



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019020185-8 A2



(22) Data do Depósito: 26/03/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 02/06/2020

(54) Título: MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA REDUÇÃO DA IMUNOGENICIDADE

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 27/03/2017 US 62/477,257.

(71) Depositante(es): CELGENE CORPORATION.

(72) Inventor(es): JEFFREY C. JOHNSON; LAWRENCE DEARTH; HARALAMBOS HADJIVASSILIOU; JEONGHOON SUN; KANDASAMY HARIHARAN.

(86) Pedido PCT: PCT US2018024316 de 26/03/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/183182 de 04/10/2018

(85) Data da Fase Nacional: 26/09/2019

(57) Resumo: São fornecidos na presente invenção métodos e usos envolvendo a combinação de um anticorpo anti-CD20, por exemplo, rituximab com uma proteína terapêutica, por exemplo, um anticorpo (por exemplo, um anticorpo que se liga especificamente à CD47 humana).

MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA REDUÇÃO DA IMUNOGENICIDADE

ÁREA

[001] São proporcionados aqui métodos e usos envolvendo a combinação de um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab com uma proteína terapêutica, por exemplo, um anticorpo (p.ex., um anticorpo que se liga especificamente à CD47 humana).

ANTECEDENTES

[002] Embora as proteínas terapêuticas tenham sido usadas para tratar um número de doenças, eles podem desencadear uma resposta imunitária envolvendo produção de anticorpos antifármaco quando administrados a indivíduos. Isto pode resultar em eficácia reduzida do terapêutico e/ou atividade. Conformemente existe uma necessidade de métodos de redução desta resposta imunitária.

[003] CD47, também conhecida como proteína associada à integrina (IAP), antígeno do câncer dos ovários OA3, antígeno relacionado com Rh e MER6, é um receptor transmembranar de abrangência múltipla pertencendo à superfamília das imunoglobulinas. SIRP α (proteína regulador do sinal α) expressa em macrófagos interage com CD47, e esta interação controla negativamente a função efetora de células imunitárias inatas tais como fagocitose de células hospedeiras. A expressão e/ou atividade de CD47 têm sido implicadas em um número de doenças e disfunções. Conformemente existe uma necessidade de terapias que visem CD47.

SUMÁRIO

[004] São proporcionados aqui métodos e composições para redução da imunogenicidade em um indivíduo, compreendendo administração a um indivíduo de um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, em combinação com uma proteína terapêutica, em que a imunogenicidade é reduzida em comparação

com a imunogenicidade em um indivíduo quando a proteína terapêutica é administrada sozinha. Em certos aspectos, a proteína terapêutica é um anticorpo terapêutico. Em certos aspectos, a proteína terapêutica é uma proteína de fusão, por exemplo, uma proteína de fusão contendo Fc, p.ex., uma proteína de fusão receptora solúvel. Em certos aspectos, a proteína terapêutica é uma citocina. Em certos aspectos, a proteína terapêutica é uma interleucina. Em certos aspectos, a proteína terapêutica não é uma enzima. Em certos aspectos, o indivíduo é um humano.

[005] Em certos aspectos dos métodos e composições proporcionados aqui, a proteína terapêutica é um anticorpo, em que o anticorpo terapêutico é um anticorpo que se liga à CD47 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[006] Em aspectos específicos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma CDR1 de VH compreendendo SEQ ID NO: 50, uma CDR2 de VH compreendendo SEQ ID NO: 72, uma CDR3 de VH compreendendo SEQ ID NO: 52, uma CDR1 de VL compreendendo SEQ ID NO: 53, uma CDR2 de VL compreendendo SEQ ID NO: 71 e uma CDR3 de VL compreendendo SEQ ID NO: 55.

[007] Em aspectos específicos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma CDR1 de VH compreendendo SEQ ID NO: 50, uma CDR2 de VH compreendendo SEQ ID NO: 51, uma CDR3 de VH compreendendo SEQ ID NO: 52, uma CDR1 de VL compreendendo SEQ ID NO: 53, uma CDR2 de VL compreendendo SEQ ID NO: 54 e uma CDR3 de VL compreendendo SEQ ID NO: 55.

[008] Em certos aspectos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma VH compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 5-30. Em certos aspectos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do

mesmo compreende uma VL compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 31-47. Em certos aspectos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma VH compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 5-30 e uma VL compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 31-47.

[009] Em certos aspectos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é um isotipo de IgG selecionado do grupo consistindo em isotipo IgG1, isotipo IgG2, isotipo IgG3 e isotipo IgG4. Em certos aspectos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é um isotipo de IgG selecionado de IgG4P e IgG4PE.

[0010] Em certos aspectos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é um componente de uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo que se liga à CD47 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0011] Em certos aspectos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é um anticorpo quimérico, humanizado ou totalmente humano.

[0012] Em certos aspectos, os métodos proporcionados aqui compreendem adicionalmente administração de um segundo terapêutico, p.ex., um terapêutico de pequena molécula, tal como um terapêutico de quimioterapia. Em aspectos específicos, a referida quimioterapia é radioterapia.

[0013] Em certos aspectos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,3, 1, 2, 4, 8, 15, ou 20 mg/kg. Em certos aspectos, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450 ou 500 mg/m². Em certos aspectos, o anticorpo anti-CD20 é rituximab.

Em certos aspectos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,3, 1, 2, 4, 8, 15, ou 20 mg/kg e o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450 ou 500 mg/m². Em certos aspectos, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado antes da proteína terapêutica. Em certos aspectos, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 semanas antes da proteína terapêutica. Em certos aspectos, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias antes da proteína terapêutica. Em certos aspectos, o rituximab é administrado antes do anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em certos aspectos, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 semanas antes do anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em certos aspectos, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias antes do anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0014] Em certos aspectos, os métodos proporcionados aqui não compreendem administração de um inibidor do proteossomo ao indivíduo. Em certos aspectos, os métodos proporcionados aqui não compreendem administração de bortezomibe ao indivíduo. Em certos aspectos, os métodos proporcionados aqui não compreendem administração de metotrexato ao indivíduo.

[0015] São proporcionados aqui métodos para tratamento de câncer, compreendendo o método administração a um indivíduo com sua necessidade de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo que se liga à CD47 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, em que o método compreende adicionalmente administração de um anticorpo anti-CD20, p.ex.,

rituximab, ao indivíduo. Em certos aspectos, o anticorpo anti-CD20 é rituximab. Em certos aspectos, o indivíduo é um humano. Em certos aspectos, os métodos proporcionados aqui compreendem adicionalmente administração de radiação ou quimioterapia. Em certos aspectos, os métodos proporcionados aqui compreendem adicionalmente administração de outro agente anticanceroso. Em certos aspectos, o câncer é um câncer hematológico. Em certos aspectos, o câncer é um câncer sólido. Em certos aspectos, o câncer é mieloma múltiplo, linfoma não-Hodgkin, leucemia mieloide aguda (AML), câncer da mama (p.ex., câncer da mama triplo negativo), câncer da bexiga, câncer/carcinoma do pulmão de células não pequenas, carcinoma hepatocelular (HCC), sarcoma ou câncer da cabeça e pescoço. Em certos aspectos, o câncer é mieloma múltiplo. Em certos aspectos, o câncer é linfoma não-Hodgkin. Em aspectos específicos, o linfoma não-Hodgkin é positivo quanto a CD20. Em aspectos específicos, o linfoma não-Hodgkin é recidivante ou refratário. Em aspectos específicos, o indivíduo recebeu previamente um regime terapêutico incluindo anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab.

[0016] São proporcionados aqui métodos para tratamento de câncer, compreendendo o método administração a um indivíduo com sua necessidade de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo que se liga à CD47 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em certos aspectos, o indivíduo é um humano. Em certos aspectos, os métodos proporcionados aqui compreendem adicionalmente administração de radiação ou quimioterapia. Em certos aspectos, os métodos proporcionados aqui compreendem adicionalmente administração de outro agente anticanceroso. Em certos aspectos, o câncer é um câncer hematológico. Em certos aspectos, o câncer é um câncer sólido. Em certos aspectos, o câncer é mieloma múltiplo, linfoma não-Hodgkin, leucemia mieloide aguda (AML), câncer da mama (p.ex., câncer da

mama triplo negativo), câncer da bexiga, câncer/carcinoma do pulmão de células não pequenas, carcinoma hepatocelular (HCC), sarcoma ou câncer da cabeça e pescoço. Em certos aspectos, o câncer é mieloma múltiplo. Em certos aspectos, o câncer é linfoma não-Hodgkin. Em aspectos específicos, o linfoma não-Hodgkin é positivo quanto a CD20. Em aspectos específicos, o linfoma não-Hodgkin é recidivante ou refratário. Em aspectos específicos, o indivíduo recebeu previamente um regime terapêutico incluindo anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab.

[0017] Em certos aspectos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,3, 1, 2, 4, 8, 15, ou 20 mg/kg. Em certos aspectos, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450 ou 500 mg/m². Em certos aspectos, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado antes do anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0018] Em certos aspectos, o método não compreende administração de um inibidor do proteossomo ao indivíduo. Em certos aspectos, o método não compreende administração de bortezomibe ao indivíduo. Em certos aspectos, o método não compreende administração de metotrexato ao indivíduo.

[0019] Em certos aspectos dos métodos de tratamento de câncer proporcionados aqui, a proteína terapêutica é um anticorpo, em que o anticorpo terapêutico é um anticorpo que se liga à CD47 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0020] Em aspectos específicos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma CDR1 de VH compreendendo SEQ ID NO: 50, uma CDR2 de VH compreendendo SEQ ID NO: 72, uma CDR3 de VH compreendendo SEQ ID NO: 52, uma CDR1 de VL

compreendendo SEQ ID NO: 53, uma CDR2 de VL compreendendo SEQ ID NO: 71 e uma CDR3 de VL compreendendo SEQ ID NO: 55.

[0021] Em aspectos específicos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma CDR1 de VH compreendendo SEQ ID NO: 50, uma CDR2 de VH compreendendo SEQ ID NO: 51, uma CDR3 de VH compreendendo SEQ ID NO: 52, uma CDR1 de VL compreendendo SEQ ID NO: 53, uma CDR2 de VL compreendendo SEQ ID NO: 54 e uma CDR3 de VL compreendendo SEQ ID NO: 55.

[0022] Em certos aspectos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma VH compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 5-30. Em certos aspectos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma VL compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 31-47. Em certos aspectos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma VH compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 5-30 e uma VL compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 31-47.

[0023] Em certos aspectos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é um isotipo de IgG selecionado do grupo consistindo em isotipo IgG1, isotipo IgG2, isotipo IgG3 e isotipo IgG4. Em certos aspectos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é um isotipo de IgG selecionado de IgG4P e IgG4PE. Em certos aspectos, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é quimérico, humanizado ou totalmente humano.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Métodos

Métodos de redução da imunogenicidade

[0024] São proporcionados aqui métodos para redução da imunogenicidade em um indivíduo, compreendendo administração a um indivíduo de um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, em combinação com uma proteína terapêutica, em que a imunogenicidade é reduzida em comparação com a imunogenicidade no indivíduo quando se administra a proteína terapêutica sozinha. Em certas modalidades, a proteína terapêutica é um anticorpo terapêutico. Em certas modalidades, a proteína terapêutica é uma citocina. Em certas modalidades, a citocina é proteína morfogenética do osso (BMP), eritropoietina (EPO), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), interferon alfa (IFN- α), interferon beta (IFN- β), interleucina 2 (IL-2), interleucina 11 (IL-11) ou interferon gama (IFN- γ). Em certas modalidades, a proteína terapêutica é uma interleucina. Em certas modalidades, a proteína terapêutica não é uma enzima.

[0025] Em certas modalidades dos métodos proporcionados aqui, a proteína terapêutica é um anticorpo terapêutico, em que o anticorpo terapêutico é um anticorpo que se liga à CD47 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0026] Em certas modalidades, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é um componente de uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo que se liga à CD47 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e um veículo farmacêuticamente aceitável.

[0027] Em certas modalidades, os métodos proporcionados aqui compreendem administração de quimioterapia. Em modalidades específicas, a referida quimioterapia é radioterapia.

[0028] Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é

administrado antes do e/ou simultaneamente com a proteína terapêutica. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado antes da proteína terapêutica. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado simultaneamente com a proteína terapêutica.

[0029] Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado antes do e/ou simultaneamente com o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado antes do anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado simultaneamente com o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0030] Em certas modalidades, os métodos proporcionados aqui não compreendem administração de um inibidor do proteossomo ao indivíduo. Em certas modalidades, os métodos proporcionados aqui não compreendem administração de bortezomibe ao indivíduo. Em certas modalidades, os métodos proporcionados aqui não compreendem administração de metotrexato ao indivíduo.

[0031] A imunogenicidade pode ser medida por qualquer método conhecido de um perito na técnica. Em certas modalidades, a imunogenicidade é medida por determinação do número e/ou concentração de anticorpos antifármaco presentes no soro. Em certas modalidades, a imunogenicidade é medida por determinação do título de anticorpos antifármaco presentes no soro. Em certas modalidades, a imunogenicidade é medida por determinação da quantidade de proteína terapêutica neutralizada por volume de soro. Em certas modalidades, a presença de imunogenicidade é indicada pela ocorrência de anafilaxia, síndrome de liberação de citocinas, reações de infusão,

hipersensibilidade retardada e/ou reatividade cruzada com proteínas endógenas. Em certas modalidades, a imunogenicidade é medida por um ensaio de rastreamento. Em modalidades específicas, o ensaio de rastreamento é um ensaio imunossorbente ligado a enzimas (ELISA) com ligação direta, um ELISA em ponte, um ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA), um ensaio de ressonância de plasmon de superfície (SPR), um ensaio Bethesda ou um ensaio de eletroquimioluminescência em ponte. Em certas modalidades, a imunogenicidade é medida por um ensaio de neutralização. Em modalidades específicas, o ensaio de neutralização é um ensaio biológico à base de células ou um ensaio de ligação ao ligando competitivo não à base de células. Em certas modalidades, os anticorpos antifármaco se ligam a proteína terapêutica. Em certas modalidades, os anticorpos antifármaco neutralizam a proteína terapêutica. Em certas modalidades, os anticorpos antifármaco se ligam a e neutralizam a proteína terapêutica.

[0032] Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida uma semana após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida duas semanas após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida três semanas após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida quatro semanas após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida cinco semanas após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida seis semanas após a primeira dose da proteína terapêutica.

[0033] Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida semanalmente após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida uma semana após a primeira dose da proteína terapêutica e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a

imunogenicidade é medida duas semanas após a primeira dose da proteína terapêutica e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida três semanas após a primeira dose da proteína terapêutica e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida quatro semanas após a primeira dose da proteína terapêutica e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida cinco semanas após a primeira dose da proteína terapêutica e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida seis semanas após a primeira dose da proteína terapêutica e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida a cada duas semanas após a primeira dose da proteína terapêutica.

[0034] Em certos aspectos, a contagem de células B é medida uma semana após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida duas semanas após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida três semanas após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida quatro semanas após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida cinco semanas após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida seis semanas após a primeira dose da proteína terapêutica.

[0035] Em certos aspectos, a contagem de células B é medida uma semana após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida duas semanas após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida três semanas após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a contagem

de células B é medida quatro semanas após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida cinco semanas após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida seis semanas após a primeira dose da proteína terapêutica.

[0036] Em certos aspectos, a contagem de células B é medida semanalmente após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida uma semana após a primeira dose da proteína terapêutica e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida duas semanas após a primeira dose da proteína terapêutica e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida três semanas após a primeira dose da proteína terapêutica e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida quatro semanas após a primeira dose da proteína terapêutica e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida cinco semanas após a primeira dose da proteína terapêutica e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida seis semanas após a primeira dose da proteína terapêutica e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida a cada duas semanas após a primeira dose da proteína terapêutica.

[0037] Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida uma semana após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida duas semanas após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida três semanas após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida quatro semanas após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a

imunogenicidade é medida cinco semanas após a primeira dose da proteína terapêutica. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida seis semanas após a primeira dose da proteína terapêutica.

[0038] Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida semanalmente após a primeira dose de anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab. Em certos aspectos, o anticorpo anti-CD20 é rituximab. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida uma semana após a primeira dose de rituximab e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida duas semanas após a primeira dose de rituximab e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida três semanas após a primeira dose de rituximab e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida quatro semanas após a primeira dose de rituximab e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida cinco semanas após a primeira dose de rituximab e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida seis semanas após a primeira dose de rituximab e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a imunogenicidade é medida a cada duas semanas após a primeira dose de rituximab.

[0039] Em certos aspectos, a contagem de células B é medida uma semana após a primeira dose de anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab. Em certos aspectos, o anticorpo anti-CD20 é rituximab. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida duas semanas após a primeira dose de rituximab. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida três semanas após a primeira dose de rituximab. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida quatro semanas após a primeira dose de rituximab. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida cinco semanas após a primeira dose de rituximab. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida seis semanas após a primeira dose

de rituximab.

[0040] Em certos aspectos, a contagem de células B é medida uma semana após a primeira dose de anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab. Em certos aspectos, o anticorpo anti-CD20 é rituximab. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida duas semanas após a primeira dose de rituximab. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida três semanas após a primeira dose de rituximab. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida quatro semanas após a primeira dose de rituximab. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida cinco semanas após a primeira dose de rituximab. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida seis semanas após a primeira dose de rituximab.

[0041] Em certos aspectos, a contagem de células B é medida semanalmente após a primeira dose de anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab. Em certos aspectos, o anticorpo anti-CD20 é rituximab. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida uma semana após a primeira dose de rituximab e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida duas semanas após a primeira dose de rituximab e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida três semanas após a primeira dose de rituximab e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida quatro semanas após a primeira dose de rituximab e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida cinco semanas após a primeira dose de rituximab e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida seis semanas após a primeira dose de rituximab e semanalmente subsequentemente. Em certos aspectos, a contagem de células B é medida a cada duas semanas após a primeira dose de rituximab.

Métodos de tratamento de câncer

[0042] São proporcionados aqui métodos para tratamento de câncer, compreendendo o método administração a um indivíduo com sua necessidade de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo que se liga à CD47 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, em que o método compreende adicionalmente administração de anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, ao indivíduo. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD20 é rituximab. São também proporcionados aqui métodos para tratamento de câncer, compreendendo o método administração a um indivíduo com sua necessidade de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo que se liga à CD47 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0043] Em certas modalidades, os métodos para tratamento de câncer proporcionados aqui compreendem adicionalmente administração de radiação ou quimioterapia. Em certas modalidades, os métodos proporcionados aqui compreendem adicionalmente administração de outro agente anticanceroso. Em certas modalidades, o câncer é um câncer hematológico. Em certas modalidades, o câncer é um câncer sólido. Em certas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo, linfoma não-Hodgkin, leucemia mieloide aguda (AML), câncer da mama (p.ex., câncer da mama triplo negativo), câncer da bexiga, câncer/carcinoma do pulmão de células não pequenas, carcinoma hepatocelular (HCC), sarcoma ou câncer da cabeça e pescoço. Em modalidades específicas, o câncer é linfoma não-Hodgkin. Em modalidades específicas, o linfoma não-Hodgkin é positivo quanto a CD20. Em modalidades específicas, o linfoma não-Hodgkin é recidivante ou refratário. Em modalidades específicas, o indivíduo foi previamente tratado com um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab.

[0044] Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado antes do e/ou simultaneamente com o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em certas modalidades,

o anticorpo anti-CD20 é rituximab. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado antes do anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado simultaneamente com o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0045] Em certas modalidades, o método não compreende administração de um inibidor do proteossomo ao indivíduo. Em certas modalidades, o método não compreende administração de bortezomibe ao indivíduo. Em certas modalidades, o método não compreende administração de metotrexato ao indivíduo. Em certas modalidades, o método compreende adicionalmente administração de metotrexato ao indivíduo.

[0046] Em certas modalidades, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é um componente de uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo que se liga à CD47 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0047] Em certas modalidades são proporcionados aqui método de proteção contra uma condição ou disfunção, tal como câncer, usando um anticorpo anti-CD47 descrito aqui sozinho ou em combinação com um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab.

[0048] Em modalidades particulares são proporcionados aqui métodos para gestão, tratamento, prevenção ou proteção contra câncer, compreendendo administração a um indivíduo com sua necessidade de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente à CD47 (p.ex., CD47 humana) sozinho ou em combinação com um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab. Em certas modalidades é proporcionado aqui um método de alívio, inibição ou redução da progressão ou gravidade de um ou mais sintomas associados a câncer.

[0049] Como usado aqui, “administrar” ou “administração” se refere ao ato de injeção ou de outro modo administração física de uma substância (p.ex., anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab ou um anticorpo anti-CD47 proporcionado aqui ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) a um indivíduo ou um paciente (p.ex., humano), tal como por administração mucosal, tópica, intradérmica, parenteral, intravenosa, subcutânea, intramuscular e/ou qualquer outro método de administração física descrito aqui ou conhecido na técnica. Em certas modalidades, a administração do anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é realizada intravenosamente. Em certas modalidades, a administração de um anticorpo anti-CD47 proporcionado aqui é realizada intravenosamente. Em certas modalidades, a administração de rituximab e um anticorpo anti-CD47 proporcionado aqui é realizada intravenosamente.

[0050] Como usado aqui, o termo “quantidade eficaz” se refere a uma quantidade de uma composição (p.ex., um anticorpo ou composição farmacêutica proporcionado aqui ou um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, ou uma composição farmacêutica proporcionada aqui) que é suficiente para alcançar uma leitura específica, por exemplo, reduzir e/ou melhorar a gravidade e/ou duração de uma dada condição, disfunção ou doença (p.ex., câncer, metástase ou angiogênese) e/ou um sintoma relacionado com ela. Um tal termo engloba também uma quantia necessária para a redução, desaceleração ou melhoria do avanço ou progressão de uma dada doença, redução, desaceleração ou melhoria da recorrência, desenvolvimento ou início de uma dada doença e/ou para melhorar ou intensificar o(s) efeito(s) profilático(s) ou terapêutico(s) de outra terapia (p.ex., uma terapia sem ser um anticorpo anti-CD47 proporcionado aqui). Em algumas modalidades, “quantidade eficaz” como usado aqui se refere à quantidade do anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, associada a uma redução na imunogenicidade de uma proteína terapêutica, como descrito

aqui.

[0051] As doses de anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, por exemplo, a serem administradas em combinação com uma proteína terapêutica, tal como um anticorpo anti-CD47, podem incluir cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal. As doses de rituximab, por exemplo, a serem administradas em combinação com uma proteína terapêutica, tal como um anticorpo anti-CD47, podem incluir cerca de 25 mg/m² a cerca de 1500 mg/m². Em algumas modalidades, o rituximab é administrado a um indivíduo a uma dose de 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg, 100 mg/kg ou maior. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,1, 0,3, 0,5, 1, 2, 4, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75 ou 100 mg/kg. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,3, 1, 2, 4, 8, 15, ou 20 mg/kg. Em algumas modalidades, o rituximab é administrado a um indivíduo a uma dose de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 750, 1000, 1250, 1500 mg/m² ou maior. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, ou 500 mg/m². Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 375 mg/m².

[0052] As frequências de dosagem de anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, podem variar, por exemplo, de duas vezes diariamente a uma vez por mês. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, ou 500 mg/m² uma vez semanalmente. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, ou 500 mg/m² a cada duas semanas. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, ou 500 mg/m² a cada quatro semanas. Em certas

modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 375 mg/m² uma vez semanalmente. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 375 mg/m² a cada duas semanas. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 375 mg/m² a cada quatro semanas.

[0053] As doses do anticorpo anti-CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, por exemplo, a serem administradas em combinação com anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, podem incluir cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CD47 é administrado a um indivíduo a uma dose de 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg, 100 mg/kg ou maior. Em certas modalidades, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,1, 0,3, 0,5, 1, 2, 4, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75 ou 100 mg/kg. Em certas modalidades, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,3, 1, 2, 4, 8, 15, ou 20 mg/kg.

[0054] As frequências de dosagem do anticorpo anti-CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo podem variar, por exemplo, de duas vezes diariamente a uma vez por semana. Em certas modalidades, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,3, 1, 2, 4, 8, 15, ou 20 mg/kg uma vez semanalmente. Em certas modalidades, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,3, 1, 2, 4, 8, 15, ou 20 mg/kg duas vezes semanalmente. Em certas modalidades, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 8 mg/kg duas vezes semanalmente.

Em certas modalidades, o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 20 mg/kg uma vez semanalmente.

[0055] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado a um indivíduo a uma dose de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 750, 1000, 1250, 1500 mg/m², e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,1, 0,3, 0,5, 1, 2, 4, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75 ou 100 mg/kg. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, ou 500 mg/m² e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,3, 1, 2, 4, 8, 15, ou 20 mg/kg. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 375 mg/m² e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,3, 1, 2, 4, 8, 15, ou 20 mg/kg. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, ou 500 mg/m² uma vez semanalmente e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,3, 1, 2, 4, 8, 15, ou 20 mg/kg uma vez semanalmente.

[0056] Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, ou 500 mg/m² a cada duas semanas e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,3, 1, 2, 4, 8, 15, ou 20 mg/kg duas vezes semanalmente. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, ou 500 mg/m² a cada duas semanas e o anticorpo

que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 8 mg/kg duas vezes semanalmente. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, ou 500 mg/m² a cada duas semanas e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 8 mg/kg duas vezes semanalmente. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, ou 500 mg/m² a cada duas semanas e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 20 mg/kg uma vez semanalmente.

[0057] Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, ou 500 mg/m² a cada quatro semanas e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,3, 1, 2, 4, 8, 15, ou 20 mg/kg duas vezes semanalmente. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, ou 500 mg/m² a cada quatro semanas e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 8 mg/kg duas vezes semanalmente. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, ou 500 mg/m² a cada quatro semanas e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 8 mg/kg duas vezes semanalmente. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, ou 500 mg/m² a cada quatro semanas e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 20 mg/kg uma vez semanalmente.

[0058] Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado ao indivíduo a uma dose de 375 mg/m² uma vez semanalmente e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,3, 1, 2, 4, 8, 15, ou 20 mg/kg duas vezes semanalmente. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 375 mg/m² uma vez semanalmente e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 8 mg/kg duas vezes semanalmente. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 375 mg/m² uma vez semanalmente e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 8 mg/kg duas vezes semanalmente. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 375 mg/m² uma vez semanalmente e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 20 mg/kg uma vez semanalmente.

[0059] Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado ao indivíduo a uma dose de 375 mg/m² a cada duas semanas e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,3, 1, 2, 4, 8, 15, ou 20 mg/kg duas vezes semanalmente. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 375 mg/m² a cada duas semanas e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 8 mg/kg duas vezes semanalmente. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 375 mg/m² a cada duas semanas e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 8 mg/kg duas vezes semanalmente. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao

indivíduo a uma dose de 375 mg/m² a cada duas semanas e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 20 mg/kg uma vez semanalmente.

[0060] Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado ao indivíduo a uma dose de 375 mg/m² a cada quatro semanas e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,3, 1, 2, 4, 8, 15, ou 20 mg/kg duas vezes semanalmente. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 375 mg/m² a cada quatro semanas e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 8 mg/kg duas vezes semanalmente. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 375 mg/m² a cada quatro semanas e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 8 mg/kg duas vezes semanalmente. Em certas modalidades, o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 375 mg/m² a cada quatro semanas e o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrado ao indivíduo a uma dose de 20 mg/kg uma vez semanalmente.

[0061] Como usado aqui, o termo “em combinação” no contexto da administração de outras terapias se refere ao uso de mais do que uma terapia. O uso do termo “em combinação” não restringe a ordem na qual as terapias são administradas. As terapias podem ser administradas, p.ex., em série, sequencialmente, simultaneamente ou concomitantemente.

[0062] Em certas modalidades dos métodos proporcionados aqui, um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado antes de uma proteína terapêutica, por exemplo, um anticorpo anti-CD47. Em certas modalidades dos métodos proporcionados aqui, um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é

administrado simultaneamente com uma proteína terapêutica, por exemplo, um anticorpo anti-CD47. Em certas modalidades dos métodos proporcionados aqui, um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado após uma proteína terapêutica, por exemplo, um anticorpo anti-CD47. Em certas modalidades dos métodos proporcionados aqui, um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é administrado antes de simultaneamente com uma proteína terapêutica, por exemplo, um anticorpo anti-CD47.

[0063] Como usado aqui, os termos “indivíduo” e “paciente” são usados indistintamente. Como usado aqui, um indivíduo é um mamífero tal como um não primata (p.ex., vacas, porcos, cavalos, gatos, cães, cabras, coelhos, camundongos, *etc.*) ou um primata (p.ex., macaco e humano), por exemplo um humano. Em uma modalidade, o indivíduo é um mamífero, p.ex., um humano, diagnosticado com uma condição ou disfunção proporcionada aqui (p.ex., câncer, metástase ou angiogênese). Em outra modalidade, o indivíduo é um mamífero, p.ex., um humano, em risco de desenvolver uma condição ou disfunção proporcionada aqui (p.ex., câncer, metástase ou angiogênese). Em outra modalidade, o indivíduo é humano.

[0064] Como usado aqui, “câncer hematológico” se refere a um câncer do sangue e inclui leucemia, linfoma e mieloma entre outros. “Leucemia” se refere a um câncer do sangue no qual demasiados glóbulos brancos que são ineficazes no combate de infecção são fabricados, eliminando assim as outras partes que constituem o sangue, tais como plaquetas e glóbulos vermelhos. É entendido que os casos de leucemia são classificados como agudos ou crônicos. Certas formas de leucemia incluem, a título de exemplo não limitante, leucemia linfocítica aguda (ALL); leucemia mieloide aguda (AML); leucemia linfocítica crônica (CLL); leucemia mielógena crônica (CML); Disfunção/neoplasma mieloproliferativo (MPDS); e síndrome de mielodisplasia. “Linfoma” pode se

referir a um linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin tanto indolente como agressivo, linfoma de Burkitt e linfoma folicular (células pequenas e células grandes), entre outros. Mieloma pode se referir a mieloma múltiplo (MM), mieloma de células gigantes, mieloma de cadeia pesada e mieloma de cadeia leve ou Bence-Jones. Em certas modalidades, o câncer hematológico é mieloma múltiplo. Em certas modalidades, o câncer hematológico é linfoma não-Hodgkin.

[0065] Exemplos não limitantes de uma condição que pode ser tratada ou gerida com um anticorpo anti-CD47 descrito aqui, sozinho ou em combinação com um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, incluem câncer hematológico e/ou tumores sólidos, bem como doenças ou disfunções relacionadas com expressão, atividade e/ou sinalização aberrantes de CD47, a título de exemplo não limitante, câncer hematológico e/ou tumores sólidos. Os cânceres hematológicos incluem, p.ex., leucemia, linfoma e mieloma. Certas formas de leucemia incluem, a título de exemplo não limitante, leucemia linfocítica aguda (ALL); leucemia mieloide aguda (AML); leucemia linfocítica crônica (CLL); leucemia mielógena crônica (CML); Disfunção/neoplasma mieloproliferativo (MPDS); e síndrome de mielodisplasia. Certas formas de linfoma incluem, a título de exemplo não limitante, linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin tanto indolente como agressivo, linfoma de Burkitt e linfoma folicular (células pequenas e células grandes). Certas formas de mieloma incluem, a título de exemplo não limitante, mieloma múltiplo (MM), mieloma de células gigantes, mieloma de cadeia pesada e mieloma de cadeia leve ou Bence-Jones. Os tumores sólidos incluem, p.ex., tumores da mama, tumores dos ovários, tumores do pulmão, tumores pancreáticos, tumores da próstata, tumores de melanoma, tumores colorretais, tumores do pulmão, tumores da cabeça e pescoço, tumores da bexiga, tumores esofágicos, tumores do fígado e tumores do rim.

[0066] Os sintomas associados a cânceres e outras disfunções neoplásicas

incluem, por exemplo, inflamação, febre, mal-estar geral, febre, dor, frequentemente localizada na área inflamada, perda de apetite, perda de peso, edema, dor de cabeça, fadiga, erupção cutânea, anemia, fraqueza muscular, fadiga muscular e sintomas abdominais tais como, por exemplo, dor abdominal, diarreia ou prisão de ventre.

[0067] Em aspectos específicos são proporcionados aqui anticorpos anti-CD47 úteis, sozinhos ou em combinação com um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, no tratamento, retardamento da progressão de, impedimento, prevenção da recaída de ou alívio de um sintoma de um câncer (p.ex., MM, NHL, AML, câncer da mama (p.ex., câncer da mama triplo negativo), câncer da bexiga, câncer/carcinoma do pulmão de células não pequenas, carcinoma hepatocelular (HCC), sarcoma e câncer da cabeça e pescoço). Por exemplo, os anticorpos para CD47 descritos aqui são úteis, sozinhos ou em combinação com um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, no tratamento de malignidades e/ou tumores hematológicos, p.ex., malignidades e/ou tumores hematológicos. Por exemplo, os anticorpos para CD47 descritos aqui são úteis no tratamento de tumores CD47⁺. A título de exemplo não limitante, os anticorpos para CD47 descritos aqui são úteis no tratamento de linfoma não-Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia mielógena crônica (CML), mieloma múltiplo (MM), câncer da mama (p.ex., câncer da mama triplo negativo), câncer dos ovários, câncer da cabeça e pescoço, câncer da bexiga, melanoma, câncer colorretal, câncer do pâncreas, câncer do pulmão, leiomioma, leiomiossarcoma, glioma, glioblastoma e assim por diante. Os tumores sólidos incluem, p.ex., tumores da mama, tumores dos ovários, tumores do pulmão (p.ex., NSCLC), tumores pancreáticos, tumores da próstata, tumores de melanoma, tumores colorretais, tumores do pulmão, tumores da cabeça e pescoço, tumores da bexiga, tumores esofágicos, tumores

do fígado (p.ex., carcinoma hepatocelular), sarcoma e tumores do rim.

[0068] Em uma modalidade específica é proporcionado aqui um método de tratamento de câncer (p.ex., uma disfunção/câncer hematológico ou câncer sólido) em um indivíduo compreendendo administração (p.ex., administração simultânea ou sequencial) a um indivíduo com sua necessidade de (i) um anticorpo anti-CD47 descrito aqui ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente à CD47 tal como CD47 humana, sozinho ou em combinação com um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, e (ii) outro agente anticanceroso. Em certas modalidades, o agente anticanceroso é um agente quimioterapêutico (p.ex., bloqueador da desmontagem de microtúbulos, antimetabolito, inibidor de topoisomerase e reticulante ou agente danificador de DNA). Em certas modalidades, o agente anticanceroso é um inibidor de tirosina cinase (p.ex., GLEEVEC® (mesilato de imatinib) ou SUTENT® (SU11248 ou Sunitinib)). Outros exemplos não limitantes de inibidores de tirosina cinase incluem 706 e AMNI07 (nilotinib), RAD001, PKC412, gefitinib (IRESSA™), erlotinib (TARCEVA®), sorafenib (NEXAVAR®), pazopanib (VOTRIENT™), axitinib, bosutinib, cediranib (RECENTIN®), SPRYCEL® (dasatinib), lapatinib (TYKERB®), lestaurtinib, neratinib, nilotinib (TASIGNA®), semaxanib, toceranib (PALLADIA™), vandetanib (ZACTIMA™) e vatalanib.

[0069] Em um aspecto específico é proporcionado aqui um método de tratamento de câncer (p.ex., uma disfunção/câncer hematológico ou câncer sólido) em um indivíduo compreendendo administração (p.ex., administração simultânea ou sequencial) a um indivíduo com sua necessidade de (i) um anticorpo anti-CD47 descrito aqui ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente à CD47 tal como CD47 humana, sozinho ou em combinação com um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, e (ii) terapia de radiação.

[0070] Em um aspecto particular é proporcionado aqui um método de promoção (p.ex., indução ou aumento) da fagocitose, p.ex., morte fagocítica mediada por macrófagos de células tumorais, compreendendo contato de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD47 descrito aqui que se liga especificamente à CD47 humana com células tumorais, sozinho ou em combinação com um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab. É também proporcionado aqui um método de promoção (p.ex., indução ou aumento) da fagocitose, p.ex., morte fagocítica mediada por macrófagos de células tumorais, em um indivíduo com sua necessidade (p.ex., um indivíduo com células tumorais, tais como células tumorais expressando CD47), compreendendo administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD47 descrito aqui que se liga especificamente à CD47 humana, sozinho ou em combinação com um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab.

[0071] Em um aspecto particular é proporcionado aqui um método de redução do volume tumoral, compreendendo contato de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD47 descrito aqui que se liga especificamente à CD47 humana com o tumor, sozinho ou em combinação com um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab. É também proporcionado aqui um método de redução do volume tumoral em um indivíduo com sua necessidade (p.ex., um indivíduo com um tumor, tal como um tumor expressando CD47), compreendendo administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD47 descrito aqui que se liga especificamente à CD47 humana, sozinho ou em combinação com um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab.

[0072] Em um aspecto particular é proporcionado aqui um método de inibição do crescimento ou proliferação de células cancerosas, compreendendo contato de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD47 descrito aqui que se liga especificamente à CD47 humana com células tumorais, sozinho ou em

combinação com um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab. É também proporcionado aqui um método de inibição do crescimento ou proliferação de células cancerosas em um indivíduo com sua necessidade (p.ex., um indivíduo com células cancerosas, tais como células tumorais expressando CD47), compreendendo administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD47 descrito aqui que se liga especificamente à CD47 humana, sozinho ou em combinação com um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab.

Composições

Terapêuticos de Proteína

[0073] As proteínas terapêuticas usados nos métodos descritos aqui, por exemplo, em combinação com um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, podem ser quaisquer terapêuticos de proteína conhecidos de um perito na técnica. Em certas modalidades, a proteína terapêutica é uma citocina. Em certas modalidades, a citocina é proteína morfogenética do osso (BMP), eritropoietina (EPO), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), interferon alfa (IFN- α), interferon beta (IFN- β), interleucina 2 (IL-2), interleucina 11 (IL-11) ou interferon gama (IFN- γ). Em certas modalidades, a proteína terapêutica é uma interleucina. Em certas modalidades, a proteína terapêutica não é uma enzima.

[0074] Em certas modalidades, a proteína terapêutica é uma proteína de fusão, por exemplo, uma proteína de fusão contendo Fc, p.ex., uma proteína de fusão receptora solúvel.

Anticorpos

[0075] As proteínas terapêuticas usados nos métodos descritos aqui, por exemplo, em combinação com um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, podem ser anticorpos terapêuticos. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD20 é rituximab. Rituximab (RITUXAN[®], Biogen/Genentech) é anticorpo IgG₁ kappa

monoclonal de murino/humano quimérico dirigido contra o antígeno CD20. O rituximab tem um peso molecular aproximado de 145 kD e uma afinidade de ligação pelo antígeno CD20 de aproximadamente 8,0 nM. O rituximab é produzido por cultura em suspensão de células de mamífero (Ovário de *Hamster* Chinês) em um meio nutriente contendo o antibiótico gentamicina. A gentamicina não é detectável no produto final. RITUXAN® é um concentrado líquido estéril, transparente, incolor, isento de conservantes para administração intravenosa. RITUXAN® é fornecido a uma concentração de 10 mg/mL em frascos de uso único de 100 mg/10 mL ou 500 mg/50 mL. O produto é formulado em polissorbato 80 (0,7 mg/mL), cloreto de sódio (9 mg/mL), citrato de sódio di-hidratado (7,35 mg/mL) e Água para Injeção. O pH é 6,5. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD20 é ocrelizumab. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD20 é ofatumumab. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD20 é obinutuzumab. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD20 é tositumomab. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD20 é ibritumomab. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD20 é ocaratuzumab. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD20 é veltuzumab.

[0076] Como usado aqui e a não ser que de outro modo especificado, os termos “cerca de” ou “aproximadamente” significam dentro de mais ou menos 10% de um dado valor ou gama. Em casos onde um número inteiro é requerido, os termos significam dentro de mais ou menos 10% de um dado valor ou gama, arredondado para cima ou para baixo até ao número inteiro mais próximo.

[0077] Como usado aqui, os termos “anticorpo” e “imunoglobulina” e “Ig” são termos da técnica e podem ser usados indistintamente aqui e se referem a uma molécula com um local de ligação ao antígeno que se liga especificamente a um antígeno.

[0078] Os anticorpos proporcionados aqui podem incluir, por exemplo,

anticorpos monoclonais, anticorpos recombinantemente produzidos, anticorpos monoespecíficos, anticorpos multiespecíficos (incluindo anticorpos biespecíficos), anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos murinos (p.ex., anticorpos de camundongo ou rato), anticorpos quiméricos, anticorpos sintéticos e anticorpos tetraméricos compreendendo duas moléculas de cadeia pesada e duas de cadeia leve. Em modalidades específicas, os anticorpos podem incluir, mas não estão limitados a, um monômero de cadeia leve de anticorpo, um monômero de cadeia pesada de anticorpo, um dímero de cadeia leve de anticorpo, um dímero de cadeia pesada de anticorpo, um par cadeia leve de anticorpo-cadeia pesada de anticorpo, intracorpos, anticorpos heteroconjugados, anticorpos de domínio único e anticorpos monovalentes. Em uma modalidade específica, os anticorpos podem incluir fragmentos de ligação ao antígeno ou fragmentos de ligação ao epítipo tais como, mas não se limitando a, anticorpos de cadeia única ou Fvs de cadeia única (scFv) (p.ex., incluindo monoespecíficos, biespecíficos, *etc.*), anticorpos camelizados, *affybodies*, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos F(ab')₂ e Fvs ligados em dissulfeto (sdFv). Em certas modalidades, os anticorpos descritos aqui se referem a populações de anticorpos policlonais.

[0079] Os anticorpos podem ser de qualquer tipo (p.ex., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA ou IgY), qualquer classe (p.ex., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ ou IgA₂) ou qualquer subclasse (p.ex., IgG_{2a} ou IgG_{2b}) de molécula de imunoglobulina. Em certas modalidades, os anticorpos descritos aqui são anticorpos IgG ou uma sua classe (p.ex., IgG₁, IgG₂, IgG₃ ou IgG₄ humana) ou subclasse. Em certas modalidades, os anticorpos descritos aqui são anticorpos IgG₁ (p.ex., IgG₁ humana) ou uma sua subclasse. Em certas modalidades, os anticorpos IgG₁ descritos aqui compreendem uma ou mais substituições e/ou deleções de aminoácidos na região constante. Em certas modalidades, os anticorpos descritos aqui são

anticorpos IgG₄ (p.ex., IgG₄ humana) ou uma sua subclasse. Em certas modalidades, os anticorpos IgG₄ descritos aqui compreendem uma ou mais substituições e/ou deleções de aminoácidos na região constante.

[0080] Como usado aqui, um “antígeno” é uma fração ou molécula que contém um epítopo ao qual um anticorpo pode se ligar especificamente. Como tal, um antígeno é também especificamente ligado por um anticorpo.

[0081] Como usado aqui, um “epítopo” é um termo na técnica e se refere a uma região localizada de um antígeno ao qual um anticorpo pode se ligar especificamente. Um epítopo pode ser um epítopo linear ou um epítopo conformacional, não linear ou descontínuo. No caso de um antígeno de polipeptídeo, por exemplo, um epítopo pode ser aminoácidos contíguos do polipeptídeo (um “epítopo” linear) ou um epítopo pode compreender aminoácidos de duas ou mais regiões não contíguas do polipeptídeo (um epítopo “conformacional”, “não linear” ou “descontínuo”). Será apreciado por um perito na técnica que, em geral, um epítopo linear pode ou não estar dependente da estrutura secundária, terciária ou quaternária.

[0082] Como usado aqui, o termo “anticorpo monoclonal” é um termo bem conhecido da técnica que se refere a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos homogêneos ou substancialmente homogêneos. O termo “monoclonal” não está limitado a qualquer método particular para fabricação do anticorpo. Geralmente, uma população de anticorpos monoclonais pode ser gerada por células, uma população de células ou uma linha de células. Em modalidades específicas, um “anticorpo monoclonal”, como usado aqui, é um anticorpo produzido por uma célula ou linha de células única em que o anticorpo se liga imuno especificamente a um epítopo de CD47 como determinado, p.ex., por ELISA ou outro ensaio de ligação ao antígeno ou ligação competitiva conhecido na técnica ou nos Exemplos proporcionados aqui. Em

modalidades particulares, um anticorpo monoclonal pode ser um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado. Em certas modalidades, um anticorpo monoclonal é um anticorpo monovalente ou anticorpo multivalente (p.ex., bivalente).

[0083] Como usado aqui, o termo “aminoácido não natural” se refere a um aminoácido que não é um aminoácido proteinogênico ou uma sua variante pós-translacionalmente modificada. Em particular, o termo se refere a um aminoácido que não é um dos 20 aminoácidos comuns ou pirrolisina ou selenocisteína ou suas variantes pós-translacionalmente modificadas.

[0084] Como usado aqui, o termo “anticorpos policlonais” se refere a uma população de anticorpos que inclui uma variedade de diferentes anticorpos que se ligam imuno especificamente aos mesmos e/ou a diferentes epítomos dentro de um antígeno ou antígenos.

[0085] Como usado aqui, os termos “região variável” ou “domínio variável” se referem a uma porção de um anticorpo, geralmente, uma porção de uma cadeia leve ou pesada de anticorpo, tipicamente cerca dos 110 a 120 aminoácidos amino-terminais em uma cadeia pesada madura e cerca dos 90 a 100 aminoácidos amino-terminais em uma cadeia leve madura. As regiões variáveis compreendem regiões determinantes de complementaridade (CDRs) flanqueadas por regiões de arcabouço (FRs). Geralmente, a orientação espacial de CDRs e FRs é como se segue, em uma direção N-terminal para C-terminal: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Sem desejar estar limitado por qualquer mecanismo ou teoria particular se acredita que as CDRs das cadeias leves e pesadas são principalmente responsáveis pela interação do anticorpo com antígeno e pela especificidade do anticorpo por um epítomo. Em uma modalidade específica, a numeração de posições de aminoácidos de anticorpos descritos aqui é de acordo com o Índice EU, como em Kabat *et al.* (1991)

Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH No. 91-3242. Em certas modalidades, a região variável é uma região variável humana. Em certas modalidades, a região variável compreende CDRs de murino (p.ex., camundongo ou rato) e regiões de arcabouço (FRs) humanas. Em modalidades particulares, a região variável é uma região variável de primata (p.ex., humano ou primata não humano). Em certas modalidades, a região variável compreende CDRs de murino (p.ex., camundongo ou rato) e regiões de arcabouço (FRs) de primata (p.ex., humano ou primata não humano). Como um exemplo não limitante, uma região variável descrita aqui é obtida a partir da montagem de dois ou mais fragmentos de sequências humanas em uma sequência humana compósita.

[0086] Em certos aspectos, as CDRs de um anticorpo podem ser determinadas de acordo com (i) o sistema de numeração de Kabat (Kabat *et al.* (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190: 382-391 e Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH No. 91-3242); ou (ii) o esquema de numeração de Chothia, que será referido como as “CDRs de Chothia” (ver, p.ex., Chothia e Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917; Al-Lazikani *et al.*, 1997, *J. Mol. Biol.*, 273: 927-948; Chothia *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.*, 227: 799-817; Tramontano A *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215 (1): 175-82; e Patente dos E.U.A: No. 7,709,226); ou (iii) o sistema de numeração ImMunoGeneTics (IMGT), por exemplo, como descrito em Lefranc, M.-P., 1999, *The Immunologist*, 7: 132-136 e Lefranc, M.-P. *et al.*, 1999, *Nucleic Acids Res.*, 27: 209-212 (“CDRs de IMGT”); ou (iv) MacCallum *et al.*, 1996, *J. Mol. Biol.*, 262: 732-745. Ver também, p.ex., Martin, A., “*Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*”, em *Antibody Engineering*, Kontermann e Dübel, eds., Capítulo 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlim (2001).

[0087] No que diz respeito ao sistema de numeração de Kabat, as CDRs dentro de uma molécula de cadeia pesada de anticorpo estão tipicamente presentes nas posições de aminoácidos 31 a 35, que podem opcionalmente incluir um ou dois aminoácidos adicionais, após 35 (referido no esquema de numeração de Kabat como 35A e 35B) (CDR1), posições de aminoácidos 50 a 65 (CDR2) e posições de aminoácidos 95 a 102 (CDR3). Usando o sistema de numeração de Kabat, as CDRs dentro de uma molécula de cadeia leve de anticorpo estão tipicamente presentes nas posições de aminoácidos 24 a 34 (CDR1), posições de aminoácidos 50 a 56 (CDR2) e posições de aminoácidos 89 a 97 (CDR3). Como é bem conhecido dos peritos na técnica, usando o sistema de numeração de Kabat, a sequência linear de aminoácidos real do domínio variável de anticorpo pode conter menos ou mais aminoácidos devido a um encurtamento ou alongamento de uma FR e/ou CDR e, como tal, o número de Kabat de um aminoácido não é necessariamente o mesmo que seu número linear de aminoácidos.

[0088] Os anticorpos proporcionados aqui podem ser de qualquer tipo (p.ex., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA ou IgY), qualquer classe (p.ex., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ ou IgA₂) ou qualquer subclasse (p.ex., IgG_{2a} ou IgG_{2b} ou uma sua mistura) de molécula de imunoglobulina. Em certas modalidades, os anticorpos descritos aqui são anticorpos IgG (p.ex., IgG humana) ou uma sua classe (p.ex., IgG₁, IgG₂, IgG₃ ou IgG₄ humana) ou subclasse.

[0089] Em aspectos específicos é proporcionado aqui um anticorpo compreendendo uma cadeia leve e cadeia pesada de anticorpo, p.ex., uma cadeia leve e cadeia pesada separadas. No que diz respeito à cadeia leve, em uma modalidade específica, a cadeia leve de um anticorpo descrito aqui é uma cadeia leve kappa (κ). Em outra modalidade específica, a cadeia leve de um anticorpo descrito aqui é uma cadeia leve lambda (λ). Em outra modalidade, a

cadeia leve é uma sequência mista, p.ex., a porção variável da cadeia leve compreende sequências de cadeia leves kappa e a região constante da cadeia leve compreende sequências de cadeia leve lambda ou *vice-versa*. Em certas modalidades, a cadeia leve de um anticorpo descrito aqui é uma cadeia leve kappa humana ou uma cadeia leve lambda humana. Exemplos não limitantes de sequências de região constante humana foram descritos na técnica, p.ex., ver Patente dos E.U.A. No. 5,693,780 e Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH No. 91-3242.

[0090] Em certas modalidades, um anticorpo anti-CD47 descrito aqui ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende sequências de aminoácidos com certa percentagem de identidade em relação a um anticorpo original.

[0091] A determinação da percentagem de identidade entre duas sequências (p.ex., sequências de aminoácidos ou sequências de ácidos nucleicos) pode ser alcançada usando um algoritmo matemático. Um exemplo não limitante de um algoritmo matemático utilizado para a comparação de duas sequências é o algoritmo de Karlin e Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 2264 2268, modificado como em Karlin e Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5873 5877. Um tal algoritmo é incorporado nos programas NBLAST e XBLAST de Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403. As pesquisas de nucleotídeos BLAST podem ser realizadas com os parâmetros do programa de nucleotídeos NBLAST definidos, p.ex., para pontuação=100, comprimento de palavra=12 para se obterem sequências de nucleotídeos homólogas de uma molécula de ácido nucleico descrita aqui. As pesquisas de proteínas BLAST podem ser realizadas com os parâmetros do programa de XBLAST definidos, p.ex., para pontuação 50, comprimento de palavra=3 para se obterem

sequências de aminoácidos homólogas de uma molécula de proteína descrita aqui. Para se obterem alinhamentos com lacunas para propósitos de comparação, Gapped BLAST pode ser utilizado como descrito em Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389 3402. Alternativamente, PSI BLAST pode ser usado para realizar uma pesquisa iterativa que detecta relações distantes entre moléculas (*Id.*). Quando se utilizam programas BLAST, Gapped BLAST e PSI Blast, os parâmetros padrão dos respectivos programas (p.ex., de XBLAST e NBLAST) podem ser usados (ver, p.ex., National Center for Biotechnology Information (NCBI) na *worldwide web*, ncbi.nlm.nih.gov). Outro exemplo não limitante, preferencial, de um algoritmo matemático utilizado para a comparação de sequências é o algoritmo de Myers e Miller, 1988, *CABIOS* 4: 11 17. Um tal algoritmo é incorporado no programa ALIGN (versão 2.0) que é parte do pacote de *software* de alinhamento de sequências GCG. Quando se utiliza o programa ALIGN para comparação de sequências de aminoácidos, uma tabela de resíduos ponderados PAM120, uma penalidade de comprimento de lacunas de 12 e uma penalidade de lacunas de 4 podem ser usadas.

[0092] A percentagem de identidade entre duas sequências pode ser determinada usando técnicas similares às aquelas descritas acima, com ou sem permissão de lacunas. No cálculo da percentagem de identidade, tipicamente somente as correspondências exatas são contadas.

[0093] Os anticorpos anti-CD47 descritos aqui incluem também anticorpos monoclonais que se ligam especificamente à CD47, em que o anticorpo não promove (p.ex., induz ou aumenta), ou causa um nível significativo de, aglutinação, p.ex., hemaglutinação de glóbulos vermelhos (“hemaglutinação de RBC”).

[0094] As composições farmacêuticas de acordo com a invenção podem incluir um anticorpo da invenção e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0095] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é um isotipo IgG. Em algumas modalidades, a região constante do anticorpo é de isotipo IgG1 humano, tendo uma sequência de aminoácidos:

(SEQ ID NO: 1) ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS
WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS
NTKVDKKVEPEYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[0096] Em algumas modalidades, a região constante de IgG1 humana é modificada no aminoácido Asn297 (Boxed, Numeração de Kabat) para prevenir a glicosilação do anticorpo, por exemplo Asn297Ala (N297A). Em algumas modalidades, a região constante do anticorpo é modificada no aminoácido Leu235 (Numeração de Kabat) para alterar as interações do receptor Fc, por exemplo Leu235Glu (L235E) ou Leu235Ala (L235A). Em algumas modalidades, a região constante do anticorpo é modificada no aminoácido Leu234 (Numeração de Kabat) para alterar as interações do receptor Fc, p.ex., Leu234Ala (L234A). Em algumas modalidades, a região constante do anticorpo é alterada em ambos os aminoácidos 234 e 235, por exemplo Leu234Ala e Leu235Ala (L234A/L235A) (índice EU de Kabat *et al.* 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*).

[0097] Em algumas modalidades, a região constante do anticorpo é de isotipo IgG2 humano, tendo uma sequência de aminoácidos:

SEQ ID NO: 2) ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS
WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVNHNKPS
NTKVDKTVR KCCVECPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC
VVVDVSHEDPKVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN
QVSLTCLVKG FYPSDISVEW ESNGQPENNY KTTTPMLDSD GSFFLYSKLT

VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

[0098] Em algumas modalidades, a região constante de IgG2 humana é modificada no aminoácido Asn297 (Boxed, Numeração de Kabat) para prevenir a glicosilação do anticorpo, p.ex., Asn297Ala (N297A).

[0099] Em algumas modalidades, a região constante do anticorpo é de isotipo IgG3 humano, tendo uma sequência de aminoácidos:

(SEQ ID NO: 3) ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS
WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS
NTKVDKRVEL KTPLGDTTHT CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCPEPKSC
DTPPPCPRCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG

[00100] Em algumas modalidades, a região constante de IgG3 humana é modificada no aminoácido Asn297 (Boxed, Numeração de Kabat) para prevenir a glicosilação do anticorpo, p.ex., Asn297Ala (N297A). Em algumas modalidades, a região constante de IgG3 humana é modificada no aminoácido 435 para prolongar a meia-vida, p.ex., Arg435H é (R435H) (índice EU de Kabat *et al.* 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*).

[00101] Em algumas modalidades, a região constante do anticorpo é de isotipo IgG4 humano, tendo uma sequência de aminoácidos:

(SEQ ID NO: 4) ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS
WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS
NTKVDKRVES CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

[00102] Em algumas modalidades, a região constante de IgG4 humana é modificada dentro da região de charneira para prevenir ou reduzir a troca de

fitas, p.ex., Ser228Pro (S228P). Em outras modalidades, a região constante de IgG4 humana é modificada no aminoácido 235 para alterar as interações do receptor Fc, p.ex., Leu235Glu (L235E). Em algumas modalidades, a região constante de IgG4 humana é modificada dentro da charneira e no aminoácido 235, p.ex., Ser228Pro e Leu235Glu (S228P/L235E). Em algumas modalidades, a região constante de IgG4 humana é modificada no aminoácido Asn297 (Numeração de Kabat) para prevenir a glicosilação do anticorpo, p.ex., Asn297Ala (N297A). Em algumas modalidades da invenção, a região constante de IgG4 humana é modificada nas posições de aminoácidos Ser228, Leu235 e Asn297 (p.ex., S228P/L235E/N297A). (índice EU de Kabat *et al.* 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*). Em outras modalidades da invenção, o anticorpo é da subclasse de IgG4 humana e não tem glicosilação. Em estas modalidades, a glicosilação pode ser eliminada por mutação na posição 297 (numeração de Kabat), por exemplo N297A. Em outras modalidades, a glicosilação pode ser eliminada por produção do anticorpo em uma célula hospedeira que não tem a capacidade de glicosilação pós-translacional, por exemplo um sistema derivado de bactérias ou leveduras ou um sistema de expressão em células de mamífero modificado.

[00103] Em algumas modalidades, a região constante de IgG humana é modificada para intensificar a ligação a FcRn. Exemplos de mutações de Fc que intensificam a ligação a FcRn são Met252Tyr, Ser254Thr, Thr256Glu (M252Y, S254T, T256E, respectivamente) (numeração de Kabat, Dall'Acqua *et al.* 2006, *J. Biol Chem* Vol 281 (33) 23514-23524) ou Met428Leu e Asn434Ser (M428L, N434S) (Zalevsky *et al.* 2010 *Nature Biotech*, Vol 28 (2) 157-159). (índice EU de Kabat *et al.* 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*).

[00104] Em algumas modalidades, a região constante de IgG1 humana é modificada para alterar a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC)

e/ou toxicidade dependente do complemento (CDC), p.ex., as modificações de aminoácidos descritas em Natsume *et al.*, 2008 *Cancer Res*, 68 (10): 3863-72; Idusogie *et al.*, 2001 *J Immunol*, 166 (4): 2571-5; Moore *et al.*, 2010 *mAbs*, 2 (2): 181-189; Lazar *et al.*, 2006 *PNAS*, 103 (11): 4005-4010, Shields *et al.*, 2001 *JBC*, 276 (9): 6591-6604; Stavenhagen *et al.*, 2007 *Cancer Res*, 67 (18): 8882-8890; Stavenhagen *et al.*, 2008 *Advan. Enzyme Regul.*, 48: 152-164; Alegre *et al.*, 1992 *J Immunol*, 148: 3461-3468; Revisto em Kaneko e Niwa, 2011 *Biodrugs*, 25 (1): 1-11.

[00105] Em algumas modalidades, a região constante de IgG humana é modificada para induzir a heterodimerização. Por exemplo, tendo uma modificação de aminoácido dentro do domínio CH3 em Thr366, que, quando substituído por um aminoácido mais volumoso, p.ex., Try (T366W), é capaz de emparelhar preferencialmente com um segundo domínio CH3 tendo modificações de aminoácidos para amino menos volumosos ácidos nas posições Thr366, Leu368 e Tyr407, p.ex., Ser, Ala e Val, respectivamente (T366S/L368A/Y407V). A heterodimerização através de modificações de CH3 pode ser adicionalmente estabilizada pela introdução de uma ligação de dissulfeto, por exemplo por mudança de Ser354 para Cys (S354C) e Y349 para Cys (Y349C) em domínios CH3 opostos (Revisto em Carter, 2001 *Journal of Immunological Methods*, 248: 7-15).

[00106] Em outras formas de realização da invenção, o anticorpo não tem glicosilação, mas não é modificado no aminoácido Asn297 (numeração de Kabat). Em estas modalidades, a glicosilação pode ser eliminada por produção do anticorpo em uma célula hospedeira que não tem uma capacidade de glicosilação pós-translacional, por exemplo um sistema derivado de bactérias ou leveduras ou um sistema de expressão em células de mamífero modificado.

Anticorpos Anti-CD47 para Uso nos Métodos Proporcionados Aqui

[00107] Em um aspecto específico, para uso nos métodos proporcionados aqui são anticorpos que se ligam especificamente à CD47 (p.ex., CD47 humana). Tais anticorpos anti-CD47 incluem todos os anticorpos divulgados no Pedido de Patente dos Estados Unidos No. de Publicação 2014/0140989, que é incorporada por referência aqui na sua totalidade. Tais anticorpos anti-CD47 incluem também todos os anticorpos divulgados no Pedido de Patente Internacional No. de Publicação WO 2016/109415, que é incorporada por referência aqui na sua totalidade.

[00108] Como usado aqui, os termos “CD47” ou “proteína associada à integrina” ou “IAP” ou “antígeno do câncer dos ovários” ou “OA3” ou “antígeno relacionado com Rh” ou “MER6” podem ser usados indistintamente e se referem a um receptor transmembranar de abrangência múltipla pertencendo à superfamília das imunoglobulinas. A sequência de aminoácidos de uma CD47 humana exemplificativa é proporcionada embaixo (No. de Acesso do GenBank Q08722.1 (GI:1171879), incorporado aqui por referência). A sequência de sinal (aminoácidos 1-18) está sublinhada.

1 MWPLVAALLL GSACCGSAQL LFNKTKSVEF TFCNDTVVIP CFVTNMEAQN
TTEVYVKWKF

61 KGRDIYTFDG ALNKSTVPTD FSSAKIEVSQ LLKGDA SLKM DKSDAVSHTG
NYTCEVTELT

121 REGETIIE LK YRVVSWFSPN ENILIVIFPI FAILLFWGQF GIKTLKYRSG
GMDEKTIALL

181 VAGLVITVIV IVGAILFVPG EYSLKNATGL GLIVTSTGIL ILLHYYVFST
AIGLTSFVIA

241 ILVIQVIAYI LAVVGLSLCI AACIPMHGPL LISGLSILAL AQLLGLVYMK
FVASNQKTIQ

301 PPRKAVEEPL NAFKESKGMM NDE (SEQ ID NO: 48)

Para clareza, a sequência de aminoácidos de uma CD47 humana exemplificativa excluindo a sequência de sinal é proporcionada embaixo.

1 QLLFNKTKSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF
DGALNKSTVP

61 TDFSSAKIEV SQLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE LTREGETIIE
LKYRVVSWFS

121 PNENILIVIF PIFAILLFWG QFGIKTLKYR SGGMDEKTIA LLVAGLVITV
IVIVGAILFV

181 PGEYSLKNAT GLGLIVTSTG ILILLHYYVF STAIGLTSFV IAILVIQVIA
YILAVVGLSL

241 CIAACIPMHG PLLISGLSIL ALAQLLGLVY MKFVASNQKT IQPPRKAVEE
PLNAFKESKG

301 MMNDE (SEQ ID NO: 49)

[00109] A invenção também proporciona composições farmacêuticas que incluem um ou mais anticorpos monoclonais que se ligam à CD47 ou um fragmento imunologicamente ativo do mesmo, em que o anticorpo não causa um nível significativo de hemaglutinação de glóbulos vermelhos após administração.

[00110] A hemaglutinação é um exemplo de uma interação homotípica, em que duas células expressando CD47 são agregadas ou aglomeradas quando tratadas com uma entidade de ligação à CD47 bivalente. A capacidade dos anticorpos da presente invenção de se ligarem à CD47 na superfície celular e não causar um fenômeno de aglomeração celular não está limitada aos glóbulos vermelhos. Foi observado que os anticorpos da presente invenção se ligam exclusivamente à CD47 de uma maneira que não promove aglomeração de linhas de células positivas quanto à CD47, p.ex., células Daudi.

[00111] Em alguns casos, o anticorpo para uso nos métodos

proporcionados aqui compreende uma região de cadeia pesada variável (VH) selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 5-30. O anticorpo compreende opcionalmente uma região de cadeia leve variável (VL) selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 31-47. Em alguns casos, o anticorpo compreende uma região de cadeia VH selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 5-30 e uma região de cadeia VL selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 31-47. Os anticorpos da invenção incluem também anticorpos tendo uma cadeia pesada variável que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica com a sequência apresentada em pelo menos uma de SEQ ID NOs: 5-30 e uma cadeia leve variável que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica com a sequência apresentada em pelo menos uma de SEQ ID NOs: 31-47. Em outros aspectos, o anticorpo compreende uma região VH proporcionada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 5, 7, 8, 11, 15-17, 20-22 e 27-30 emparelhada com uma região VL proporcionada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 31-39, 42, 43, 44 e 47. Em outra modalidade, o anticorpo compreende uma região VH proporcionada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 5, 7, 8, 11, 12, 15-17, 20-22 e 27-30 emparelhada com uma região VL proporcionada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 31, 32, 35, 40, 41, 42, 43, 44 e 47. Em ainda outro aspecto, o anticorpo compreende uma combinação de uma região de cadeia VH e uma região de cadeia VL selecionadas das combinações listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Combinações VH/VL de anticorpos anti-CD47 exemplificativas

Anticorpo	Cadeia pesada variável (VH)	Cadeia leve variável (VL)
2A1	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 31
2A1-xi	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 32

AB2,03	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 33
AB2,04	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 34
AB2,05	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 35
AB2,06	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 36
AB2,07	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 37
AB2,08	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 38
AB2,09	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 39
AB2,13	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 43
AB3,09	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 39
AB6,12	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 42
AB6,13	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 43
AB6,14	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 44
AB6,17	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 47
AB10,13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 43
AB10,14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 44
AB11,05	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 35
AB12,05	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 35
AB15,05	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 35
AB16,05	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 35
AB17,05	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 35
AB22,05	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 35
AB23,05	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 35
AB24,05	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 35
AB25,05	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 35

[00112] Em algumas modalidades, o anticorpo para CD47 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo para uso nos métodos proporcionados aqui compreende uma sequência da região determinante de complementaridade 1 (CDR1) de VH apresentada em SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 ou SEQ ID NO: 66, uma sequência de CDR2 de VH apresentada em SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 ou SEQ ID NO: 76, uma sequência de CDR3 de VH apresentada em SEQ ID NO: 52 ou SEQ ID NO: 77, uma sequência de CDR1 de VL apresentada em SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 67 ou SEQ ID NO: 68, uma sequência de CDR2 de VL apresentada em SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 ou SEQ ID NO: 71 e uma sequência de CDR3 de VL apresentada em SEQ ID NO: 55. Por exemplo, o anticorpo ou fragmento imunologicamente ativo do mesmo compreende uma sequência de CDR1 de VH apresentada em SEQ ID NO: 50, uma sequência de CDR2 de VH apresentada em SEQ ID NO: 51, uma sequência de CDR3 de VH apresentada em SEQ ID NO: 52, uma sequência de CDR1 de VL apresentada em SEQ ID NO: 53, uma sequência de CDR2 de VL apresentada em SEQ ID NO: 54 e uma sequência de CDR3 de VL apresentada em SEQ ID NO: 55. Em outro exemplo, o anticorpo ou fragmento imunologicamente ativo do mesmo compreende uma sequência de CDR1 de VH apresentada em SEQ ID NO: 50, uma sequência de CDR2 de VH apresentada em SEQ ID NO: 72, uma sequência de CDR3 de VH apresentada em SEQ ID NO: 52, uma CDR1 de VL apresentada em SEQ ID NO: 53, uma sequência de CDR2 de VL apresentada em SEQ ID NO: 71 e uma sequência de CDR3 de VL apresentada em SEQ ID NO: 55.

[00113] Em um aspecto específico é proporcionado aqui um anticorpo, p.ex., um anticorpo monoclonal, que se liga especificamente à CD47 humana, em que um tal anticorpo anti-CD47 é uma variante de um anticorpo anti-CD47

original, em que o anticorpo anti-CD47, quando produzido usando um sistema de expressão isento de células (CF), tem um título ou rendimento de expressão de anticorpos mais elevado em comparação com aquele do anticorpo anti-CD47 original quando expresso no sistema CF e em que o anticorpo anti-CD47 compreende uma ou mais modificações de aminoácidos, por exemplo, 1-15 modificações de aminoácidos, em relação ao anticorpo anti-CD47 original. Em um aspecto particular, a uma ou mais modificações de aminoácidos, por exemplo, 1-15 modificações de aminoácidos, são dentro da cadeia pesada ou VH (p.ex., SEQ ID NO: 6). Em um aspecto particular, a uma ou mais modificações de aminoácidos, por exemplo, 1-15 modificações de aminoácidos, são dentro da região de arcabouço de uma VH (p.ex., SEQ ID NO: 6). Em um certo aspecto, o anticorpo anti-CD47 proporcionado aqui é uma variante de um anticorpo anti-CD47 original compreendendo as CDRs (p.ex., CDRs de Kabat) do anticorpo anti-CD47 original.

[00114] Em um aspecto específico é proporcionado aqui um anticorpo, p.ex., um anticorpo monoclonal, que se liga especificamente à CD47 humana, em que um tal anticorpo anti-CD47 é uma variante de um anticorpo anti-CD47 original, em que o anticorpo anti-CD47, quando produzido usando um sistema de expressão isento de células (CF), tem um título ou rendimento de expressão de anticorpos mais elevado em comparação com aquele do anticorpo anti-CD47 original quando expresso no sistema CF e em que o anticorpo anti-CD47 compreende uma ou mais modificações de aminoácidos, por exemplo, 1-15 modificações de aminoácidos, em relação ao anticorpo anti-CD47 original. Em um aspecto particular, a uma ou mais modificações de aminoácidos, por exemplo, 5 ou 14 modificações de aminoácidos, são dentro da cadeia pesada ou VH (p.ex., SEQ ID NO: 6). Em um aspecto particular, a uma ou mais modificações de aminoácidos, por exemplo, 5, 10, 13 ou 14 modificações de aminoácidos, são

dentro da região de arcabouço de uma VH (p.ex., SEQ ID NO: 6). Em um aspecto particular, a uma ou mais modificações de aminoácidos, por exemplo, 5, 13 ou 14 modificações de aminoácidos, são dentro da região de arcabouço de uma VH (p.ex., SEQ ID NO: 6). Em um certo aspecto, o anticorpo anti-CD47 proporcionado aqui que é uma variante de um anticorpo anti-CD47 original compreendendo as CDRs (p.ex., CDRs de Kabat) do anticorpo anti-CD47 original. Em certos aspectos, tal anticorpo anti-CD47 é um anticorpo de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em certos aspectos, tal anticorpo anti-CD47 é um anticorpo de isotipo IgG1. Em certos aspectos, tal anticorpo anti-CD47 é um anticorpo de isotipo IgG1 de alótipo Z. Em certos aspectos, tal anticorpo anti-CD47 é um anticorpo de isotipo IgG4, tal como IgG4P ou IgG4PE.

[00115] Em um aspecto específico é proporcionado aqui um anticorpo, p.ex., um anticorpo monoclonal, que se liga especificamente à CD47 humana, em que um tal anticorpo anti-CD47 é uma variante de um anticorpo anti-CD47 original, em que o anticorpo anti-CD47, quando produzido usando um sistema de expressão isento de células (CF), tem um título ou rendimento de expressão de anticorpos mais elevado em comparação com aquele do anticorpo anti-CD47 original quando expresso no sistema CF. Em modalidades específicas, o anticorpo anti-CD47 original é o anticorpo AB6.12 (ver, p.ex., Pedido dos E.U.A. No. de Publicação US 2014/0140989 A1, que é incorporado aqui por referência na sua totalidade). As sequências de aminoácidos da região variável de cadeia pesada (VL) e região variável de cadeia leve (VL) do anticorpo AB6.12 são proporcionadas embaixo, em que as CDRs de Kabat estão sublinhadas. Em um certo aspecto, o anticorpo anti-CD47 proporcionado aqui é uma variante do anticorpo original AB6.12 e compreende as CDRs (p.ex., CDRs de Kabat) do anticorpo original AB6.12, por exemplo SEQ ID NOs: 50, 72, 52, 53, 71 e 55. Em certos aspectos, tal anticorpo anti-CD47 é um anticorpo de isotipo IgG1, IgG2,

IgG3 ou IgG4. Em certos aspectos, tal anticorpo anti-CD47 é um anticorpo de isotipo IgG1. Em certos aspectos, tal anticorpo anti-CD47 é um anticorpo de isotipo IgG1 de alótipo Z. Em certos aspectos, tal anticorpo anti-CD47 é um anticorpo de isotipo IgG4, tal como IgG4P ou IgG4PE.

[00116] Região variável de cadeia pesada (VH) do anticorpo anti-CD47 AB6.12 (as CDRs de Kabat 1-3 estão sublinhadas, SEQ ID NOs: 50, 72 e 52):

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYLHWVRQAPGQALEWMGWIDP
DQGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWG
 QGTTVTV (SEQ ID NO: 6)

[00117] Região variável de cadeia leve (VL) do anticorpo anti-CD47 AB6.12 (as CDRs de Kabat 1-3 estão sublinhadas, SEQ ID NOs: 53, 71 e 55):

[00118] NIQMTQSPSAMSASVGDRVITITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIY
RANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ
 ID NO: 42)

[00119] Em uma modalidade específica, um anti-CD47 descrito aqui compreende uma ou mais modificações de aminoácidos (p.ex., 1-15 modificações de aminoácidos), por exemplo na região de arcabouço de VH, de um anticorpo original, p.ex., um anticorpo original selecionado de anticorpos anti-CD47 descritos aqui.

[00120] Em um aspecto específico é proporcionado aqui um anticorpo, p.ex., um anticorpo monoclonal, que se liga especificamente à CD47 humana, em que um tal anticorpo anti-CD47 é uma variante de um anticorpo anti-CD47 original, em que o anticorpo anti-CD47, quando produzido usando um sistema de expressão isento de células (CF), tem um título ou rendimento de expressão de anticorpos mais elevado em comparação com aquele do anticorpo anti-CD47 original quando expresso no sistema CF e em que o anticorpo anti-CD47 compreende uma VH compreendendo a seguinte sequência N-terminal para C-

terminal:

X₁QX₂QLVQSGAEVKKX₃GX₄SVKVSCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQX₅LEWMGWIDP
DQGDTEYAQKX₆QX₇RVTX₈TX₉DX₁₀SX₁₁STAYMELX₁₂SLRSX₁₃DTAX₁₄YYCNAAYGSSS
YPMDYWGGGTTTVTV (SEQ ID NO: 89), em que os resíduos de aminoácidos sublinhados para X₁- X₁₄ estão ordenados do terminal N para o terminal C, em que X₁ é M ou não existe aminoácido na posição X₁, X₂ é um aminoácido com cadeias laterais hidrofóbicas tal como M ou V, X₃ é T ou P, X₄ é S ou A, X₅ é um aminoácido tendo cadeias laterais alifáticas tal como A ou G, X₆ é F ou L, X₇ é D ou G, X₈ é um aminoácido com cadeias laterais hidrofóbicas tal como I ou M, X₉ é R ou T, X₁₀ é R ou T, X₁₁ é M ou T, X₁₂ é S ou R, X₁₃ é um aminoácido negativamente carregado tal como E ou D e X₁₄ é um aminoácido com cadeias laterais hidrofóbicas tal como M ou V.

[00121] Em aspectos particulares, um anticorpo anti-CD47 descrito aqui compreende uma VH compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 89, em que o aminoácido na posição X₁ é qualquer aminoácido tal como M, X₂ não é M, X₃ não é T, X₄ não é S, X₅ não é A, X₆ não é F, X₇ não é D, X₈ não é I, X₉ não é R, X₁₀ não é R, X₁₁ não é M, X₁₂ não é S, X₁₃ não é E e/ou X₁₄ não é M. Em aspectos particulares, qualquer 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, ou 14 de X₁ a X₁₄ não são estes aminoácidos. Em aspectos particulares, a sequência de aminoácidos de VH não é a sequência de aminoácidos de VH do anticorpo AB6.12, por exemplo, a sequência de aminoácidos de VH não é SEQ ID NO: 6.

[00122] Em aspectos particulares, um anticorpo anti-CD47 descrito aqui compreende uma VH compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 89, em que o aminoácido na posição X₇ não é G, X₉ não é A e/ou X₁₁ não é S. Em aspectos particulares, qualquer 1, 2 ou 3 de X₇, X₉ e X₁₁ não são estes aminoácidos. Em aspectos particulares, quando o aminoácido na posição X₇ é G, então X₈ é M e/ou X₁₀ é T, X₉ não é A e/ou X₁₁ não é S.

[00123] Em aspectos particulares, um anticorpo anti-CD47 descrito aqui compreende uma VH compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 89, em que o aminoácido na posição X₇ não é G, X₈ não é M, X₉ não é E, X₁₀ não é T e/ou X₁₁ não é T. Em aspectos particulares, qualquer 1, 2, 3 ou 4 de X₇ a X₁₁ não são estes aminoácidos. Em aspectos particulares, quando o aminoácido na posição X₇ é G, então X₈ é M, X₁₀ é T, X₉ não é E e X₁₁ é T.

[00124] Em um aspecto particular, um anticorpo anti-CD47 descrito aqui compreende uma VH compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 89, em que a VH não compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30, do Pedido dos E.U.A. No. de Publicação US2014/0140989 A1, que é incorporado aqui por referência na sua totalidade. Em um aspecto particular, um anticorpo anti-CD47 descrito aqui compreende uma VH compreendendo a sequência de consenso de SEQ ID NO: 89, em que a VH não compreende as regiões de arcabouço da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30, do Pedido dos E.U.A. No. de Publicação US2014/0140989 A1, que é incorporado aqui por referência na sua totalidade.

[00125] Em aspectos particulares, X₁ é M, X₂ é V, X₃ é P, X₄ é A, X₅ é G, X₆ é L, X₇ é G, X₈ é M, X₉ é T, X₁₀ é T, X₁₁ é T, X₁₂ é R, X₁₃ é D e/ou X₁₄ é V. Em modalidades particulares, qualquer 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, ou 14 de X₁ a X₁₄ são estes aminoácidos.

[00126] Em aspectos particulares, X₁ é M, X₂ é M, X₃ é P, X₄ é S, X₅ é A, X₆ é F, X₇ é G, X₈ é I, X₉ é R, X₁₀ é T, X₁₁ é T, X₁₂ é R, X₁₃ é E e/ou X₁₄ é V. Em modalidades particulares, qualquer 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, ou 14 de X₁ a X₁₄ são estes aminoácidos.

[00127] Em um aspecto particular, um anticorpo anti-CD47 proporcionado

aqui não é o anticorpo AB6.12. Em um aspecto particular, um anticorpo anti-CD47 proporcionado aqui não compreende uma VH (p.ex., SEQ ID NO: 6) e/ou uma VL (p.ex., SEQ ID NO: 42) do anticorpo AB6.12.

[00128] Em um aspecto específico, um anticorpo anti-CD47 proporcionado aqui compreende uma das seguintes sequências de aminoácidos de VH apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Sequência de aminoácidos de VH

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência de aminoácidos de VH
89	Consenso	<u>X</u> ₁ <u>Q</u> <u>X</u> ₂ QLVQSGAEVKK <u>X</u> ₃ <u>G</u> <u>X</u> ₄ SVKVSCKASGFNIKDY <u>Y</u> LHWVRQAPGQ <u>X</u> ₅ LEWMGWIDPDQGDTEYAQK <u>X</u> ₆ Q <u>X</u> ₇ RVT <u>X</u> ₈ T <u>X</u> ₉ D <u>X</u> ₁₀ S <u>X</u> ₁₁ STAYMEL <u>X</u> ₁₂ SLRS <u>X</u> ₁₃ DTA <u>X</u> ₁₄ YYC <u>N</u> AAYGSSSYPM <u>D</u> YWGGTTTVT
90	13m	MQVQLVQSGAEVKK <u>P</u> GASVKVSCKASGFNIKDY <u>L</u> HWVRQAPGQ <u>G</u> LEWMGWIDPDQGDTEYAQK <u>L</u> <u>Q</u> <u>G</u> RVT <u>M</u> T <u>I</u> D <u>I</u> S <u>I</u> STAYMEL <u>R</u> SLRSDDTA <u>Y</u> YYCNAAYGS SSYPMDYWGGTTTVT
91	5m	MQMQLVQSGAEVKK <u>P</u> GSSVKVSCKASGFNIKDY <u>L</u> HWVRQAPGQALEWMGWIDPDQGDTEYAQK <u>L</u> <u>Q</u> <u>G</u> RVTMTTDT <u>S</u> <u>I</u> STAYMEL <u>R</u> SLRSDDTA <u>Y</u> YYCNAAYGS SSYPMDYWGGTTTVT

[00129] Em um aspecto específico é proporcionado aqui um anticorpo, p.ex., um anticorpo monoclonal, que se liga especificamente à CD47 humana, em que um tal anticorpo anti-CD47 é uma variante de um anticorpo anti-CD47 original, em que o anticorpo anti-CD47, quando produzido usando um sistema de expressão isento de células (CF), tem um título ou rendimento de expressão de anticorpos mais elevado em comparação com aquele do anticorpo anti-CD47 original quando expresso no sistema CF e em que o anticorpo anti-CD47

compreende uma VH compreendendo SEQ ID NO: 90. Em certos aspectos, tal anticorpo anti-CD47 é um anticorpo de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em certos aspectos, tal anticorpo anti-CD47 é um anticorpo de isotipo IgG1. Em certos aspectos, tal anticorpo anti-CD47 é um anticorpo de isotipo IgG1 de alótipo Z. Em certos aspectos, tal anticorpo anti-CD47 é um anticorpo de isotipo IgG4, tal como IgG4P ou IgG4PE.

[00130] Em um aspecto específico é proporcionado aqui um anticorpo, p.ex., um anticorpo monoclonal, que se liga especificamente à CD47 humana, em que um tal anticorpo anti-CD47 é uma variante de um anticorpo anti-CD47 original, em que o anticorpo anti-CD47, quando produzido usando um sistema de expressão isento de células (CF), tem um título ou rendimento de expressão de anticorpos mais elevado em comparação com aquele do anticorpo anti-CD47 original quando expresso no sistema CF e em que o anticorpo anti-CD47 compreende uma VH compreendendo SEQ ID NO: 91. Em certos aspectos, tal anticorpo anti-CD47 é um anticorpo de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em certos aspectos, tal anticorpo anti-CD47 é um anticorpo de isotipo IgG1. Em certos aspectos, tal anticorpo anti-CD47 é um anticorpo de isotipo IgG1 de alótipo Z. Em certos aspectos, tal anticorpo anti-CD47 é um anticorpo de isotipo IgG4, tal como IgG4P ou IgG4PE.

[00131] Em um aspecto particular, um anticorpo anti-CD47 (IgG1-13m) proporcionado aqui compreende uma cadeia pesada de IgG1 compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentado embaixo:

MQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQGLEWMGWI
DPDQGDTEYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCNAAYGSSSYPM DY
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 81)

[00132] Em um aspecto particular, um anticorpo anti-CD47 (IgG1-13mZ) proporcionado aqui compreende uma cadeia pesada de alótipo IgG1-Z compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentado embaixo:

MQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQGLEWMGWI
DPDQGDTEYAQKLQGRVTMTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCNAAYGSSSYPM DY
WGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 82)

[00133] Em um aspecto particular, um anticorpo anti-CD47 (IgG1-5m) proporcionado aqui compreende uma cadeia pesada de IgG1 compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentado embaixo:

MQMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWI
DPDQGDTEYAQKFQGRVTITRDRSTSTAYMELRSLRSED TAVYYCNAAYGSSSYPM DYW
GQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 83)

[00134] Em um aspecto particular, um anticorpo anti-CD47 (IgG4P-13m) proporcionado aqui compreende um anticorpo IgG4P compreendendo a

sequência de aminoácidos como apresentado embaixo:

MQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYHLHWVRQAPGQGLEWMGWI
DPDQGDTEYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCNAAYGSSSYPM DY
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSDDLGTQYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT
VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 84)

[00135] Em um aspecto particular, um anticorpo anti-CD47 (IgG4P-5m) proporcionado aqui compreende uma cadeia pesada de IgG4P compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentado embaixo:

MQMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDYHLHWVRQAPGQALEWMGWI
DPDQGDTEYAQKFQGRVTITRDRSTSTAYMELRSLRSEDTAVYYCNAAYGSSSYPM DYW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSDDLGTQYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE
FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVD
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 85)

[00136] Em um aspecto particular, um anticorpo anti-CD47 (IgG4PE-13m) proporcionado aqui compreende uma cadeia pesada de IgG4PE compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentado embaixo:

MQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYHLHWVRQAPGQGLEWMGWI
DPDQGDTEYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCNAAYGSSSYPM DY
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSDDLGTQYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP

APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 86)

[00137] Em um aspecto particular, um anticorpo anti-CD47 (IgG4PE-5m) proporcionado aqui compreende uma cadeia pesada de IgG4PE compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentado embaixo:

MQMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWI
 DPDQGDTEYAQKFQGRVTITRDRSTSTAYMELRSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSYPMQDYW
 GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFPAYLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVEVKYGGPPCPKPAPE
 FEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 87)

[00138] Em um aspecto específico é proporcionado aqui um anticorpo, p.ex., um anticorpo monoclonal, que se liga especificamente à CD47 humana, em que um tal anticorpo anti-CD47 é uma variante de um anticorpo anti-CD47 original, em que o anticorpo anti-CD47, quando produzido usando um sistema de expressão isento de células (CF), tem um título ou rendimento de expressão de anticorpos mais elevado em comparação com aquele do anticorpo anti-CD47 original quando expresso no sistema CF e em que o anticorpo anti-CD47 compreende uma cadeia leve compreendendo uma região constante de cadeia leve kappa ou lambda (p.ex., região constante de cadeia kappa ou lambda humana), por exemplo SEQ ID NO: 88.

[00139] Em um aspecto específico é proporcionado aqui um anticorpo, p.ex., um anticorpo monoclonal, que se liga especificamente à CD47 humana,

em que um tal anticorpo anti-CD47 é uma variante de um anticorpo anti-CD47 original, em que o anticorpo anti-CD47, quando produzido usando um sistema de expressão isento de células (CF), tem um título ou rendimento de expressão de anticorpos mais elevado em comparação com aquele do anticorpo anti-CD47 original quando expresso no sistema CF e em que o anticorpo anti-CD47 compreende (i) uma VH descrita aqui (p.ex., SEQ ID NO: 89, 90 ou 91) ou uma cadeia pesada descrita aqui (p.ex., qualquer uma das SEQ ID Nos: 81-87) e (ii) uma cadeia leve compreendendo uma região constante de cadeia leve kappa ou lambda (p.ex., região constante de cadeia leve kappa ou lambda humana), por exemplo SEQ ID NO: 88, p.ex., como apresentado embaixo (cadeia leve de anticorpo anti-CD47 (Igk)), ou SEQ ID NO: 88 sem o aminoácido M no terminal M:

MNIQMTQSPSAMSASVGDRVITITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRL
VSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPTYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 88).

[00140] Em certas modalidades, um anticorpo descrito aqui ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende um domínio VL tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% identidade de sequências com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, em que o anticorpo se liga especificamente à CD47. Em certas modalidades, um anticorpo descrito aqui ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende um domínio VL tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% identidade de sequências com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, em que o anticorpo se liga especificamente à CD47 e em que o anticorpo compreende CDRs (p.ex., CDRs 1-3 de VL) que são idênticas às CDRs

(p.ex., CDRs 1-3 de VL) de SEQ ID NO: 42 (p.ex., SEQ ID NO: 53, 71 e 55).

[00141] Em certas modalidades, um anticorpo descrito aqui ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma cadeia leve tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% identidade de sequências com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 88, em que o anticorpo se liga especificamente à CD47. Em certas modalidades, um anticorpo descrito aqui ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende um domínio leve tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% identidade de sequências com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 88, em que o anticorpo se liga especificamente à CD47 e em que o anticorpo compreende CDRs (p.ex., CDRs 1-3 de VL) que são idênticas às CDRs (p.ex., CDRs 1-3 de VL) de SEQ ID NO: 88 (p.ex., SEQ ID NO: 53, 71 e 55).

[00142] Em certas modalidades, um anticorpo descrito aqui ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende um domínio VH tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% identidade de sequências com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, em que o anticorpo se liga especificamente à CD47 e em que o anticorpo anti-CD47, quando produzido usando um sistema de expressão isento de células, tem um título ou rendimento de expressão de anticorpos mais elevado em comparação com o anticorpo original quando produzido no sistema de expressão CF. Em certas modalidades, um anticorpo descrito aqui ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende um domínio VH tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% identidade de sequências com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, em que o anticorpo se liga especificamente à CD47 e em que o anticorpo compreende CDRs (p.ex., CDRs 1-

3 de VL) que são idênticas às CDRs (p.ex., CDRs 1-3 de VL) de SEQ ID NO: 6 (p.ex., SEQ ID NO: 50, 72 e 52).

[00143] Em certas modalidades, um anticorpo descrito aqui ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma cadeia leve tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% identidade de sequências com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 78, em que o anticorpo se liga especificamente à CD47 e em que o anticorpo anti-CD47, quando produzido usando um sistema de expressão isento de células, tem um título ou rendimento de expressão de anticorpos mais elevado em comparação com o anticorpo original quando produzido no sistema de expressão CF. Em certas modalidades, um anticorpo descrito aqui ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende um domínio pesado tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% identidade de sequências com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 78, em que o anticorpo se liga especificamente à CD47 e em que o anticorpo compreende CDRs (p.ex., CDRs 1-3 de VL) que são idênticas às CDRs (p.ex., CDRs 1-3 de VL) de SEQ ID NO: 78 (p.ex., SEQ ID NO: 53, 71 e 55).

[00144] Em certas modalidades, um anticorpo descrito aqui ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma cadeia leve tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% identidade de sequências com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, em que o anticorpo se liga especificamente à CD47 e em que o anticorpo anti-CD47, quando produzido usando um sistema de expressão isento de células, tem um título ou rendimento de expressão de anticorpos mais elevado em comparação com o anticorpo original quando produzido no sistema de expressão CF. Em certas modalidades, um anticorpo

descrito aqui ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende um domínio pesado tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% identidade de sequências com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, em que o anticorpo se liga especificamente à CD47 e em que o anticorpo compreende CDRs (p.ex., CDRs 1-3 de VL) que são idênticas às CDRs (p.ex., CDRs 1-3 de VL) de SEQ ID NO: 79 (p.ex., SEQ ID NO: 53, 71 e 55).

[00145] Em certas modalidades, um anticorpo descrito aqui ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma cadeia leve tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% identidade de sequências com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, em que o anticorpo se liga especificamente à CD47 e em que o anticorpo anti-CD47, quando produzido usando um sistema de expressão isento de células, tem um título ou rendimento de expressão de anticorpos mais elevado em comparação com o anticorpo original quando produzido no sistema de expressão CF. Em certas modalidades, um anticorpo descrito aqui ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende um domínio pesado tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% identidade de sequências com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 80, em que o anticorpo se liga especificamente à CD47 e em que o anticorpo compreende CDRs (p.ex., CDRs 1-3 de VL) que são idênticas às CDRs (p.ex., CDRs 1-3 de VL) de SEQ ID NO: 80 (p.ex., SEQ ID NO: 53, 71 e 55).

[00146] A Tabela 3 proporciona uma tabela das sequências de aminoácidos de anticorpos anti-CD47 descritas aqui. Em certas modalidades, um anticorpo descrito aqui compreende qualquer sequência de região variável de cadeia leve da Tabela 3 e qualquer sequência de região variável de cadeia pesada da Tabela

3.

Tabela 3. Sequências de aminoácidos de anticorpos anti-CD47.

SEQ ID NO:	DESCRIÇÃO	Sequência de Aminoácidos
1	IgG1	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
2	IgG2	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KCCVECPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP KVSNGKLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPDISVEW ESNGQPENNY KTTTPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK
3	IgG3	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRVEL KTPLGDTTHT CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT

		LMISRTPEVT CVVVDVSHED CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
4	IgG4	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK
5	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	EVQLQQSGAE LVRSGASVKL SCTASGFNIK DYYLHWVKQR PEQGLEWIGW IDPDNGDTEF APKFQ GKATM TADTSSNTAY LQLSSLTSED TAVYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTSVTV
6	Região variável de cadeia pesada do anticorpo anti- CD47 AB6.12	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGFNIK DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDQGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
7	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGFNIK DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY

	humanizado para CD47	MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
8	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	EVQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGFNIK DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
9	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGFNIK DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQGRVTM TADTSSNTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
10	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGFNIK DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQGRVTM TEDTSTDYAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
11	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGFNIK DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDQGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
12	Região de	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGFNIK

	cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDYGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
13	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGFNIK DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDSGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
14	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGFNIK DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNADTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
15	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGFNIK DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNTDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
16	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGFNIK DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY

	humanizado para CD47	MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSYPMDYW GQGTTVTV*
17	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGYTFT YYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSYPMDYW GQGTTVTV
18	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGFTFT YYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSYPMDYW GQGTTVTV
19	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGYNFT YYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSYPMDYW GQGTTVTV
20	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGYTIT YYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSYPMDYW GQGTTVTV
21	Região de	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGYTFK

	cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	YYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
22	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGYTFT DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
23	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGFTFT DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
24	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGFTIT DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
25	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGYTFK DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY

	humanizado para CD47	MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
26	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGFTFK DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
27	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGFNIK DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY LQLSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
28	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	QMQLVQSGAE VKKTGSSVKV SCKASGFNIK DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLTSED TAVYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
29	Região de cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	EVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGFNIK DYYLHWVRQA PGQALEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
30	Região de	EVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGFNIK

	cadeia pesada variável de um anticorpo humanizado para CD47	DYYLHWVQQA PGKGLEWMGW IDPDNGDTEY AQKFQDRVTI TRDRSMSTAY MELSSLRSED TAMYYCNAAY GSSSYPMDYW GQGTTVTV
31	Região de cadeia leve variável de um anticorpo humanizado para CD47	DIKMTQSPSS LYASLGERVT ITCKASQDIH RYLSWFQQKP GKSPKILIYR ANRLVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYCLQ YDEFPYTFGG GTKLEMK
32	Região de cadeia leve variável de um anticorpo humanizado para CD47	DIKMTQSPSS LYASLGERVT ITCKASQDIH RYLSWFQQKP GKSPKILIYR ANRLVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYCLQ YDEFPYTFGG GTKLEIK
33	Região de cadeia leve variável de um anticorpo humanizado para CD47	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIH RYLSWYQQKP GKAPKLLIYR ANRLVDGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCLQ YDEFPYTFGG GTKVEIK
34	Região de cadeia leve variável de um anticorpo	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIH RYLSWFQQKP GKAPKSLIYR ANRLVDGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQP

	humanizado para CD47	EDFATYYCLQ YDEFPYTFGG GTKVEIK
35	Região de cadeia leve variável de um anticorpo humanizado para CD47	NIQMTQSPSA MSASVGDRVT ITCKASQDIH RYLSWFQQKP GKVPKHLIYR ANRLVDGVPS RFSGSGSGTE FTLTISLQP EDFATYYCLQ YDEFPYTFGG GTKVEIK
36	Região de cadeia leve variável de um anticorpo humanizado para CD47	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIH RYLSWYQQKP GKAPKRLIYR ANRLVDGVPS RFSGSGSGTE FTLTISLQP EDFATYYCLQ YDEFPYTFGG GTKVEIK
37	Região de cadeia leve variável de um anticorpo humanizado para CD47	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIH RYLAWYQQKP GKVPKLLIYR ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQP EDVATYYCLQ YDEFPYTFGQ GTKVEIK
38	Região de cadeia leve variável de um anticorpo humanizado para CD47	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQDIH RYLAWYQQKP GQAPRLLIYR ANRRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCLQ YDEFPYTGFQ GTRLEIK
39	Região de	DIQMTQSPSA MSASVGDRVT ITCKASQDIH

	cadeia leve variável de um anticorpo humanizado para CD47	RYLSWFQQKP GKVPKHLIYR ANRLVDGVPS RFSGSGSGTE FTLTISLQP EDFATYYCLQ YDEFPYTFGG GTKVEIK
40	Região de cadeia leve variável de um anticorpo humanizado para CD47	NIQMTQSPSA MSASVGDRVT ITCRARQGIH RYLSWFQQKP GKVPKHLIYR ANRLVDGVPS RFSGSGSGTE FTLTISLQP EDFATYYCLQ YDEFPYTFGG GTKVEIK
41	Região de cadeia leve variável de um anticorpo humanizado para CD47	NIQMTQSPSA MSASVGDRVT ITCKASQDIH RYLSWFQQKP GKVPKILIYR ANRLVDGVPS RFSGSGSGTE FTLTISLQP EDFATYYCLQ YDEFPYTFGG GTKVEIK
42	Região variável de cadeia leve do anticorpo anti-CD47 AB6.12	NIQMTQSPSA MSASVGDRVT ITCKASQDIH RYLSWFQQKP GKVPKHLIYR ANRLVSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISLQP EDFATYYCLQ YDEFPYTFGG GTKVEIK
43	Região de cadeia leve variável de um anticorpo humanizado	NIQMTQSPSA MSASVGDRVT ITCRARQGIH RYLSWFQQKP GKVPKILIYR ANRLVDGVPS RFSGSGSGTE FTLTISLQP EDFATYYCLQ YDEFPYTFGG GTKVEIK

	para CD47	
44	Região de cadeia leve variável de um anticorpo humanizado para CD47	NIQMTQSPSA MSASVGDRVT ITCRARQGIH RYLSWFQQKP GKVPKHLIYR ANRLVSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISLQP EDFATYYCLQ YDEFPYTFGG GTKVEIK
45	Região de cadeia leve variável de um anticorpo humanizado para CD47	NIQMTQSPSA MSASVGDRVT ITCKASQDIH RYLSWFQQKP GKVPKLLIYR ANRLVDGVPS RFSGSGSGTE FTLTISLQP EDFATYYCLQ YDEFPYTFGG GTKVEIK
46	Região de cadeia leve variável de um anticorpo humanizado para CD47	NIQMTQSPSA MSASVGDRVT ITCKASQDIH RYLSWFQQKP GKVPKLLIYR ANRLVSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISLQP EDFATYYCLQ YDEFPYTFGG GTKVEIK
47	Região de cadeia leve variável de um anticorpo humanizado para CD47	NIQMTQSPSA MSASVGDRVT ITCRARQGIH RYLSWFQQKP GKVPKLLIYR ANRLVSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISLQP EDFATYYCLQ YDEFPYTFGG GTKVEIK
48	SEQUÊNCIA DE CD47	MWPLVAALLL GSACCGSAQL LFNKTKSVEF TFCNDTVVIP CFVTNMEAQN TTEVYVKWKF

	HUMANA EXEMPLIFICATI VA	KGRDIYTFDG ALNKSTVPTD FSSAKIEVSQ LLKGDASLKM DKSDAVSHTG NYTCEVTELT REGETIIELEK YRVVSWFSPN ENILIVIFPI FAILLFWGQF GIKTLKYRSG GMDEKTIALL VAGLVITVIV IVGAILFVPG EYSLKNATGL GLIVTSTGIL ILLHYYVFST AIGLTSFVIA ILVIQVIAYI LAVVGLSLCI AACIPMHGPL LISGLSILAL AQLLGLVYMK FVASNQKTIQ PPRKAVEEPL NAFKESKGMM NDE
49	SEQUÊNCIA DE CD47 HUMANA EXEMPLIFICATI VA SEM SEQUÊNCIA DE SINAL	QLLFNKTKSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE LTREGETIIE LKYRVVSWFS PNENILIVIF PIFAILLFWG QFGIKTLKYR SGGMDEKTIA LLVAGLVITV IVIVGAILFV PGEYSLKNAT GLGLIVTSTG ILILLHYYVF STAIGLTSFV IAILVIQVIA YILAVVGLSL CIAACIPMHG PLLISGLSIL ALAQLLGLVY MKFVASNQKT IQPPRKAVEE PLNAFKESKG MMNDE
50	sequência de aminoácidos de CDR1 de VH	GFNIKDYLLH
51	sequência de aminoácidos de CDR2 de VH	WIDPDNGDTE
52	sequência de	NAAYGSSSYPM DY

	aminoácidos de CDR3 de VH	
53	sequência de aminoácidos de CDR1 de VL	KASQDIHRYLS
54	sequência de aminoácidos de CDR2 de VL	RANRLVD
55	sequência de aminoácidos de CDR3 de VL	LQYDEFPYT
56	epítipo de CD47	KGRD
57	sequência de aminoácidos de CDR1 de VH	GYTFTYYYLH
58	sequência de aminoácidos de CDR1 de VH	GFTFTYYYLH
59	sequência de aminoácidos de CDR1 de VH	GYNFTYYYLH
60	sequência de aminoácidos de CDR1 de VH	GYTITYYYLH
61	sequência de aminoácidos	GYTFKYYYLH

	de CDR1 de VH	
62	sequência de aminoácidos de CDR1 de VH	GYTFTDYLLH
63	sequência de aminoácidos de CDR1 de VH	GFTFTDYLLH
64	sequência de aminoácidos de CDR1 de VH	GFTITDYLLH
65	sequência de aminoácidos de CDR1 de VH	GYTFKDYLLH
66	sequência de aminoácidos de CDR1 de VH	GFTFKDYLLH
67	sequência de aminoácidos de CDR1 de VL	RASQDIHRYLA
68	sequência de aminoácidos de CDR1 de VL	RARQGIHRYLS
69	sequência de aminoácidos de CDR2 de VL	RANRLQS
70	sequência de aminoácidos	RANRRAT

	de CDR2 de VL	
71	sequência de aminoácidos de CDR2 de VL	RANRLVS
72	sequência de aminoácidos de CDR2 de VH	WIDPDQGDTE
73	sequência de aminoácidos de CDR2 de VH	WIDPDYGDTE
74	sequência de aminoácidos de CDR2 de VH	WIDPDSGDTE
75	sequência de aminoácidos de CDR2 de VH	WIDPDNADTE
76	sequência de aminoácidos de CDR2 de VH	WIDPDNTDTE
77	sequência de aminoácidos de CDR3 de VH	NAAYGSSPYPM DY
78	Cadeia pesada do anticorpo anti-CD47 IgG1	MQMQLVQSGA EVKKTGSSVK VSCKASGFNI KDYYLHWVRQ APGQALEWMG WIDPDQGDTE YAQKFQDRV T ITRDRSMSTA YME LSSLRSE DTAMYYCNA A YGSSSYPM DY

		<p>WGQGTTVTVS</p> <p>SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV</p> <p>KDYFPEPVTV</p> <p>SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV</p> <p>TVPSSSLGTQ</p> <p>TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC</p> <p>PPCPAPELLG</p> <p>GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV</p> <p>SHEDPEVKFN</p> <p>WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL</p> <p>TVLHQDWLNG</p> <p>KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP</p> <p>QVYTLPPSRD</p> <p>ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ</p> <p>PENNYKTTTP</p> <p>VLDSGDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS</p> <p>VMHEALHNHY</p> <p>TQKSLSLSPG K</p>
79	Cadeia pesada do anticorpo anti-CD47 IgG4P	<p>MQMQLVQSGA EVKKTGSSVK VSCKASGFNI</p> <p>KDYHLHWVRQ</p> <p>APGQALEWMG WIDPDQGDTE YAQKFQDRVT</p> <p>ITRDRSMSTA</p> <p>YMELSSLRSE DTAMYYCNAA YGSSSYPM DY</p> <p>WGQGTTVTVS</p> <p>SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV</p> <p>KDYFPEPVTV</p> <p>SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV</p>

		<p>TVPSSSLGTK</p> <p>TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC</p> <p>PAPEFLGGPS</p> <p>VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE</p> <p>DPEVQFNWYV</p> <p>DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL</p> <p>HQDWLNGKEY</p> <p>KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY</p> <p>TLPPSQEEMT</p> <p>KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN</p> <p>NYKTTTPVLD</p> <p>SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH</p> <p>EALHNHYTQK</p> <p>SLSLSLGK</p>
80	<p>Cadeia pesada</p> <p>do anticorpo</p> <p>anti-CD47</p> <p>IgG4PE</p> <p>(compreenden</p> <p>do</p> <p>substituições</p> <p>S228P e L235E)</p>	<p>MQMQLVQSGA EVKKTGSSVK VSCKASGFNI</p> <p>KDYHLHWVRQ APGQALEWMG WIDPDQGDTE</p> <p>YAQKFQDRVT ITRDRSMSTA YMELSSLRSE</p> <p>DTAMYVCNAA YGSSSYPMYD WGQGTTVTVS</p> <p>SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV</p> <p>KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS</p> <p>SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP</p> <p>SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFEGGPS</p> <p>VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE</p> <p>DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST</p> <p>YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP</p> <p>SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT</p> <p>KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN</p>

		NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK
81	Cadeia pesada do anticorpo anti-CD47 IgG1-13m	MQVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGFNI KDYYLHWVRQ APGQGLEWMG WIDPDQGDTE YAQKLQGRVT MTTDTSTSTA YMELRSLRSD DTAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGTTVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTWVNSGALTSGVHTFPAVLQSG SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKTPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
82	Cadeia pesada do anticorpo anti-CD47 IgG1-13mZ	MQVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGFNI KDYYLHWVRQ APGQGLEWMG WIDPDQGDTE YAQKLQGRVT MTTDTSTSTA YMELRSLRSD DTAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGTTVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTWVNSGALTSGVHTFPAVLQSG SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKTPREEQY

		<p>NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK</p> <p>ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE</p> <p>EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ</p> <p>PENNYKTPP VLDSGGSFFL YSKLTVDKSR</p> <p>WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPGK</p>
83	Cadeia pesada do anticorpo anti-CD47 IgG1-5m	<p>MQMQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCKASGFNI</p> <p>KDYLLHWVRQ APGQALEWMG WIDPDQGDTE</p> <p>YAQKFQGRVT ITRDRSTSTA YMELRSLRSE</p> <p>DTAVYYCNAA YGSSSYPM DY WGQGTTVTVS</p> <p>SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV</p> <p>KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS</p> <p>SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP</p> <p>SNTKVDKKVE PKSCDKHTC PPCPAPELLG</p> <p>GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV</p> <p>SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY</p> <p>NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK</p> <p>ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD</p> <p>ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ</p> <p>PENNYKTPP VLDSGGSFFL YSKLTVDKSR</p> <p>WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K</p>
84	Cadeia pesada do anticorpo anti-CD47 IgG4P-13m	<p>MQVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGFNI</p> <p>KDYLLHWVRQ APGQGLEWMG WIDPDQGDTE</p> <p>YAQKLQGRVT MTTDTSTSTA YMELRSLRSD</p> <p>DTAVYYCNAA YGSSSYPM DY WGQGTTVTVS</p> <p>SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV</p> <p>KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS</p> <p>SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP</p>

		SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK
85	Cadeia pesada do anticorpo anti-CD47 IgG4P-5m	MQMQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCKASGFNI KDYYLHWVRQ APGQALEWMG WIDPDQGDTE YAQKFQGRVT ITRDRSTSTA YMELRSLRSE DTAVYYCNAAYGSSSYPMYDYGWGQGTITVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPHP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK
86	Cadeia pesada do anticorpo anti-CD47 IgG4PE-13m	MQVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGFNI KDYYLHWVRQ APGQGLEWMG WIDPDQGDTE YAQKLQGRVT MTTDTSTSTA YMELRSLRSD DTAVYYCNAAYGSSSYPMYDYGWGQGTITVTVS

		<p>SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV</p> <p>KDYFPEPVTW SWNSGALTSG VHTFPAVLQS</p> <p>SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDPK</p> <p>SNTKVDKRV SKYGPPCPPC PAPEFEGGPS</p> <p>VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE</p> <p>DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST</p> <p>YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP</p> <p>SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT</p> <p>KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN</p> <p>NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE</p> <p>GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK</p>
87	Cadeia pesada do anticorpo anti-CD47 IgG4PE-5m	<p>MQMQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCKASGFNI</p> <p>KDYLLHWVRQ APGQALEWMG WIDPDQGDTE</p> <p>YAQKFQGRVT ITRDRSTSTA YMELRSLRSE</p> <p>DTAVYYCNAA YGSSSYPMYD WGQGTTVTVS</p> <p>SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV</p> <p>KDYFPEPVTW SWNSGALTSG VHTFPAVLQS</p> <p>SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDPK</p> <p>SNTKVDKRV SKYGPPCPPC PAPEFEGGPS</p> <p>VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE</p> <p>DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST</p> <p>YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP</p> <p>SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT</p> <p>KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN</p> <p>NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE</p> <p>GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK</p>
88	Cadeia leve	<p>MNIQMTQSPS AMSASVGDRV TITCKASQDI</p>

	(Kappa de Ig)	HRYLSWFQQK PGKVPKHLIY RANRLVSGVP SRFSGSGSGT EFTLTISLQ PEDFATYYCL QYDEFPYTFG GGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTLSF NRGEC
89	sequência de consenso para região variável de cadeia pesada do anticorpo anti-CD47	X ₁ QX ₂ QLVQSGAEVKKX ₃ GX ₄ SVKVSCASGFNIKDY LHWVRQAPGQX ₅ LEWMGWIDPDQGDTEYAQKX ₆ QX ₇ RVTX ₈ TX ₉ DX ₁₀ SX ₁₁ STAYMELX ₁₂ SLRSX ₁₃ DTAX ₁₄ YYCNAAYGSSSYPM DYWGQGTTTVTV
90	VH - 13m do anticorpo anti-CD47	VQLVQSGAEV KKP GASVKVS CKASGFNIKD YYLHWVRQAP GQGLEWMGWI DPDQGDTEYA QKLQGRVTMT TDTSTSTAYM ELRSLRSDDT AVYYCNAAYG SSSYPM DYWG QGTTTVTV
91	VH - 5m do anticorpo anti-CD47	MQMQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCKASGFNI KDYYLHWVRQ APGQALEWMG WIDPDQGDTE YAQKLQGRVT MTTDTSTSTA YMELRSLRSD DTAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGTTTVTV

[00147] Em algumas modalidades, os anticorpos para CD47 descritos aqui são usados em conjugação com um ou mais agentes adicionais ou uma combinação de agentes adicionais. Agentes adicionais adequados incluem terapias farmacêuticas e/ou cirúrgicas para uma aplicação pretendida, tal como, por exemplo, câncer. Por exemplo, os anticorpos para CD47 podem ser usados em conjunção com um ou mais agentes quimioterapêuticos ou antineoplásicos

adicionais. Alternativamente, o agente quimioterapêutico adicional é radioterapia. Em algumas modalidades, o agente quimioterapêutico é um agente indutor da morte celular. Em algumas modalidades, o agente quimioterapêutico induz uma perda de assimetria de fosfolípidos ao longo da membrana plasmática, por exemplo causa exposição à superfície celular de fosfatidilserina (PS). Em algumas modalidades, o agente quimioterapêutico induz estresse do retículo endoplasmático (ER). Em algumas modalidades, o agente quimioterapêutico é um inibidor do proteossomo. Em algumas modalidades, o agente quimioterapêutico induz a translocação de proteínas do ER para a superfície celular. Em algumas modalidades, o agente quimioterapêutico induz a translocação e exposição à superfície celular de calreticulina.

[00148] Em algumas modalidades, o anticorpo para CD47 e agente adicional são formulados em uma composição terapêutica única, e o anticorpo para CD47 e agente adicional são administrados simultaneamente. Alternativamente, o anticorpo para CD47 e agente adicional são separados um do outro, p.ex., cada um é formulado em uma composição terapêutica separada, e o anticorpo para CD47 e o agente adicional são administrados simultaneamente, ou o anticorpo CD47 e o agente adicional são administrados em momentos diferentes durante um regime de tratamento. Por exemplo, o anticorpo para CD47 é administrado antes da administração do agente adicional, o anticorpo para CD47 é administrado subsequentemente à administração do agente adicional ou o anticorpo para CD47 e o agente adicional são administrados de um modo alternado. Como descrito aqui, o anticorpo para CD47 e agente adicional são administrados em doses únicas ou em doses múltiplas.

[00149] Em aspectos particulares, os anticorpos anti-CD47 proporcionados

aqui compreendem um ou mais resíduos de aminoácidos não naturais em posições sítio-específicas. Ver, p.ex., Pedido dos E.U.A. No. de Publicação US 2014/0046030 A1, que é incorporado aqui por referência na sua totalidade. Em aspectos específicos, os resíduos de aminoácidos não naturais em posições sítio-específicas têm vantagens para produção, rendimento, solubilidade, afinidade de ligação e/ou atividade do anticorpo. Exemplos não limitantes de aminoácidos não naturais foram descritos, ver, p.ex., Pedido dos E.U.A. No. de Publicação US 2014/0066598 A1.

[00150] Em um aspecto particular são proporcionados anticorpos anti-CD47 conjugados a uma fração de conjugação ou um agente tal como uma etiqueta ou toxina. Uma fração de conjugação pode ser qualquer fração de conjugação considerada útil a um perito na técnica. Por exemplo, uma fração de conjugação pode ser um polímero, tal como poletilenoglicol, que pode melhorar a estabilidade do anticorpo *in vitro* ou *in vivo*. Uma fração de conjugação pode ter atividade terapêutica, originando deste modo um conjugado anticorpo-fármaco. Uma fração de conjugação pode ser uma carga líquida molecular que é prejudicial para células alvo. Uma fração de conjugação pode ser uma etiqueta útil para detecção ou diagnóstico. Em certos aspectos, uma fração de conjugação está ligada ao anticorpo através de uma ligação covalente direta. Em certos aspectos, uma fração de conjugação está ligada ao anticorpo através de uma ligante. Em aspectos particulares, uma fração de conjugação ou um ligante é anexado através de um dos aminoácidos não naturais de um anticorpo anti-CD47. Frações de conjugação e ligantes exemplificativas foram descritas, p.ex., ver Pedido dos E.U.A. No. de Publicação US2014/0046030 A1, que é incorporado aqui por referência na sua totalidade.

[00151] Os anticorpos ou um fragmento de ligação ao antígeno descritos aqui que se ligam imuno especificamente à CD47 (p.ex., ECD de CD47 humana)

podem ser produzidos por qualquer método conhecido na técnica.

[00152] Os anticorpos descritos aqui podem, por exemplo, incluir anticorpos quiméricos. Um anticorpo quimérico é uma molécula na qual diferentes porções do anticorpo são derivadas de diferentes moléculas de imunoglobulina. Por exemplo, um anticorpo quimérico pode conter uma região variável de um anticorpo monoclonal de camundongo ou rato fundido a uma região constante de um anticorpo humano. Métodos para produção de anticorpos quiméricos são conhecidos na técnica. Ver, p.ex., Morrison, 1985, *Science* 229: 1202; Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques* 4: 214; Gillies *et al.*, 1989, *J. Immunol. Methods* 125: 191-202; e Patentes dos E.U.A. Nos. 5,807,715, 4,816,567, 4,816,397 e 6,331,415.

[00153] Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno produzidos usando técnicas tais como aquelas descritas aqui podem ser isolados usando técnicas bem conhecidas, padrão. Por exemplo, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno podem ser adequadamente separados de, p.ex., meio de cultura, fluido de ascite, soro, lisado celular, material de reação de síntese ou similares por procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulinas tais como, por exemplo, proteína A-Sepharose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade. Como usado aqui, um anticorpo “isolado” ou “purificado” está substancialmente isento de material celular ou outras proteínas da fonte de células ou tecidos da qual o anticorpo é derivado ou substancialmente isento de precursores químicos ou outros químicos quando quimicamente sintetizado ou dos componentes do sistema de expressão CF usado para produzir os anticorpos.

[00154] Os anticorpos descritos aqui incluem fragmentos de anticorpos que reconhecem antígenos CD47 específicos e podem ser gerados por qualquer técnica conhecida dos peritos na técnica. Por exemplo, os fragmentos Fab e

F(ab')₂ descritos aqui podem ser produzidos por clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulina, usando enzimas tais como papaína (para produzir fragmentos Fab) ou pepsina (para produzir fragmentos F(ab')₂). Um fragmento Fab corresponde a um dos dois braços idênticos de uma molécula de anticorpo e contém a cadeia leve completa emparelhada com os domínios VH e CH1 da cadeia pesada. Um fragmento F(ab')₂ contém os dois braços de ligação ao antígeno de uma molécula de anticorpo ligados por ligações de dissulfeto na região de charneira. Alternativamente, os fragmentos de anticorpos descritos aqui podem ser rotineiramente produzidos através de técnicas de expressão recombinante bem conhecidas. Ver, p.ex., publicação PCT No. WO 92/22324; Mullinax *et al.*, 1992, *BioTechniques* 12 (6): 864-869; Sawai *et al.*, 1995, *AJRI* 34: 26-34; e Better *et al.*, 1988, *Science* 240: 1041-1043.

[00155] Os anticorpos descritos aqui podem, por exemplo, incluir anticorpos humanizados, p.ex., anticorpos desimunizados ou humanos compósitos. Um anticorpo humanizado pode compreender sequências de região constante humana. Em certas modalidades, um anticorpo humanizado pode ser selecionado de qualquer classe de imunoglobulinas, incluindo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, e qualquer isotipo, incluindo IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Em certas modalidades, um anticorpo humanizado pode compreender sequências constantes de cadeia leve kappa ou lambda.

[00156] Os anticorpos humanizados podem ser produzidos usando uma variedade de técnicas conhecidas na técnica, incluindo, mas não se limitando a, enxertia de CDR (Patente Europeia No. EP 239,400; Publicação internacional No. WO 91/09967; e Patentes dos E.U.A. Nos. 5,225,539, 5,530,101 e 5,585,089), *veneering* ou *resurfacing* (Patentes Europeias Nos. EP 592,106 e EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28 (4/5): 489-498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7 (6): 805-814; e Roguska *et al.*, 1994, *PNAS* 91: 969-973),

embaralhamento de cadeias (Patente dos E.U.A No. 5,565,332) e técnicas divulgadas, p.ex., na Pat. dos E.U.A. No. 6,407,213, Pat. dos E.U.A. No. 5,766,886, WO 9317105, Tan *et al.*, *J. Immunol.* 169: 1119-25 (2002), Caldas *et al.*, *Protein Eng.* 13 (5): 353-60 (2000), Morea *et al.*, *Methods* 20 (3): 267-79 (2000), Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272 (16): 10678-84 (1997), Roguska *et al.*, *Protein Eng.* 9 (10): 895-904 (1996), Couto *et al.*, *Cancer Res.* 55 (23 Sup): 5973s-5977s (1995), Couto *et al.*, *Cancer Res.* 55 (8): 1717-22 (1995), Sandhu JS, *Gene* 150 (2): 409-10 (1994) e Pedersen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 235 (3): 959-73 (1994). Ver também Patente dos E.U.A. No. de Pub. US 2005/0042664 A1 (24 de fev., 2005), cada um dos quais é incorporado por referência aqui na sua totalidade.

[00157] Os anticorpos descritos aqui podem, por exemplo, ser anticorpos multiespecíficos, p.ex., biespecíficos. Métodos para fabricação de anticorpos multiespecíficos (p.ex., biespecíficos) foram descritos, ver, por exemplo, Patentes dos E.U.A. Nos. 7951917, 7183076, 8227577, 5837242, 5989830, 5869620, 6132992 e 8586713.

[00158] Os anticorpos de domínio único, por exemplo, anticorpos não tendo as cadeias leves, podem ser produzidos por métodos bem conhecidos na técnica. Ver Riechmann *et al.*, 1999, *J. Immunol.* 231: 25-38; Nuttall *et al.*, 2000, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 1 (3): 253-263; Muylderman, 2001, *J. Biotechnol.* 74 (4): 277302; Patente dos E.U.A. No. 6,005,079; e Publicações Internacionais Nos. WO 94/04678, WO 94/25591 e WO 01/44301.

[00159] Os anticorpos humanos podem ser produzidos usando qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, camundongos transgênicos bem conhecidos que são incapazes de expressar imunoglobulinas murinas endógenas funcionais, mas que podem expressar genes de imunoglobulinas humanas, podem ser usados. Alternativamente, por exemplo, técnicas de exibição em fagos, descritas acima, podem ser utilizadas. Além do mais, em algumas

modalidades, os anticorpos humanos podem, por exemplo, ser produzidos usando hibridomas camundongo-humano. Por exemplo, linfócitos do sangue periférico humano transformados com vírus de Epstein-Barr (EBV) podem ser fundidos com células do mieloma de camundongo para produzir hibridomas camundongo-humano secretando anticorpos monoclonais humanos, e estes hibridomas camundongo-humano podem ser rastreados para se determinar quais secretam anticorpos monoclonais humanos que se ligam imuno especificamente a um antígeno alvo (p.ex., ECD de CD47 humana). Tais métodos são conhecidos e são descritos na técnica, ver, p.ex., Shinmoto *et al.*, *Cytotechnology*, 2004, 46: 19-23; Naganawa *et al.*, *Human Antibodies*, 2005, 14: 27-31.

[00160] Os domínios variáveis de anticorpos com as especificidades de ligação desejadas (loais de combinação anticorpo-antígeno) podem ser fundidos a sequências de domínio constante de imunoglobulinas. A fusão é preferencialmente com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo, pelo menos, parte das regiões de charneira, CH2 e CH3. É preferencial ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH1) contendo o local necessário para ligação à cadeia leve presente em, pelo menos, uma das fusões. DNAs codificando as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados e são cotransfectados em um organismo hospedeiro adequado. Para detalhes adicionais de geração de anticorpos biespecíficos ver, por exemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

[00161] De acordo com outra abordagem descrita em WO 96/27011, a interface entre um par de moléculas de anticorpos pode ser manipulada para maximizar a percentagem de heterodímeros que são recuperados a partir da cultura de células recombinantes. A interface preferencial compreende pelo

menos uma parte da região CH3 de um domínio constante de anticorpo. Em este método, uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos pequenas da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas por cadeias laterais maiores (p.ex., tirosina ou triptofano). “Cavidades” compensatórias de tamanho idêntico ou similar à(s) cadeia(s) lateral(ais) maior(es) são criadas na interface da segunda molécula de anticorpo por substituição de cadeias laterais de aminoácidos grandes por mais pequenas (p.ex., alanina ou treonina). Isto proporciona um mecanismo para aumento do rendimento do heterodímero em detrimento de outros produtos finais indesejados tais como homodímeros.

[00162] Os anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de comprimento total ou fragmentos de anticorpos (p.ex., anticorpos biespecíficos $F(ab')_2$). Técnicas para geração de anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpos foram descritas na literatura. Por exemplo, os anticorpos biespecíficos podem ser preparados usando ligação química. Brennan *et al.*, *Science* 229: 81 (1985) descrevem um procedimento em que anticorpos intatos são proteoliticamente clivados para gerar fragmentos $F(ab')_2$. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente complexante de tiol arsenito de sódio para estabilizar ditióis da vizinhança e prevenir formação de dissulfeto intermolecular. Os fragmentos Fab' gerados são depois convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados de Fab' -TNB é reconvertido no Fab' -tiol por redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado de Fab' -TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser usados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

Composições Farmacêuticas e Estojos

[00163] São proporcionadas aqui composições, composições farmacêuticas e estojos compreendendo um ou mais terapêuticos de proteína descritos aqui.

São também proporcionadas aqui composições, composições farmacêuticas e estojos compreendendo um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, sozinho ou em combinação com terapêuticos de proteína descritos aqui. Em particular são proporcionadas aqui composições, composições farmacêuticas e estojos compreendendo um ou mais anticorpos (p.ex., anticorpos anti-CD47), descritos aqui, ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo ou seus conjugados. Em certos aspectos, as composições (p.ex., composições farmacêuticas) descritas aqui podem ser para uso *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*. Exemplos não limitantes de usos incluem usos para reduzir a imunogenicidade, usos para modular (p.ex., inibir ou induzir/intensificar) a atividade de CD47 e usos para gerir ou tratar uma disfunção, por exemplo, câncer. Em modalidades específicas é proporcionada aqui uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo (p.ex., um anticorpo humanizado) descrito aqui (ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) e um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

[00164] Como usado aqui, o termo “farmaceuticamente aceitável” significa ser aprovado por uma agência reguladora do governo federal ou estadual ou listado na Farmacopeia dos E.U.A., Farmacopeia Europeia ou outra Farmacopeia geralmente reconhecida para uso em animais e, mais particularmente, em humanos.

[00165] As formulações contendo um ou mais anticorpos proporcionados aqui ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo podem ser preparadas para armazenamento por mistura do anticorpo tendo o grau de pureza desejado com veículos, excipientes ou estabilizantes fisiologicamente aceitáveis (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21^a ed. (2006) Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD). Tais formulações podem, por exemplo, estar na forma de, p.ex., formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Os veículos

farmacêuticos adequados para administração dos anticorpos proporcionados aqui incluem quaisquer tais veículos conhecidos dos peritos na técnica como sendo adequados para o modo de administração particular. Os veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis não são tóxicos para os receptores às dosagens e concentrações empregues e incluem tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; e/ou tensoativos não iônicos tais como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietilenoglicol (PEG).

[00166] As formulações a serem usadas para administração *in vivo* podem ser estéreis. Isto pode ser prontamente alcançado, por exemplo, por filtração através, p.ex., membranas de esterilização por filtração.

[00167] Em aspectos específicos, as composições farmacêuticas para uso nos métodos proporcionados aqui contêm quantidades terapêuticamente eficazes de um ou mais das proteínas terapêuticas proporcionados aqui em um veículo farmacêuticamente aceitável. Em aspectos específicos, as composições farmacêuticas para uso nos métodos proporcionados aqui contêm quantidades terapêuticamente eficazes de um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, sozinho ou em combinação com um ou mais das proteínas terapêuticas proporcionados aqui, em um veículo farmacêuticamente aceitável. Em aspectos específicos, as composições farmacêuticas para uso nos métodos proporcionados aqui contêm quantidades terapêuticamente eficazes de um ou mais dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno proporcionados aqui em um veículo farmacêuticamente aceitável. Tais composições farmacêuticas são úteis na prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma condição ou disfunção descrita aqui ou um ou mais seus sintomas.

[00168] As composições para uso nos métodos proporcionados aqui podem conter um ou mais terapêuticos de proteína proporcionados aqui. As composições para uso nos métodos proporcionados aqui podem conter

rituximab, sozinho ou em combinação com um ou mais terapêuticos de proteína proporcionados aqui. As composições para uso nos métodos proporcionados aqui podem conter um ou mais anticorpos proporcionados aqui ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em uma modalidade são proporcionadas composições em que os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno descritos aqui são formulados em preparações farmacêuticas adequadas, tais como soluções, suspensões, pós, formulações de liberação sustentada ou elixires em soluções ou suspensões estéreis para administração parenteral ou como preparação de adesivos transdérmicos e inaladores de pó seco.

[00169] Em uma modalidade, as composições para uso nos métodos proporcionados aqui são formuladas para administração de dosagem única. Para formular uma composição, a fração em peso do composto é dissolvida, suspensa, dispersa ou de outra forma misturada em um veículo selecionado a uma concentração eficaz tal que a condição tratada seja aliviada, prevenida ou um ou mais sintomas sejam melhorados.

[00170] Em certos aspectos, um anticorpo anti-CD20, p.ex., rituximab, é incluído no veículo farmaceuticamente aceitável em uma quantidade eficaz suficiente para exercer um efeito terapêuticamente útil na ausência de efeitos secundários indesejáveis, ou com efeitos secundários indesejáveis mínimos ou negligenciáveis, no paciente tratado.

[00171] Em certos aspectos, terapêuticos de proteína para uso nos métodos proporcionados aqui são incluídos no veículo farmaceuticamente aceitável em uma quantidade eficaz suficiente para exercer um efeito terapêuticamente útil na ausência de efeitos secundários indesejáveis, ou com efeitos secundários indesejáveis mínimos ou negligenciáveis, no paciente tratado.

[00172] Em certos aspectos, anticorpos para uso nos métodos proporcionados aqui são incluídos no veículo farmacêuticamente aceitável em uma quantidade eficaz suficiente para exercer um efeito terapêuticamente útil na ausência de efeitos secundários indesejáveis, ou com efeitos secundários indesejáveis mínimos ou negligenciáveis, no paciente tratado.

[00173] As concentrações de uma proteína terapêutica, por exemplo, um anticorpo anti-CD47, em uma composição farmacêutica para uso nos métodos proporcionados aqui dependerão, p.ex., das características físico-químicas do anticorpo, do programa de dosagem e da quantidade administrada bem como outros fatores.

[00174] As composições farmacêuticas para uso nos métodos descritos aqui são proporcionadas para administração a humanos ou animais (p.ex., mamíferos) em formas de dosagem unitárias, tais como soluções ou suspensões parenterais (p.ex., intravenosas) estéreis contendo quantidades adequadas dos compostos ou seus derivados farmacêuticamente aceitáveis. As composições farmacêuticas são também proporcionadas para administração a humanos e animais em forma de dosagem unitária, tal como comprimidos, cápsulas, pílulas, pós, grânulos e soluções ou suspensões orais ou nasais e emulsões óleo-água contendo quantidades adequadas de uma proteína terapêutica ou seus derivados farmacêuticamente aceitáveis. A proteína terapêutica é, em uma modalidade, formulada e administrada em formas de dosagem unitária ou formas de dosagem múltipla. Formas de dose unitária como usado aqui se referem a unidades fisicamente discretas adequadas para indivíduos humanos ou animais (p.ex., mamífero) e empacotadas individualmente. Cada dose unitária contém uma quantidade predeterminada de uma proteína terapêutica suficiente para produzir o efeito terapêutico desejado, em associação ao veículo, veículo ou diluente farmacêutico requerido. Exemplos de formas de dose

unitária incluem ampolas e seringas e comprimidos ou cápsulas individualmente empacotadas. As formas de dose unitária podem ser administradas em frações ou seus múltiplos. Uma forma de dose múltipla é uma pluralidade de formas de dose unitária idênticas empacotadas em um recipiente único a ser administrada em forma de dose unitária segregada. Exemplos de formas de dose múltipla incluem frascos, garrafas de comprimidos ou cápsulas ou garrafas. Consequentemente, em aspectos específicos, a forma de dose múltipla é um múltiplo de doses unitárias que não são segregadas no empacotamento.

[00175] Em certas modalidades, um ou mais terapêuticos de proteína para uso nos métodos descritos aqui estão em uma formulação farmacêutica líquida. As composições farmacêuticamente administráveis líquidas podem, por exemplo, ser preparadas por dissolução, dispersão ou de outro modo mistura de um anticorpo e adjuvantes farmacêuticos opcionais em um veículo, tal como, por exemplo, água, solução salina, dextrose aquosa, glicerol, glicóis e similares, para formar deste modo uma solução ou suspensão. Em certas modalidades, uma composição farmacêutica proporcionada aqui a ser administrada pode também conter quantidades mínimas de substâncias auxiliares não tóxicas tais como agentes molhantes, agentes emulsificantes, agentes solubilizantes e agentes tamponantes de pH e similares.

[00176] Métodos de preparação de tais formas de dosagem são conhecidos dos, ou serão aparentes aos, peritos em esta técnica; por exemplo, *ver*, p.ex., Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21^a ed. (2006) Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

[00177] A administração parenteral, em uma modalidade, é caracterizada por injeção, subcutaneamente, intramuscularmente ou intravenosamente, é também contemplada aqui. Os injetáveis podem ser preparados em formas

convencionais, como soluções ou suspensões líquidas, formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da injeção ou como emulsões. Os injetáveis, soluções e emulsões contêm também um ou mais excipientes. Excipientes adequados são, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol ou etanol. Outras vias de administração podem incluir administração enteral, administração intracerebral, administração nasal, administração intra-arterial, administração intracardíaca, infusão intraóssea, administração intratecal e administração intraperitoneal.

[00178] As preparações para administração parenteral incluem soluções estéreis prontas para injeção, produtos solúveis secos estéreis, tais como pós liofilizados, prontos para serem combinados com um solvente imediatamente antes do uso, incluindo comprimidos hipodérmicos, suspensões estéreis prontas para injeção, produtos insolúveis secos estéreis prontos para serem combinados com um veículo imediatamente antes do uso e emulsões estéreis. As soluções podem ser aquosas ou não aquosas.

[00179] Se administrados intravenosamente, veículos adequados incluem solução salina fisiológica ou solução salina tamponada com fosfato (PBS) e soluções contendo agentes espessantes e solubilizantes, tais como glucose, polietilenoglicol e polipropilenoglicol e suas misturas.

[00180] Os veículos farmacêuticamente aceitáveis usados em preparações parenterais incluem veículos aquosos, veículos não aquosos, agentes antimicrobianos, agentes isotônicos, tampões, antioxidantes, anestésicos locais, agentes de suspensão e dispersão, agentes emulsificantes, agentes sequestrantes ou quelantes e outras substâncias farmacêuticamente aceitáveis.

[00181] Os veículos farmacêuticos também incluem álcool de etila, polietilenoglicol e propilenoglicol para veículos miscíveis em água; e hidróxido de sódio, ácido clorídrico, ácido cítrico ou ácido láctico para ajuste do pH.

[00182] Em certas modalidades, a infusão intravenosa ou intra-arterial de uma solução aquosa estéril contendo uma proteína terapêutica para uso nos métodos descritos aqui é um modo de administração eficaz. Outra modalidade é uma solução ou suspensão aquosa ou oleosa estéril contendo uma proteína terapêutica para uso nos métodos descritos aqui injetada como necessário para produzir o efeito farmacológico desejado.

[00183] Em modalidades específicas, uma proteína terapêutica para uso nos métodos descritos aqui pode estar suspensa em forma micronizada ou outra adequada. A forma da mistura resultante depende de um número de fatores, incluindo o modo de administração pretendido e a solubilidade do composto no veículo ou veículo selecionado.

[00184] Em outras modalidades, as formulações farmacêuticas são pós liofilizados, que podem ser reconstituídos para administração como soluções, emulsões e outras misturas. Podem ser também reconstituídas e formuladas como sólidos ou géis.

[00185] O pó liofilizado pode, por exemplo, ser preparado por dissolução de uma proteína terapêutica para uso nos métodos proporcionados aqui, em um solvente adequado. Em algumas modalidades, o pó liofilizado é estéril. Os solventes adequados podem conter um excipiente que melhora a estabilidade ou outro componente farmacológico do pó ou solução reconstituída, preparado a partir do pó. Excipientes que podem ser usados incluem, mas não estão limitados a, dextrose, sorbitol, frutose, xarope de milho, xilitol, glicerina, glucose, sacarose ou outro agente adequado. Um solvente adequado pode também conter um tampão, tal como citrato, fosfato de sódio ou potássio ou outro tal tampão conhecido dos peritos na técnica, em uma modalidade, a cerca de pH neutro. A esterilização por filtração subsequente da solução seguida por liofilização sob condições padrão conhecidas dos peritos na técnica proporciona

um exemplo de uma formulação. Em uma modalidade, a solução resultante será repartida em frascos para liofilização. O pó liofilizado pode ser armazenado sob condições apropriadas, tal como a de cerca de 4 °C até à temperatura ambiente.

[00186] A reconstituição deste pó liofilizado com água para injeção proporciona uma formulação para uso em administração parenteral. Para reconstituição, o pó liofilizado é adicionado a água estéril ou outro veículo adequado.

[00187] Em certos aspectos, uma proteína terapêutica para uso nos métodos proporcionados aqui pode ser formulada para administração local ou aplicação tópica, tal como para aplicação tópica na pele e membranas mucosas, tal como no olho, na forma de géis, cremes, e loções e para aplicação no olho ou para aplicação intracisternal ou intraespinhal. A administração tópica é contemplada para administração transdérmica e também para administração aos olhos ou mucosa ou para terapias de inalação. Soluções nasais do composto ativo sozinho ou em combinação com outros excipientes farmacologicamente aceitáveis podem ser também administradas.

[00188] Os anticorpos anti-CD47, anticorpos anti-CD20, p.ex., rituximab, e outras proteínas terapêuticas para uso nos métodos proporcionados aqui podem ser também formulados para serem visados a um tecido, órgão ou outra área específica do corpo do indivíduo a ser tratado. Muitos tais métodos de direcionamento são bem conhecidos dos peritos na técnica. Todos tais métodos de direcionamento são contemplados aqui para uso nas presentes composições. Para exemplos não limitantes de métodos de direcionamento ver, p.ex., Patentes dos E.U.A. Nos. 6,316,652, 6,274,552, 6,271,359, 6,253,872, 6,139,865, 6,131,570, 6,120,751, 6,071,495, 6,060,082, 6,048,736, 6,039,975, 6,004,534, 5,985,307, 5,972,366, 5,900,252, 5,840,674, 5,759,542 e 5,709,874. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-CD47 descritos aqui são visados (ou de outra

forma administrados) aos órgãos visuais, medula óssea, trato gastrointestinal, pulmões, cérebro ou articulações. Em modalidades específicas, um anticorpo anti-CD47 descrito aqui é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica.

EXEMPLOS

[00189] Os exemplos em esta seção (*i.e.*, Seção 5) são oferecidos a título de ilustração e não a título de limitação.

Exemplo 1: Codosagem de Rituximab e um Anticorpo Anti-CD47 em Macacos-Cinomólgos

[00190] O objetivo do estudo foi monitorizar quanto à imunogenicidade a um anticorpo anti-CD47 humanizado compreendendo as CDRs de região variável de cadeia pesada de SEQ ID Nos: 50, 72 e 52 e as CDRs de região variável de cadeia leve de SEQ ID NOs.: 53, 71 e 55 (doravante, “o Anticorpo Anti-CD47”) quando codoseado com rituximab ou rituximab e metotrexato e avaliar seu impacto na farmacocinética após administração intravenosa em macacos-cinomólgos.

[00191] Na Parte Um deste estudo, o Anticorpo Anti-CD47 foi administrado como quatro injeções intravenosas (IV) a 3 grupos de macacos-cinomólgos (5 animais/grupo, 15 animais totais) nos Dias de Estudo 1, 8, 15 e 22 ao Grupo 1 e Dias de Estudo 15, 22, 29 e 36 aos Grupos 2 e 3, a doses de 20 mg/kg (Doses 1 até 4). O rituximab foi administrado como quatro injeções intravenosas aos animais dos Grupos 2 e 3, nos Dias de Estudo 1, 8, 15 e 22 a doses de 10 mg/kg. O metotrexato foi administrado como três injeções subcutâneas aos animais do Grupo 3, nos Dias de Estudo 15, 16 e 18 a doses de 0,4 mg/kg.

[00192] Na parte dois deste estudo, o Anticorpo Anti-CD47 foi administrado como uma injeção intravenosa única aos animais do Grupo 1 e Grupo 3 no Dia do Estudo 78 a uma dose de 20 mg/kg (Dose 5). O metotrexato foi administrado como múltiplas injeções subcutâneas aos animais do Grupo 3,

nos Dias de Estudo 71, 72, 74, 78, 79, 81, 88, 95, 102 e 109 a uma dose de 0,4 mg/kg.

[00193] Os dados de concentração após a primeira, quarta e quinta doses do Anticorpo Anti-CD47 em macacos-cinómólgos foram usados para avaliações farmacocinéticas (PK), para entender o efeito de fármacos codoseados na PK do Anticorpo Anti-CD47. A imunogenicidade do Anticorpo Anti-CD47 foi avaliada por teste quanto aos títulos de anticorpos antifármaco (ADA) no soro (com o “fármaco” sendo o Anticorpo Anti-CD47), semanalmente ao longo do estudo. As contagens de células B foram seguidas semanalmente, ao longo do decurso do estudo.

[00194] Todos os animais doseados com o Anticorpo Anti-CD47 sozinho (Grupo 1) devolveram ADA positivos antes da Dose 4. A curva de concentração-tempo na área sob a curva do Anticorpo Anti-CD47 do tempo zero às 168 h (AUC_{0-168}) pós-Dose 4, uma medida da concentração no soro do Anticorpo Anti-CD47, para os cinco animais do Grupo 1 foi 3-37% da AUC_{0-168} pós-Dose 1.

[00195] Esta diminuição na AUC pós-seroconversão foi atribuída à diminuição mediada por ADA na exposição a Anticorpo Anti-CD47 livre. Os números de células B CD20⁺ em estes animais estavam dentro da gama normal. Os números de células B CD20⁺ periféricas para todos os animais que receberam rituximab (Grupos 2 e 3) diminuíram rapidamente e foram < 100 células/ μ L no espaço de 24 horas da receção da primeira dose de rituximab. Os números de células B começou a recuperar em torno do Dia 15 pós-primeira dose de rituximab em 8 de 10 animais nos Grupos 2 e 3. Esta recuperação de células B é atribuível a anticorpos antirituximab, pois todos os animais tinham anticorpos antirituximab detectáveis pelo Dia 15, com diminuições correspondentes nas concentrações no soro de rituximab. Os 8 animais que mostraram recuperação nos números de células B ficaram positivos quanto à presença de anticorpos

antifármaco (ADA) pelo Dia 36, com títulos variáveis entre 5 e 625 e níveis variáveis de diminuições na exposição em todos os 8 animais variando de 2-53% da AUC₀₋₁₆₈ pós-Dose 1.

[00196] Nos animais 11 e 15, onde foram mantidas concentrações significativas de rituximab, as contagens de células B CD20⁺ B periféricas permaneceram negligenciáveis até ao Dia 36, quando a quarta dose do Anticorpo Anti-CD47 foi administrada a estes animais. Estes dois animais, que receberam todas as 4 doses do Anticorpo Anti-CD47 no contexto do esgotamento eficaz de células B, permaneceram negativos quanto a ADA durante período prolongado, até o Dia 71 e ao final do estudo, respectivamente. As concentrações de anticorpo anti-CD47 pós-dose 4 foram similares às concentrações observadas pós-dose 1, com a AUC₀₋₁₆₈ da Semana 4 sendo 115% e 83% das AUCs médias da semana 1 nos animais 11 e 15, respectivamente.

[00197] Os macacos tratados somente com o Anticorpo Anti-CD47 (Grupo 1) ou a combinação dos três agentes (Grupo 3) foram subsequentemente redesafiados com o Anticorpo Anti-CD47 às 12 semanas (Dia 78). Nos dois animais 11 e 15, onde o desenvolvimento de ADA foi mitigado com esgotamento eficaz de células B, os perfis PK à semana 12 foram comparáveis com perfis PK pós-Dose 1 do Anticorpo Anti-CD47, e a AUC₀₋₁₆₈ à semana 12 foi 127% e 120% da AUC₀₋₁₆₈ média pós-primeira dose, confirmando assim que não existiu perda mediada por ADA na exposição em estes animais. Adicionalmente, os níveis de anticorpos antifármaco no soro foram sustentados a baixos níveis em estes dois animais, com fármaco detectável estando presente durante três semanas pós-última dose.

[00198] As concentrações de Anticorpo Anti-CD47 nos animais positivos quanto a ADA estavam abaixo do limite de quantificação para além dos 4 dias pós-última dose. Estes dados indicam que o esgotamento de células B com

rituximab reduz a resposta imunitária ao Anticorpo Anti-CD47 e aumenta a exposição ao fármaco ao longo de períodos de tempo sustentados. Adicionalmente, não foi observada toxicidade nos macacos tratados com o Anticorpo Anti-CD47 mais rituximab ou o Anticorpo Anti-CD47 mais rituximab mais metotrexato.

Exemplo 2: Estudo Clínico de um Anticorpo Anti-CD47 em Combinação com Rituximab

[00199] É descrito aqui um estudo de escalonamento e expansão da dose de Fase 1, aberto do Anticorpo Anti-CD47 administrado por infusão intravenosa (IV), em indivíduos com cânceres sólidos e hematológicos refratários, avançados. O estudo é compreendido por 2 partes. A Parte A é uma fase de escalonamento da dose que utiliza doses crescentes do Anticorpo Anti-CD47, e a Parte B é uma fase de escalonamento e expansão da dose na qual o Anticorpo Anti-CD47 em combinação com rituximab é administrado em indivíduos com linfoma não-Hodgkin (NHL) positivo quanto a CD20. A expansão pode ocorrer à dose máxima tolerada (MTD) estabelecida na fase de escalonamento da dose e/ou a uma dose mais baixa, ou um programa de dosagem tolerável alternativo, com base na revisão dos dados de segurança, PK e farmacodinâmica da Parte A. Um desenho de escalonamento da dose 3 + 3 modificado é usado para identificar a toxicidade inicial do Anticorpo Anti-CD47. As coortes de 3 a 6 indivíduos avaliáveis são tratadas com o Anticorpo Anti-CD47 em programas de dosagem definidos e, no caso de toxicidade limitante da dose (DLT) em um indivíduo, as coortes são expandidas para a coorte total de 6 indivíduos avaliáveis. Em uma dada coorte de doses, os indivíduos número 4 a 6 podem ser inscritos antes de os 3 primeiros indivíduos completarem o Ciclo 1 para se obter informação adicional de segurança e para assegurar número suficiente de pacientes avaliáveis para avaliação da DLT. Não mais do que um indivíduo por dia é atribuído em uma dada

coorte de escalonamento da dose.

[00200] As doses incluem 0,3 mg/kg IV uma vez semanalmente (QW) e 1, 2, 4, 8, 15 e 20 mg/kg IV uma vez a cada 2 semanas (Q2W). Durante o escalonamento da dose, a decisão de se avaliar uma coorte de dose mais baixa, coortes de doses intermediárias, um intervalo de dosagem alternado ou declarar uma MTD é determinada, com base na revisão dos dados de segurança clínica e laboratorial para coortes de doses prévias. Todos os tratamentos são administrados em ciclos de 28 dias, com o Anticorpo Anti-CD47 administrado no D1 e D15. Após a primeira dose ser administrada em qualquer coorte, os indivíduos são observados durante pelo menos 28 dias (Ciclo 1, janela de DLT) antes de a próxima coorte de dose especificada pelo protocolo, mais elevada puder começar.

[00201] A dose de partida para a Coorte 1 é 0,3 mg/kg no Dia 1 do Ciclo 1 seguida por 1 mg/kg QW subsequentemente.

[00202] Para a Parte B, em indivíduos com linfoma não-Hodgkin positiva quanto a CD20 recidivante ou refratário que receberam rituximab prévio, a dosagem de rituximab a 375 mg/m² uma vez por semana começa duas semanas antes da administração do Anticorpo Anti-CD47. A dosagem de rituximab é em quatro doses semanais antes do e durante o Ciclo 1 (D-15, D-8, D-1, D8), uma vez a cada ciclo para os Ciclos 2-6 (no D8) e, se respondedora, a cada dois meses subsequentemente durante até 12 ciclos (Ciclos 8, 10 e 12). As contagens de células B em série e PK são avaliadas. Adicionalmente, as avaliações de PK, PD e ADA são realizadas como o são para a parte A.

Critérios de Inclusão:

[00203] 1. Homens e mulheres, 18 anos de idade ou mais velhos, com tumores sólidos recidivantes ou refratários, avançados, Mieloma Múltiplo (MM) ou linfoma não-Hodgkin (NHL) na Parte A.

[00204] Na Parte B, somente indivíduos com NHL positivo quanto a CD20 recidivante ou refratário.

[00205] 2. Pelo menos um local de doença mensurável em indivíduos com tumores sólidos e NHL.

[00206] 3. Estado de Desempenho do Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG PS) de 0 ou 1.

[00207] 4. Os indivíduos têm de ter função hematopoiética, do fígado, renal e de coagulação adequada como avaliado por critérios laboratoriais específicos.

[00208] 5. As mulheres e os homens têm de concordar com métodos contraceptivos e evitar a concepção ao longo do estudo e durante até 8 semanas após a última dose do Anticorpo Anti-CD47. Se participando na Parte B, as mulheres em idade fértil devem continuar a usar métodos contraceptivos eficazes durante 12 meses após o tratamento com rituximab

Critérios de Exclusão:

[00209] 1. Linfomas de grau elevado (Burkitt ou linfoblástico), leucemia de células plasmáticas.

[00210] 2. Tumores sólidos de rápida proliferação, de grau elevado (p.ex., câncer do pulmão de células pequenas, tumores das células germinativas, neuroblastoma) com carga tumoral extensiva.

[00211] 3. Envolvimento de sistema nervoso central sintomático.

[00212] 4. Função cardíaca deficiente ou doença cardíaca clinicamente significativa.

[00213] 5. Transfusão Prévia de glóbulos vermelhos (RBC) < 3 meses antes do início do Anticorpo Anti-CD47.

[00214] 6. Transplante autólogo prévio de células-tronco \leq 3 meses antes do início do Anticorpo Anti-CD47.

[00215] 7. Transplante alogeneico prévio de células-tronco com

condicionamento da intensidade padrão ou reduzido ≤ 6 meses antes do início do Anticorpo Anti-CD47.

[00216] 8. Tratamentos sistêmicos dirigidos ao câncer prévios ou modalidades investigativas ≤ 5 meias-vidas ou 4 semanas antes do início do Anticorpo Anti-CD47, o que for mais curto.

[00217] 9. Grande cirurgia ≤ 2 semanas antes do início do Anticorpo Anti-CD47.

[00218] 10. Mulheres grávidas ou amamentando.

[00219] 11. Infecção de HIV conhecida.

[00220] 12. Infecção crônica de hepatite B e C (HBV/HCV) conhecida.

[00221] 13. Tratamento continuado com dosagem terapêutica, crônica de anticoagulantes.

[00222] 14. Historial de anemia hemolítica autoimune ou trombocitopenia autoimune.

[00223] 15. Historial de segundos cânceres simultâneos requerendo tratamento sistêmico continuado, ativo.

[00224] Todas as referências (p.ex., publicações ou patentes ou pedidos de patentes) citadas aqui são incorporadas aqui por referência na sua totalidade e para todos os propósitos na mesma extensão como se cada referência individual (p.ex., publicação ou pedido de patente ou patente) fosse especificamente e individualmente indicada como estando incorporada por referência na sua totalidade para todos os propósitos.

[00225] Outras modalidades estão dentro das seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Um método de redução da imunogenicidade em um indivíduo, compreendendo administração a um indivíduo de rituximab em combinação com uma proteína terapêutica, em que a imunogenicidade é reduzida em comparação com a imunogenicidade no indivíduo quando se administra a proteína terapêutica sozinha.

2. O método da reivindicação 1, em que a proteína terapêutica é um anticorpo terapêutico.

3. O método reivindicação 1, em que a proteína terapêutica é uma citocina.

4. O método, da reivindicação 1, em que a proteína terapêutica é uma interleucina.

5. O método da reivindicação 1, em que a proteína terapêutica não é uma enzima.

6. O método da reivindicação 2, em que o anticorpo terapêutico é um anticorpo que se liga à CD47 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

7. O método da reivindicação 6, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreende uma região determinante de complementaridade (CDR) 1 de cadeia pesada variável (VH) compreendendo SEQ ID NO: 50, uma CDR2 de VH compreendendo SEQ ID NO: 72, uma sequência de CDR3 de VH compreendendo SEQ ID NO: 52, uma CDR1 de cadeia leve variável (VL) compreendendo SEQ ID NO: 53, uma CDR2 de VL compreendendo SEQ ID NO: 71 e uma CDR3 de VL compreendendo SEQ ID NO: 55.

8. O método da reivindicação 6, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação do mesmo ao antígeno compreende uma VH compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 5-30.

9. O método da reivindicação 6, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou

fragmento de ligação do mesmo ao antígeno compreende uma VL compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 31-47.

10. O método da reivindicação 6, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação do mesmo ao antígeno compreende uma VH compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 5-30 e uma VL compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 31-47.

11. O método da reivindicação 6, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação do mesmo ao antígeno compreende uma CDR1 de VH compreendendo SEQ ID NO: 50, uma CDR2 de VH compreendendo SEQ ID NO: 51, uma CDR3 de VH compreendendo SEQ ID NO: 52, uma CDR1 de VL compreendendo SEQ ID NO: 53, uma CDR2 de VL compreendendo SEQ ID NO: 54 e uma CDR3 de VL compreendendo SEQ ID NO: 55.

12. O método da reivindicação 6, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação do mesmo ao antígeno é um isotipo de IgG selecionado do grupo consistindo em isotipo IgG1, isotipo IgG2, isotipo IgG3 e isotipo IgG4.

13. O método da reivindicação 6, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação do mesmo ao antígeno é um isotipo de IgG selecionado de IgG4P e IgG4PE.

14. O método da reivindicação 6, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação do mesmo ao antígeno é um componente de uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo que se liga à CD47 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e um veículo farmaceuticamente aceitável.

15. O método de qualquer uma das reivindicações 6, a 14, em que o anticorpo é quimérico, humanizado ou totalmente humano.

16. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 15, em que o indivíduo é um humano.

17. O método, de qualquer uma das reivindicações 1 a 15, compreendendo adicionalmente administração de quimioterapia.

18. O método da reivindicação 17, em que a referida quimioterapia é radioterapia.

19. O método de qualquer uma das reivindicações 7 a 17, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação do mesmo ao antígeno é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,3, 1, 2, 4, 8, 15, ou 20 mg/kg.

20. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 19, em que o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450 ou 500 mg/m².

21. O método de qualquer uma das reivindicações 7 a 20, em que o rituximab é administrado antes do anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação do mesmo ao antígeno.

22. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 21, em que o método não compreende administração de um inibidor do proteossomo ao indivíduo.

23. O método da reivindicação 22, em que o método não compreende administração de bortezomibe ao indivíduo.

24. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 23, em que o método não compreende administração de metotrexato ao indivíduo.

25. Um método de tratamento de câncer, o método compreendendo administração a um indivíduo com sua necessidade de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo que se liga à CD47 ou um fragmento de ligação do mesmo ao antígeno, em que o método compreende adicionalmente administração de rituximab ao indivíduo.

26. O método da reivindicação 25, em que o rituximab é administrado antes

do anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação do mesmo ao antígeno.

27. O método da reivindicação 25 ou 26, compreendendo adicionalmente administração de radiação ou quimioterapia.

28. O método de qualquer uma das reivindicações 25 a 27, compreendendo adicionalmente administração de outro agente anticanceroso.

29. O método de qualquer uma das reivindicações 25 a 28, em que o câncer é um câncer hematológico.

30. O método de qualquer uma das reivindicações 25 a 28, em que o câncer é um câncer sólido.

31. O método de qualquer uma das reivindicações 25 a 28, em que o câncer é mieloma múltiplo, linfoma não-Hodgkin, leucemia mieloide aguda (AML), câncer da mama, câncer da bexiga, câncer/carcinoma do pulmão de células não pequenas, carcinoma hepatocelular (HCC), sarcoma, ou câncer da cabeça e pescoço.

32. O método da reivindicação 31, em que o câncer é linfoma não-Hodgkin.

33. O método da reivindicação 32, em que o linfoma não-Hodgkin é positivo quanto a CD20.

34. O método da reivindicação 31 ou 32, em que o linfoma não-Hodgkin é recidivante ou refratário.

35. O método de qualquer uma das reivindicações 25 a 34, em que o indivíduo foi previamente tratado com rituximab.

36. O método de qualquer uma das reivindicações 25 a 35, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação do mesmo ao antígeno é administrado ao indivíduo a uma dose de 0,3, 1, 2, 4, 8, 15, ou 20 mg/kg.

37. O método de qualquer uma das reivindicações 25 a 36, em que o rituximab é administrado ao indivíduo a uma dose de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450 ou 500 mg/m².

38. O método, de qualquer uma das reivindicações 25 a 37, em que o método não compreende administração de um inibidor do proteossomo ao indivíduo.

39. O método da reivindicação 38, em que o método não compreende administração de bortezomibe ao indivíduo.

40. O método de qualquer uma das reivindicações 25 a 39, em que o método não compreende administração de metotrexato ao indivíduo.

41. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 40, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação do mesmo ao antígeno compreende uma CDR1 de VH compreendendo SEQ ID NO: 50, uma CDR2 de VH compreendendo SEQ ID NO: 72, uma sequência de CDR3 de VH compreendendo SEQ ID NO: 52, uma CDR1 de cadeia leve variável (VL) compreendendo SEQ ID NO: 53, uma CDR2 de VL compreendendo SEQ ID NO: 71 e uma CDR3 de VL compreendendo SEQ ID NO: 55.

42. O método de qualquer uma das reivindicações 25 a 40, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação do mesmo ao antígeno compreende uma VH compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 5-30.

43. O método de qualquer uma das reivindicações 25 a 40, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação do mesmo ao antígeno compreende uma VL compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 31-47.

44. O método de qualquer uma das reivindicações 25 a 40, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreende uma VH compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 5-30 e uma VL compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 31-47.

45. O método de qualquer uma das reivindicações 25 a 40, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreende uma CDR1 de VH compreendendo SEQ ID NO: 50, uma CDR2 de VH compreendendo SEQ ID NO: 51, uma CDR3 de VH compreendendo SEQ ID NO: 52, uma CDR1 de VL compreendendo SEQ ID NO: 53, uma CDR2 de VL compreendendo SEQ ID NO: 54 e uma CDR3 de VL compreendendo SEQ ID NO: 55.

46. O método de qualquer uma das reivindicações 25 a 45, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou fragmento de ligação do mesmo ao antígeno é um isotipo de IgG selecionado do grupo consistindo em isotipo IgG1, isotipo IgG2, isotipo IgG3 e isotipo IgG4.

47. O método de qualquer uma das reivindicações 25 a 45, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou seu fragmento de ligação ao antígeno é um isotipo de IgG selecionado de IgG4P e IgG4PE.

48. O método de qualquer uma das reivindicações 25 a 47, em que o anticorpo que se liga à CD47 ou seu fragmento de ligação ao antígeno é um componente de uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo que se liga à CD47 ou um seu fragmento de ligação ao antígeno e um veículo farmaceuticamente aceitável.

49. O método de qualquer uma das reivindicações 25 a 48, em que o anticorpo é quimérico, humanizado ou totalmente humano.

50. O método de qualquer uma das reivindicações 25 a 49, em que o indivíduo é um humano.

RESUMO

MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA REDUÇÃO DA IMUNOGENICIDADE

São fornecidos na presente invenção métodos e usos envolvendo a combinação de um anticorpo anti-CD20, por exemplo, rituximab com uma proteína terapêutica, por exemplo, um anticorpo (por exemplo, um anticorpo que se liga especificamente à CD47 humana).

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LPB02277_Sequence listing_(LS)_20190925.txt
- Data de Geração do Código: 26/09/2019
- Hora de Geração do Código: 16:18:25
- Código de Controle:
 - Campo 1: E0C4E40040AB2293
 - Campo 2: 57C0C00DFDAFAA07