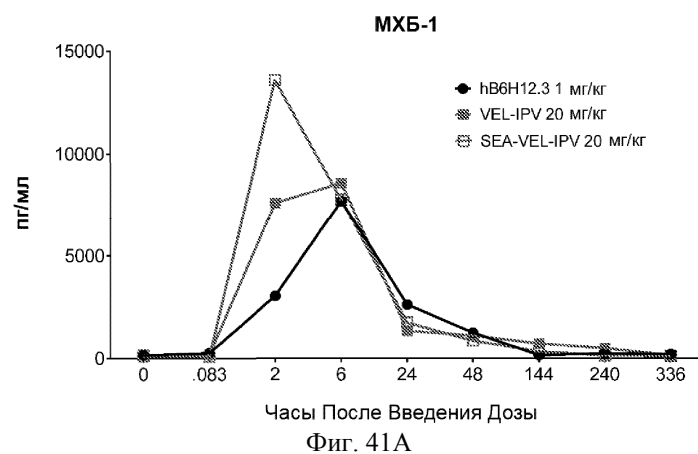
Фиг. 39С



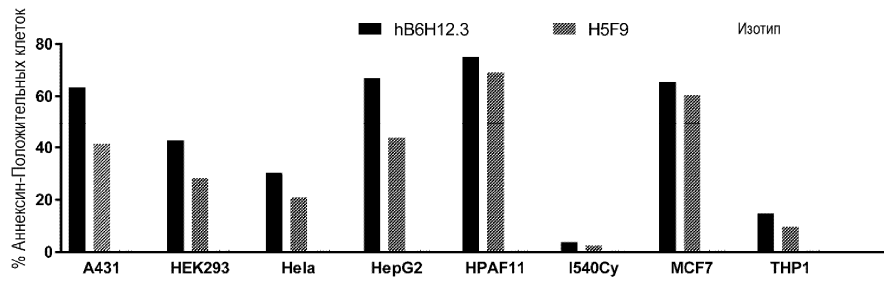
Фиг. 40А



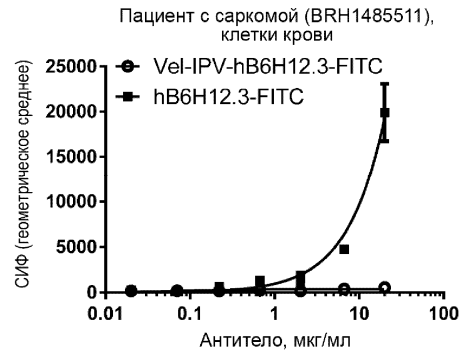
Фиг. 40В



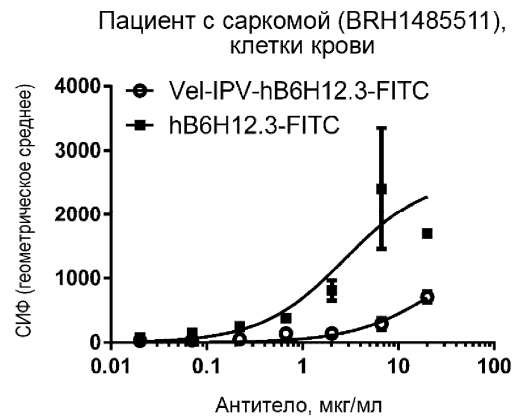
Окрашивание клеток, подвергшихся воздействию, Аннексином V



Фиг. 44

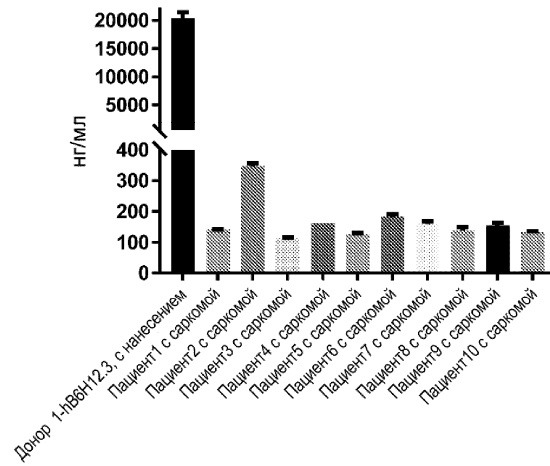


Фиг. 45A

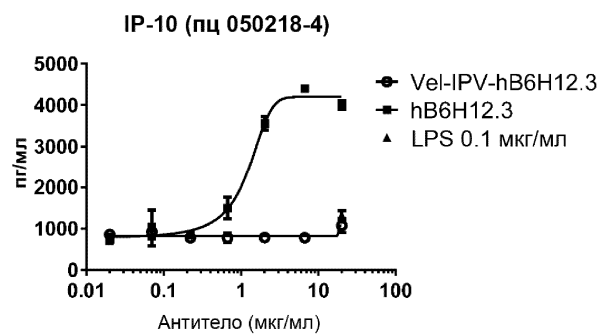


Фиг. 45B

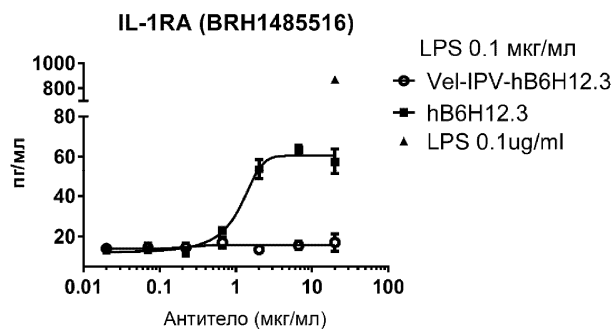
20 мкг/мл Vel-IPV-hB6H12.3, добавленного в плазму пациента



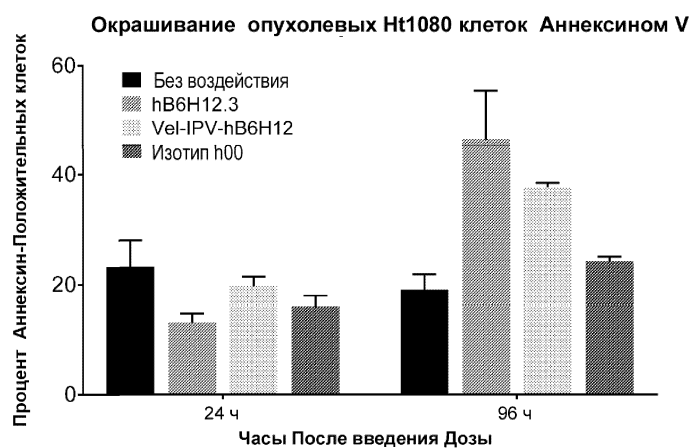
Фиг. 45C



Фиг. 46А



Фиг. 46В



Фиг. 47

