

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 036963

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.01.20

(21) Номер заявки
201500818

(22) Дата подачи заявки
2013.08.06

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ЭПИТОПА CD47 ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛА К CD47

(31) 13/761,087; PCT/US2013/024995;
61/815,219

(32) 2013.02.06; 2013.02.06; 2013.04.23

(33) US

(43) 2016.02.29

(86) PCT/US2013/053818

(87) WO 2014/123580 2014.08.14

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

(72) Изобретатель:
Экелмэн Брендэн, Тиммер Джон,
Разай Амир, Деверо Куинн, Джонс
Кайл, Лаппе Марк (US)

(74) Представитель:
Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)

(56) US-A1-20120156724
MAJETI et al. "CD47 is an adverse prognostic
factor and therapeutic antibody target on human acute
myeloid leukemia stem cells", Cell. 138(2), pages
286-299, 23 July 2009, entire document

US-B2-7282556

US-A1-20090148905

SUBRAMANIAN et al. "Phylogenetic
divergence in human SIRPα-CD47 interactions reveals
locus of species-specificity: Implications for the
binding site", Journal of Biological Chemistry, 10
November 2006, pgs. 1-25, entire document

WO-A2-2004014292

WO-A1-2010017598

US-A1-20130224188

(57) Изобретение направлено на применение эпитопа CD47, содержащего петлю KGRD (SEQ ID NO: 56) (аминокислотные остатки 43-46) и аминокислотные остатки Y37, T102 и E104 CD47, пронумерованные в соответствии с SEQ ID NO: 147, для получения антитела к CD47, имеющего сниженную аффинность связывания с FcγR по сравнению с IgG1 дикого типа.

B1

036963

036963

B1

Родственные заявки

Данная заявка является частичным продолжением заявки США № 13/761087, поданной 6 февраля 2013 года, и частичным продолжением заявки РСТ № РСТ/US2013/024995, поданной 6 февраля 2013 года, обе из которых испрашивают преимущество и приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 61/595216, поданной 6 февраля 2012 года, и предварительной заявки на патент США № 61/659752, поданной 14 июня 2012 года. Данная заявка также испрашивает преимущество и приоритет на основании предварительной заявки США № 61/815219, поданной 23 апреля 2013 года. Полное содержание каждой из этих заявок включено в настоящий документ путем отсылки.

Область техники, к которой относится изобретение

В целом, изобретение относится к моноклональным антителам, которые распознают CD47, в частности антителам к CD47, которые не вызывают значительного уровня гемагглютинации красных кровяных телец человека, истощения красных кровяных телец, анемии и/или истощения тромбоцитов, способам создания этих антител, а также способам применения этих моноклональных антител в качестве терапевтических средств.

Сведения о предшествующем уровне техники

CD47, также известный как интегрин-ассоциированный белок (IAP), антиген ОА3 рака яичников, Rh-ассоциированный антиген и MER6, представляет собой трансмембранный рецептор, несколько раз пронизывающий мембрану, и принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов. Экспрессия и/или активность CD47 наблюдаются в ряде заболеваний и нарушений. Таким образом, существует потребность в терапиях, которые направлены воздействовать на CD47. Кроме того, по причине экспрессии CD47 на тромбоцитах, также существует потребность в терапиях, направленных воздействующих на CD47 (например, антител), которые не вызывают значительных уровней истощения тромбоцитов, гемагглютинации, истощения красных кровяных телец и/или анемии при введении субъекту.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предлагаются моноклональные антитела, которые распознают и связываются с CD47, в частности CD47 человека. Антитела согласно изобретению способны модулировать, например блокировать, ингибировать, уменьшать, вызывать антагонизм, нейтрализовать или иным образом препятствовать экспрессии, активности и/или передаче сигнала CD47, и эти антитела не вызывают значительного уровня гемагглютинации красных кровяных телец человека, также называемых здесь как эритроциты. Однако способность антител согласно настоящему изобретению связываться с CD47 на клеточной поверхности и не вызывать феномен склеивания клеток не ограничивается красными кровяными тельцами. Антитела согласно настоящему изобретению уникальным образом связываются с CD47, не вызывая агрегации CD47-положительных клеток. Дополнительно или альтернативно, антитела согласно настоящему изобретению не вызывают значительного истощения тромбоцитов при введении. Антитела согласно изобретению и их производные способны модулировать, например блокировать, ингибировать, уменьшать, вызывать антагонизм, нейтрализовать или иным образом препятствовать взаимодействию между CD47 и SIRP α (сигнальным регуляторным альфа-белком), а также не вызывать значительного уровня гемагглютинации красных кровяных телец человека. Антитела, обеспеченные здесь, совместно называются как "антитела к CD47". Антитела к CD47 согласно изобретению имеют значительное преимущество перед существующими в данной области антителами к CD47, которые вызывают гемагглютинацию красных кровяных телец человека (см., например, Kikuchi Y., Uno S., Yoshimura Y. et al. A bivalent single-chain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 315: 912-8). Например, антитела к CD47 согласно изобретению имеют значительное преимущество перед существующими в данной области антителами B6H12, BRC126 и CC2C6 к CD47, каждое из которых блокирует SIRP α , но вызывает гемагглютинацию RBC, как описано подробно ниже. Например, антитела к CD47 согласно изобретению имеют значительное преимущество перед высокоаффинным белком слияния SIRP α -Fc, который при введении мышам и/или макакам-крабоедам вызывает потерю эритроцитов или анемию (см. Weiskopf et al. Engineered SIRP α Variants as Immunotherapeutic Adjuvants to Anticancer Antibodies. *Science* 2013; 341:88). Полноразмерные антитела IgG к CD47 согласно настоящему изобретению (например, 2A1 и его гуманизированные производные, включая представленные в табл. 1) не агглютинируют клетки на значительном уровне. Например, антитела к CD47 согласно изобретению не гемагглютинируют красные кровяные тельца (RBC). В настоящем документе описаны антитела к CD47 в формате полноразмерного IgG, которые блокируют SIRP α и не вызывают значительного уровня агглютинации и/или истощения тромбоцитов. Кроме того, антитела к CD47 согласно изобретению не вызывают значительного уровня истощения RBC и/или анемии.

Антитела к CD47 согласно изобретению проявляют множество желательных характеристик, таких как, без ограничения, возможное блокирование взаимодействия между CD47 и его лигандом SIRP α не вызывая при этом значительного уровня гемагглютинации эритроцитов, а также высокую противоопухолевую активность. Например, антитела к CD47 согласно изобретению блокируют по меньшей мере на 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по

меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% взаимодействие между CD47 и SIRP α по сравнению с уровнем взаимодействия между CD47 и SIRP α , наблюдаемым в отсутствие описанного здесь антитела к CD47.

Антитела к CD47 согласно изобретению не вызывают значительного уровня агглютинации клеток, например, антитела к CD47 согласно изобретению не вызывают значительного уровня гемагглютинации красных кровяных телец. В некоторых случаях значительный уровень агглютинации клеток относится к уровню агглютинации в присутствии существующих в данной области антител к CD47. В одном аспекте уровень агглютинации в присутствии антител к CD47 согласно изобретению является уменьшенным по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению с уровнем агглютинации, наблюдаемым в присутствии существующих в данной области антител к CD47. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD47 согласно изобретению не вызывают значительного уровня агглютинации, если уровень агглютинации в присутствии антител к CD47 согласно изобретению является уменьшенным по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению с уровнем агглютинации, наблюдаемым в присутствии существующих в данной области антител к CD47. В других вариантах осуществления антитела к CD47 согласно изобретению не вызывают значительного уровня агглютинации, если уровень агглютинации в присутствии антител к CD47 согласно изобретению является уменьшенным по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению с уровнем агглютинации, наблюдаемым в присутствии антитела к CD47, 1B4, которое содержит последовательность вариационной тяжелой и вариационной легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 81 соответственно. Предпочтительно, антитела к CD47 согласно изобретению не вызывают значительного уровня агглютинации клеток при концентрации антитела от 10 пМ и 10 мкМ, например, при концентрации антитела 50, 100 пМ, 1, 10, 50, 100 нМ, 1 или 5 мкМ.

В некоторых вариантах осуществления уровень истощения RBC определяют путем измерения количества RBC у субъекта после проведения лечения, например, антителом согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD47 согласно изобретению не вызывают значительного уровня истощения RBC, если количество RBC у субъекта после введения антитела согласно изобретению находится в пределах диапазона значений нормального здорового субъекта. Например, количество RBC для нормального здорового субъекта мужского пола составляет от около 4,7 до около 6,1 миллионов клеток на микролитр образца крови. Например, количество RBC для нормального здорового субъекта женского пола составляет от около 4,2 до около 5,4 миллионов клеток на микролитр образца крови. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD47 согласно изобретению не вызывают значительного уровня истощения RBC, если количество RBC у субъекта после введения антитела согласно изобретению (5 мин, 10 мин, 30 мин, 1, 2, 3, 4, 5, 12, 24 ч, 2, 4, 6 дней, 1, 2, 3 недели, 1, 2 месяца или более) составляет по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 или 99,5% от количества RBC, наблюдаемого до введения. Альтернативно или дополнительно, антитела к CD47 согласно изобретению не вызывают значительного уровня истощения RBC, если количество RBC у субъекта после введения антитела согласно изобретению (5 мин, 10 мин, 30 мин, 1, 2, 3, 4, 5, 12, 24 ч, 2, 4, 6 дней, 1, 2, 3 недели, 1, 2 месяца или более) составляет по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 или 99,5% от количества RBC, наблюдаемого у субъекта после введения плацебо (например, носителя). Количество RBC определяют стандартными способами, известными в данной области. Предпочтительно, антитела к CD47 согласно изобретению не вызывают значительного уровня истощения RBC при концентрации антитела от 10 пМ до 10 мкМ, например, при концентрации антитела 50, 100 пМ, 1, 10, 50, 100 нМ, 1 или 5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD47 согласно изобретению не вызывают значительного уровня истощения RBC при введении в дозе 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100 мг/кг или выше.

Антитела к CD47 согласно настоящему изобретению не вызывают значительного уровня истощения тромбоцитов. Например, при введении антитела согласно изобретению процентное содержание оставшихся тромбоцитов составляет по меньшей мере 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. Предпочтительно, антитела к CD47 согласно изобретению не вызывают значительного уровня истощения тромбоцитов при концентрации антитела от 10 пМ до 10 мкМ, например, при концентрации антитела 50, 100 пМ, 1, 10, 50, 100 нМ, 1 или 5 мкМ.

Кроме того, антитела к CD47 согласно настоящему изобретению включают, но без ограничения, антитела, которые обладают низкой аффинностью связывания с рецептором Fc γ R (Fc γ R). Например, константная область антитела обладает более низкой аффинностью связывания с Fc γ R, чем константная область антитела, относящегося к такому подклассу, как IgG1 (дикого типа или мутанта, например, IgG4P).

Кроме того, антитела по настоящему изобретению являются значительно более сильными в моде-

лях опухолей по сравнению с антителами, известными в данной области. Например, способность макрофагов к фагоцитозу опухолевых клеток в присутствии антител к CD47 согласно изобретению увеличивается по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению со способностью макрофагов к фагоцитозу опухолевых клеток в присутствии существующих в данной области антител к CD47.

Специалистам в данной области будет понятно, что без проведения излишних экспериментов можно количественно определить уровень агглютинации, например уровень гемагглютинации RBC. Например, специалистам в данной области будет понятно, что уровень гемагглютинации устанавливают путем измерения площади пятна RBC после проведения реакции гемагглютинации в присутствии антител к CD47 согласно изобретению, как описано в примерах ниже. В некоторых случаях площадь пятна RBC в присутствии антитела к CD47 согласно изобретению сравнивают с площадью пятна RBC в отсутствие антитела к CD47, т.е. в присутствии нулевой гемагглютинации. Таким образом, гемагглютинацию количественно определяют относительно исходного контроля. Более крупная площадь пятна RBC соответствует более высокому уровню гемагглютинации. Альтернативно, для количественного определения гемагглютинации можно использовать денситометрию пятна RBC.

Специалистам в данной области будет понятно, что без проведения излишних экспериментов можно количественно определить уровень истощения RBC. Например, специалистам в данной области будет понятно, что уровень истощения RBC устанавливают, например, путем измерения количества RBC (например, общего количества RBC в образце крови), например, с помощью устройства для подсчета клеток или гематометра. Специалистам в данной области будет понятно, что RBC, содержащиеся в образце крови, можно, например, выделить путем фракционирования цельной крови с использованием, например, центрифугирования перед подсчетом. В некоторых случаях количество RBC в присутствии антитела к CD47 согласно изобретению сравнивают с количеством RBC в отсутствие антитела к CD47, т.е. в присутствии нулевого истощения RBC. Таким образом, уровень истощения RBC является нормализованным к исходному контролю.

Антитела к CD47, описанные здесь, применяются для лечения, замедления развития или предупреждения повторного возникновения или частичного снятия симптома рака или другого неопластического состояния. Например, антитела к CD47, описанные здесь, применяются для лечения гематологических злокачественных новообразований и/или опухолей, например гематологических злокачественных новообразований и/или опухолей. Например, антитела к CD47, описанные здесь, применяются для лечения CD47+-опухолей. В качестве неограничивающего примера антитела к CD47, описанные здесь, применяются для лечения неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), рака молочной железы, рака яичника, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, меланомы, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака легкого, лейомиомы, лейомиосаркомы, глиомы, глиобластомы и т.д. Сплошные опухоли включают, например, опухоли молочной железы, опухоли яичника, опухоли легкого, опухоли поджелудочной железы, опухоли предстательной железы, опухоли меланомы, колоректальные опухоли, опухоли легкого, опухоли головы и шеи, опухоли мочевого пузыря, опухоли пищевода, опухоли печени и опухоли почки.

Используемый здесь "гематологический рак" относится к раку крови и включает, среди прочих, лейкоз, лимфому и миелому. "Лейкоз" относится к раку, при котором кровь содержит избыток лейкоцитов, неэффективных в отношении борьбы с инфекцией, вытесняя, таким образом, другие составляющие кровь компоненты, такие как тромбоциты и красные кровяные тельца. Известно, что случаи лейкоза классифицируются как острые и хронические. Определенные формы лейкоза включают, но без ограничения, острый лимфоцитарный лейкоз (ALL); острый миелоидный лейкоз (AML); хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); хронический миелогенный лейкоз (CML); миелопротиферативное нарушение/неоплазму (MPDS); и миелодиспластический синдром. "Лимфома" может относиться, среди прочих, к лимфоме Ходжкина, как вялотекущей, так и агрессивной неходжкинской лимфоме, лимфоме Буркетта и фолликулярной лимфоме (мелкоклеточной и крупноклеточной). Миелома может относиться к множественной миеломе (MM), гигантоклеточной миелогенной опухоли, миеломе тяжелых цепей и миеломе легких цепей или Бенса-Джонса.

Иллюстративные моноклональные антитела согласно изобретению включают, например, описанные здесь антитела. Иллюстративные антитела включают антитела, содержащие переменную область тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NOs: 5-30, и переменную область легкой цепи, выбранную из SEQ ID NOs: 31-47. Антитела также включают антитела, содержащие переменную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична последовательности, представленной по меньшей мере в одной из SEQ ID NOs: 5-30, и переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична последовательности, представленной по меньшей мере в одной из SEQ ID NOs: 31-47. Предпочтительно, антитела распознают и связываются с CD47 человека и не вызывают значительного уровня гемагглютинации

красных кровяных телец человека. Эти антитела соответственно называются здесь как антитела к CD47. Антитела к CD47 включают полностью человеческие моноклональные антитела, а также гуманизированные моноклональные антитела и химерные антитела. Эти антитела демонстрируют специфичность в отношении человеческого CD47, и было показано, что они модулируют, например блокируют, ингибируют, уменьшают, вызывают антагонизм, нейтрализуют или иным образом препятствуют экспрессии, активности и/или передаче сигнала CD47 без вызывания значительного уровня гемагглютинации красных кровяных телец, истощения красных кровяных телец, анемии и/или истощения тромбоцитов.

Антитела к CD47, обеспеченные здесь, проявляют ингибирующую активность, например, путем ингибирования экспрессии (например, ингибирования экспрессии CD47 на клеточной поверхности), активности и/или передачи сигнала CD47, или путем препятствования взаимодействию между CD47 и SIRP α . Антитела, обеспеченные здесь, полностью или частично уменьшают, или иным образом модулируют экспрессию или активность CD47 при связывании или ином взаимодействии с CD47, например, CD47 человека. Уменьшение или модулирование биологической функции CD47 является полным, значительным или частичным при взаимодействии между антителами и полипептидом и/или пептидом CD47 человека. Считается, что антитела полностью ингибируют экспрессию или активность CD47, если уровень экспрессии или активности CD47 в присутствии антитела уменьшается по меньшей мере на 95%, например на 96, 97, 98, 99 или 100% по сравнению с уровнем экспрессии или активности CD47, наблюдаемым в отсутствие взаимодействия, например, связывания с описанным здесь антителом. Считается, что антитела к CD47 значительно ингибируют экспрессию или активность CD47, если уровень экспрессии или активности CD47 в присутствии антитела к CD47 уменьшается по меньшей мере на 50%, например, на 55, 60, 75, 80, 85 или 90% по сравнению с уровнем экспрессии или активности CD47, наблюдаемым в отсутствие связывания с описанным здесь антителом к CD47. Считается, что антитела частично ингибируют экспрессию или активность CD47, если уровень экспрессии или активности CD47 в присутствии антитела к CD47 уменьшается по меньшей мере на 95%, например на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 85 или 90% по сравнению с уровнем экспрессии или активности CD47, наблюдаемым в отсутствие взаимодействия, например, связывания с описанным здесь антителом.

Антитела согласно изобретению также включают моноклональные антитела, которые специфически связываются с CD47, при этом антитело не вызывает значительного уровня агглютинации, например гемагглютинации красных кровяных клеток ("гемагглютинации RBC"). Антитела согласно настоящему изобретению уникальным образом связываются с CD47, не вызывая склеивания CD47-положительных клеток; однако способность антител согласно настоящему изобретению связываться с CD47 на клеточной поверхности и не вызывать феномена склеивания клеток не ограничивается красными кровяными тельцами. Дополнительно или альтернативно, антитела согласно настоящему изобретению не вызывают значительного уровня истощения тромбоцитов, истощения RBC и/или анемии.

Фармацевтические композиции в соответствии с изобретением могут включать антитело согласно изобретению и носитель. Эти фармацевтические композиции могут быть включены в наборы, такие как, например, диагностические наборы.

Изобретение обеспечивает моноклональные антитела, которые связываются с CD47 или его иммунологически активный фрагмент, при этом антитело не вызывает значительного уровня агглютинации клеток после введения, например, антитело не вызывает значительного уровня гемагглютинации красных кровяных клеток после введения. Дополнительно или альтернативно, антитело или его фрагмент не вызывает значительного уровня истощения тромбоцитов. В некоторых вариантах осуществления антитело является химерным, гуманизированным или полностью человеческим. В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с CD47 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его иммунологически активный фрагмент предотвращает взаимодействие CD47 с SIRP α . Считается, что антитела полностью ингибируют взаимодействие CD47 и SIRP α , если уровень взаимодействия CD47/SIRP α в присутствии антитела является уменьшенным по меньшей мере на 95%, например на 96, 97, 98, 99 или 100% по сравнению с уровнем взаимодействия CD47/SIRP α в отсутствие взаимодействия с антителом, например, связывания с антителом. Считается, что антитела частично ингибируют взаимодействие CD47/SIRP α , если уровень взаимодействия CD47/SIRP α в присутствии антитела является уменьшенным по меньшей мере на 95%, например на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 85 или 90% по сравнению с уровнем взаимодействия CD47/SIRP α в отсутствие взаимодействия с антителом, например, связывания с антителом.

Количество антитела, достаточное для лечения или предупреждения рака у субъекта, представляет собой, например, количество, которое является достаточным для уменьшения передачи сигнала CD47 (см., например, Yamauchi et al., 2013 Blood, Jan 4. [Epub ahead of print]; Soto-Pantoja et al., 2013 Expert Opin Ther. Targets, 17: 89-103; Irandoust et al., 2013 PLoS One, Epub Jan 8; Chao et al., 2012 Curr Opin Immunol, 24 :225-32; Theocharides et al., 2012 J. Exp. Med., 209(10): 1883-99; Csányi et al., 2012 Arterioscler Thromb. Vasc. Biol., 32: 2966-73; Maxhimer et al., 2009 Sci. Transl. Med., 1: 3ra7; Sarfati et al., 2008 Curr. Drug Targets, 9: 842-850; Miyashita et al., 2004 Mol. Biol. Cell, 15: 3950-3963; E.J. Brown and W.A. Frazier, 2001 Trends Cell Biol., 11: 130-135; Oldenborg et al., 2001 J. Exp. Med., 193: 855-862; Blazar et al., 2001 J.

Exp. Med., 194: 541-549; Oldenborg et al., 2000 Science, 288: 2051-2054; и Gao et al., 1996 J Biol Chem, 271: 21-24). Например, количество антитела, достаточное для лечения или предупреждения рака у субъекта, представляет собой количество, которое является достаточным для снижения фагоцитарного ингибирующего сигнала в макрофагах, генерированного взаимодействием CD47/SIRP α в сигнальной оси CD47/SIRP α , т.е. антитело согласно изобретению способствует опосредованному макрофагами фагоцитозу клеток, экспрессирующих CD47. Используемый здесь термин "уменьшенный" относится к уменьшенной передаче сигнала CD47 в присутствии антитела согласно изобретению. Опосредованная CD47 передача сигнала является уменьшенной, когда уровень передачи сигнала CD47 в присутствии антитела к CD47 согласно изобретению на 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 99 или 100% или более ниже, чем контрольный уровень передачи сигнала CD47 (т.е. уровень передачи сигнала CD47 в отсутствие антитела). Уровень передачи сигнала CD47 измеряют различными стандартными методами, такими как, только в качестве примера, измерение активации гена, регулирующего последующие звенья сигнальных каскадов, и/или анализы репортерного гена люциферазы, восприимчивого к активации CD47. Специалистам в данной области следует учесть, что уровень передачи сигнала CD47 может быть измерен с помощью различных анализов, включая, например, коммерчески доступные наборы.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его иммунологически активный фрагмент представляет собой изотип IgG. В некоторых вариантах осуществления константная область антитела относится к изотипу IgG1 человека, и содержит аминокислотную последовательность

```
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKTHTCP PCPAP[LL]GG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQY[NI] STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGDSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)
```

В некоторых вариантах осуществления константная область IgG1 человека является модифицированной по аминокислоте Asn297 (Boxed, нумерация по Kabat) для предотвращения гликозилирования антитела, например Asn297Ala (N297A). В некоторых вариантах осуществления константная область антитела модифицирована по аминокислоте Leu235 (нумерация по Kabat) для изменения взаимодействий Fc-рецептора, например Leu235Glu (L235E) или Leu235Ala (L235A). В некоторых вариантах осуществления константная область антитела модифицирована по аминокислоте Leu234 (нумерация по Kabat) для изменения взаимодействий Fc-рецептора, например Leu234Ala (L234A). В некоторых вариантах осуществления константная область антитела изменена по обоим аминокислотам 234 и 235, например Leu234Ala и Leu235Ala (L234A/L235A) (согласно индексу EU, как в Kabat et al. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest).

В некоторых вариантах осуществления константная область антитела относится к изотипу IgG2 человека и содержит аминокислотную последовательность

```
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVNHNKPS NTKVDKTVET
KCCVECPPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQF[NI]STFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC
KVSNNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG
FYPSDISVEW ESNGQPENNY KTTTPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 2)
```

В некоторых вариантах осуществления константная область IgG2 человека модифицирована по аминокислоте Asn297 (Boxed, нумерация по Kabat) для предотвращения гликозилирования антитела, например Asn297Ala (N297A).

В некоторых вариантах осуществления константная область антитела относится к изотипу IgG3 человека и содержит аминокислотную последовательность

```
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHNKPS NTKVDKRVEL
KTPLGDTTHT CPRCPKPKSC DTPPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCPKPKSC
DTPPPCPRCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK PREEQY[NI]STF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESSGQPENNYNTTPPMLDS DGSFFLYSKLT TVDKSRWQQG
NIFSCSVMEHA ALHN[NI]FTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 3)
```

В некоторых вариантах осуществления константная область IgG3 человека модифицирована по аминокислоте Asn297 (Boxed, нумерация по Kabat) для предотвращения гликозилирования антитела, например Asn297Ala (N297A). В некоторых вариантах осуществления константная область IgG3 человека модифицирована по аминокислоте 435 для увеличения периода полувыведения, например Arg435His (R435H) (согласно индексу EU, как в Kabat et al. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest).

В некоторых вариантах осуществления константная область антитела относится к изотипа IgG4 человека и содержит аминокислотную последовательность

```
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDPKPS NTKVDKRVES
KYGPPCP[CP] APEF[CP]GGPSV FLFPKPKDPT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQF[CP]STY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 4)
```

В некоторых вариантах осуществления константная область IgG4 человека модифицирована в пределах шарнирной области для предотвращения или уменьшения обмена между цепями, например, Ser228Pro (S228P). В других вариантах осуществления константная область IgG4 человека модифицирована по аминокислоте 235 для изменения взаимодействий Fc-рецептора, например, Leu235Glu (L235E). В некоторых вариантах осуществления константная область IgG4 человека модифицирована в пределах шарнирной области и по аминокислоте 235, например Ser228Pro и Leu235Glu (S228P/L235E). В некоторых вариантах осуществления константная область IgG4 человека модифицирована по аминокислоте Asn297 (нумерация по Kabat) для предотвращения гликозилирования антитела, например, Asn297Ala (N297A). В некоторых вариантах осуществления константная область IgG4 человека модифицирована по положениям аминокислот Ser228, Leu235 и Asn297 (например, S228P/L235E/N297A). (Согласно индексу EU, как в Kabat et al. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest). В других вариантах осуществления антитело относится к подклассу IgG4 человека и лишена гликозилирования. В этих вариантах осуществления гликозилирование может быть устранено посредством мутации в положении 297 (нумерация по Kabat), например N297A. В других вариантах осуществления гликозилирование может быть устранено посредством продуцирования антитела в клетке-хозяине, которая лишена способности к посттрансляционному гликозилированию, например бактериальной или полученной из дрожжей системе, или модифицированной экспрессионной системе на основе клеток млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления константная область IgG человека модифицирована для усиления связывания с FcRn. Примерами Fc-мутаций, которые усиливают связывание с FcRn, являются Met252Tyr, Ser254Thr, Thr256Glu (M252Y, S254T, T256E, соответственно) (нумерация по Kabat, Dall'Acqua et al. 2006, J. Biol. Chem. Vol. 281(33) 23514-23524), или Met428Leu и Asn434Ser (M428L, N434S) (Zalevsky et al. 2010 Nature Biotech, Vol 28(2)157-159). (Согласно индексу EU, как в Kabat et al. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest).

В некоторых вариантах осуществления константная область IgG человека модифицирована для изменения антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), например аминокислотные модификации, описанные в 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): 4005-010; 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; Reviewed in Kaneko and Niwa, 2011 Biodrugs, 25(1):1-11.

В некоторых вариантах осуществления константная область IgG человека модифицирована для индукции гетеродимеризации. Например, наличие аминокислотной модификации в пределах домена CH3 при Thr366, которая при замене более крупной аминокислотой, например Trp (T366W), способна спариваться преимущественно со вторым доменом CH3, имеющим аминокислотные модификации менее крупных аминокислот в положениях Thr366, Leu368 и Tyr407, например, Ser, Ala и Val, соответственно (T366S/L368A/Y407V). Гетеродимеризация посредством модификаций CH3 может быть дополнительно стабилизирована введением дисульфидной связи, например, путем замены Ser354 на Cys (S354C) и Y349 на Cys (Y349C) на противоположных доменах CH3 (рассмотрено в публикации Carter, 2001 Journal of Immunological Methods, 248: 7-15).

В других вариантах осуществления изобретения антитело лишено гликозилирования, но не модифицировано по аминокислоте Asn297 (нумерация по Kabat). В этих вариантах осуществления гликозилирование может быть устранено путем продуцирования антитела в клетке-хозяине, которая лишена способности к посттрансляционному гликозилированию, например системе на основе бактерий или дрожжей, или модифицированной экспрессионной системе на основе клеток млекопитающего.

Изобретение также обеспечивает фармацевтические композиции, которые включают одно или несколько моноклональных антител, которые связываются с CD47, или их иммунологически активные

фрагменты, при этом антитело не вызывает значительного уровня гемагглютинации красных кровяных телец после введения.

Гемагглютинация является примером гомотипичного взаимодействия, при котором две экспрессирующие CD47 клетки агрегируют или склеиваются при обработке двухвалентной связывающей CD47 единицей. Способность антител согласно настоящему изобретению связываться с CD47 на клеточной поверхности и не вызывать явления клеточного склеивания не ограничивается красными кровяными тельцами. Наблюдалось, что антитела согласно настоящему изобретению уникальным образом связываются с CD47, не вызывая склеивания CD47-положительных клеточных линий, например клеток Daudi.

В некоторых случаях антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 5-30. Антитело необязательно содержит переменную область легкой цепи (VL), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 31-47. В некоторых случаях антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 5-30, и переменную область легкой цепи (VL), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 31-47. Антитела согласно изобретению также включают антитела, содержащие переменную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична последовательности, указанной, по меньшей мере, в одной из SEQ ID NOs: 5-30, и переменную легкую цепь, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична последовательности, указанной, по меньшей мере, в одной из SEQ ID NOs: 31-47. В других аспектах антитело содержит VH-область, представленную в любой из SEQ ID NOs: 5, 7, 8, 11, 15-17, 20-22 и 27-30, спаренную с VL-областью, представленной в любой из SEQ ID NOs: 31-39, 42, 43, 44 и 47. В другом варианте осуществления антитело содержит VH-область, представленную в любой из SEQ ID NOs: 5, 7, 8, 11, 12, 15-17, 20-22 и 27-30, спаренную с VL-областью, представленной в любой из SEQ ID NOs: 31, 32, 35, 40, 41, 42, 43, 44 и 47. В еще другом аспекте антитело содержит комбинацию VH-области цепи и VL-области цепи, выбранную из комбинаций, перечисленных в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD47 или его иммунологически активный фрагмент содержит определяющий комплементарность участок 1 (CDR1) переменной области тяжелой цепи (VH), имеющий аминокислотную последовательность, представленную в 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 или SEQ ID NO: 66; CDR2 VH, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 или SEQ ID NO: 76; CDR3 VH, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 77; CDR1 VL, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 68; CDR2 VL, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71; и CDR3 VL, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55. Например, антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит CDR1 VH, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50; CDR2 VH, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51; CDR3 VH, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52; CDR1 VL, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53; CDR2 VL, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54; и CDR3 VL, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55. В другом примере антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит CDR1 VH, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50; CDR2 VH, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72; CDR3 VH, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52; CDR1 VL, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53; CDR2 VL, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71; и CDR3 VL, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55.

В одном варианте осуществления антитела согласно настоящему изобретению связываются с CD47 в ориентации "голова-к-боку" (head to side), при которой тяжелая цепь располагается возле мембраны экспрессирующих CD47 клеток, в то время как легкая цепь закрывает SIRP α -связывающий участок на CD47. В другом варианте осуществления антитела согласно настоящему изобретению связываются с CD47 в ориентации "голова-к-боку" (head to side), при которой легкая цепь располагается возле мембраны экспрессирующих CD47 клеток, в то время как тяжелая цепь закрывает SIRP α -связывающий участок на CD47.

Антитела к CD47 связываются с эпитопом, который включает любой из аминокислотных остатков 1-116 CD47 при нумерации в соответствии с SEQ ID NO: 147 (т.е. SEQ ID NO: 48, за исключением сигнальной последовательности (аминокислоты 1-18)). Например, антитела согласно настоящему изобретению связываются с эпитопом, который включает один или несколько аминокислотных остатков Q31, N32, T33, T34, E35, V36, Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44, R45, D46, I47, Y48, T49, F50, D51, G52, A53, L54, N55, K56, S57, T58, V59, P60, T61, D62, F63, S64, S65, A66, K67, I68, E69, V70, S71, Q72, L73, L74, K75, G76, D77, A78, S79, L80, K81, M82, D83, K84, S85, D86, A87, V88, S89, H90, T91, G92, N93, Y94, T95, C96, E97, V98, T99, E100, L101, T102, R103, E104, G105, E106, T107, I108, I109 и E110 CD47 при нумерации в соответствии с SEQ ID NO: 147.

В некоторых случаях антитела согласно настоящему изобретению связываются с эпитопом прерывистого типа, который включает один или несколько аминокислотных остатков Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44, R45, D46, I47, Y48, T49, F50 и D51 CD47 при нумерации в соответствии с SEQ ID NO: 147. Например, антитела согласно настоящему изобретению связываются с эпитопом прерывистого типа, содержащим аминокислотные остатки Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104 или E106 CD47 при нумерации в соответствии с SEQ ID NO: 147. Например, антитела согласно настоящему изобретению связываются с эпитопом прерывистого типа, который включает, по меньшей мере, остатки петли KGRD (SEQ ID NO: 56) (остатки 43-46) CD47 при нумерации в соответствии с SEQ ID NO: 147. Например, антитела согласно настоящему изобретению связываются с эпитопом прерывистого типа, который включает, по меньшей мере, остатки Y37, K39, K41, петлю KGRD (SEQ ID NO: 56) (остатки 43-46), D51, H90, N93, E97, T99, E104 и E106 CD47 при нумерации в соответствии с SEQ ID NO: 147. Например, антитела согласно настоящему изобретению связываются с эпитопом прерывистого типа, который включает остатки Y37, K39, K41, петлю KGRD (SEQ ID NO: 56) (остатки 43-46), D51, H90, N93, E97, T99, E104 и E106 CD47 при нумерации в соответствии с SEQ ID NO: 147.

VH-область антител к CD47, описанных здесь, как правило, вовлечена в связывание с петлей KGRD (SEQ ID NO: 56) CD47. Таким образом, единственный эпитоп, с которым связываются антитела согласно настоящему изобретению, расположен сбоку CD47. В отличие от существующих в настоящее время антител к CD47, ориентация VH-области описанных здесь антител к CD47 вблизи мембраны является важным свойством этих антител, которое предотвращает клеточное склеивание, например, гемагглютинацию красных кровяных телец путем удерживания антител таким образом, что они не могут образовывать связь с молекулами CD47 на соседних клетках. Кроме того, так как VK-область антител к CD47, описанных здесь, взаимодействует с апикальными остатками, такими как Y37, T102 и E104, которые вовлечены в SIRP α -связывание, именно VK-область физически препятствует связыванию SIRP α с CD47.

Кроме того, обеспечено изолированное антитело или его иммунологически активный фрагмент, который конкурирует с антителами к CD47, описанным здесь, за предотвращение взаимодействия CD47 с SIRP α .

Изобретение обеспечивает полипептид, содержащий аминокислотные остатки Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104 и E106 CD47 при нумерации в соответствии с SEQ ID NO: 147. Кроме того, обеспечен полипептид, содержащий любой из аминокислотных остатков 1-116 CD47 при нумерации в соответствии с SEQ ID NO: 147. Например, полипептид содержит один или несколько из аминокислотных остатков Q31, N32, T33, T34, E35, V36, Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44, R45, D46, I47, Y48, T49, F50, D51, G52, A53, L54, N55, K56, S57, T58, V59, P60, T61, D62, F63, S64, S65, A66, K67, I68, E69, V70, S71, Q72, L73, L74, K75, G76, D77, A78, S79, L80, K81, M82, D83, K84, S85, D86, A87, V88, S89, H90, T91, G92, N93, Y94, T95, C96, E97, V98, T99, E100, L101, T102, R103, E104, G105, E106, T107, I108, I109 и E110 CD47 при нумерации в соответствии с SEQ ID NO: 147. Также, обеспечены способы применения этого полипептида в качестве антигена, например антигена, который связывается с антителом к CD47.

В изобретении также предлагаются способы частичного снятия симптомов рака или другого неопластического состояния путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, одного или нескольких моноклональных антител, которые связываются с CD47, или их иммунологически активных фрагментов, при этом антитело не вызывает значительного уровня гемагглютинации красных кровяных телец, истощения красных кровяных телец, анемии и/или истощения тромбоцитов после введения. Антитело вводят в количестве, достаточном для частичного снятия симптомов рака или другого неопластического состояния у субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой химерное, гуманизированное или полностью человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с CD47 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его иммунологически активный фрагмент предотвращает взаимодействие CD47 с SIRP α . В некоторых вариантах осуществления антитело или его иммунологически активный фрагмент относится к изотипу IgG, выбранному из группы, состоящей из изотипа IgG1, изотипа IgG2, изотипа IgG3 и изотипа IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело или его иммунологически активный фрагмент относится к изотипу IgG, выбранному из IgG4P и IgG4PE.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD47, описанные здесь, применяют совместно с одним или несколькими дополнительными агентами, или комбинацией дополнительных агентов. Подходящие дополнительные агенты включают существующие в данной области фармацевтические средства и/или хирургические терапии для предполагаемой цели, такой как, например, рак. Например, антитела к CD47 можно применять в сочетании с одним или несколькими химиотерапевтическими или противоопухолевыми средствами. Альтернативно, дополнительный химиотерапевтический агент представляет собой лучевую терапию. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтический агент представляет собой агент, индуцирующий клеточную гибель. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтический агент индуцирует потерю асимметрии фосфолипидов в плазматической мембране, например вызывает экспонирование фосфатидилсерина (PS) на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осу-

шествления химиотерапевтический агент индуцирует стресс эндоплазматического ретикулума (ER). В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтический агент представляет собой ингибитор протеасомы. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтический агент индуцирует транслокацию белков ER на клеточную поверхность. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтический агент индуцирует транслокацию и экспонирование на клеточной поверхности кальретикулина.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD47 и дополнительный агент объединены в одну терапевтическую композицию, и антитело к CD47 и дополнительный агент вводят одновременно. Альтернативно, антитело к CD47 и дополнительный агент представлены отдельно друг от друга, например, каждый введен в отдельную терапевтическую композицию, и антитело к CD47 и дополнительный агент вводят одновременно, или же антитело к CD47 и дополнительный агент вводят в разное время во время режима терапии. Например, антитело к CD47 вводят до введения дополнительного агента, антитело к CD47 вводят после введения дополнительного агента, или антитело к CD47 и дополнительный агент вводят поочередно. Как описано здесь, антитело к CD47 и дополнительный агент вводят в виде однократных доз или в виде многократных доз.

Специалисту в данной области будет понятно, что антитела согласно изобретению имеют разнообразные применения. Например, антитела согласно изобретению применяются в качестве терапевтических агентов, в качестве реагентов в диагностических наборах или в качестве диагностических инструментов, или в качестве реагентов в анализах конкурентного связывания для генерирования терапевтических реагентов.

Патентная и научная литература, на которую делается ссылка в настоящем документе, предоставляет сведения, которые доступны для специалистов в данной области. Все патенты США, а также опубликованные или неопубликованные патентные заявки США, указанные здесь, включены путем отсылки. Все опубликованные иностранные патенты и патентные заявки, указанные в настоящем документе, включены здесь путем отсылки. Документы Genbank и NCBI, обозначенные указанным здесь номером доступа, включены путем отсылки. Все другие опубликованные ссылки, документы, рукописи и научная литература, указанные в настоящем документе, включены здесь путем отсылки.

Несмотря на то что данное раскрытие было показано и описано с обращением на предпочтительные варианты его осуществления, специалистам в данной области будет понятно, что могут быть сделаны различные изменения в форме и деталях без отступления от объема изобретения, охваченного прилагаемыми пунктами формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A представлена диаграмма, отражающая связывание CD47 на клетках Daudi антителами в супернатантах гибридом, оцененное с помощью проточной цитометрии. На фиг. 1B представлена диаграмма, демонстрирующая способность некоторых из антител к CD47 находящегося супернатанта гибридомы блокировать связывание рекомбинантного SIRP α человека с рекомбинантным CD47 человека, как определено с помощью ELISA;

на фиг. 2 приведена серия графиков, отражающих (A) связывание очищенных мышинных антител к CD47 с клетками Raji, культивированной лимфобластной линией клеток, происходящая из лимфомы Буркетта, и (B) клетками CCRF-CEM, CD47-положительной Т-клеточной линии лимфобластной лимфомы, по данным анализа методом проточной цитометрии. В этом эксперименте сравнивали связывание мышинных антител согласно настоящему изобретению с коммерчески доступными антителами к CD47, B6H12 и 2D3;

на фиг. 3 представлены серии графиков, отражающих способность антител к CD47 блокировать связывание с SIRP α с использованием (A) ELISA с рекомбинантным человеческим белком, или (B) методом проточной цитометрии с использованием клеток CCRF-CEM и рекомбинантного человеческого белка SIRP α ;

на фиг. 4 показаны серии фотографий, графики и таблица, которые демонстрируют гемагглютинацию RBC, вызванной антителами к CD47. Гемагглютинация RBC подтверждается появлением помутнения в лунке, тогда как неагглютинированные RBC выглядят как пунктат. На фиг. 4A показано, что антитело 2A1 не проявляет гемагглютинации при всех тестируемых концентрациях. Индекс гемагглютинации показан на графике. На фиг. 4B показано, что 2A1 обладает наименьшей среди многих антител к CD47 способностью агглютинировать RBC. Также показано отсутствие агглютинирующей активности у человеческой химерной версии 2A1 (2A1-xi). На фиг. 4C показано, что моноклональное антитело к CD47 2D3, которое не блокирует SIRP α , не вызывает гемагглютинацию. На фиг. 4D показан широкий диапазон концентраций антител к CD47 в анализе гемагглютинации и эффект прозоны. Индекс гемагглютинации показан на графике. На фиг. 4E показан более узкий диапазон концентраций для гемагглютинации антителом к CD47, 1B4, тогда как этот эффект отсутствует при связывании с 2A1. На фиг. 4F показано, что 2A1, химерное антитело 2A1 (2A1-xi) и гуманизированные варианты не вызывают гемагглютинации. В большинстве экспериментов антитело 9E4 и коммерческое антитело B6H12 использовали в качестве положительных контролей для гемагглютинации. Другие коммерчески доступные антитела, используемые в этих анализах, представляли собой SIRP α -блокирующие антитела BRC126 и CC2C6, и не блокирующее

SIRP α антитело 2D3;

на фиг. 5 представлен график, показывающий связывание антител 2A1 и B6H12 с В-клетками макак-крабоедов (суно) и клетками Raji, оцененное методом проточной цитометрии. Антитело 2A1 связывается с CD47 человека и суно с эквивалентной аффинностью, так же как антитело B6H12, хотя и с более низкой аффинностью к человеческому и суно CD47 по сравнению с 2A1;

на фиг. 6 показан график, отражающий связывание 2A1, 2A1-х1 и B6H12 с клетками Raji, оцененное методом проточной цитометрии. Важно, график показывает, что последовательности переменных областей тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей были верно установлены в химерной версии 2A1;

на фиг. 7A-7J - серии графиков, демонстрирующих связывание гуманизированных вариантов 2A1 с клетками Raji. 2A1-х1 использовали в качестве внутреннего контроля на большинстве графиков. Множество комбинаций тяжелых и легких цепей тестировали, как описано в примере 8;

на фиг. 8A представлен график, полученный с помощью гель-хроматографии на колонке Superdex 200 системы AKTA FLPC. Показаны варианты IgG1, IgG4P и IgG4PE антитела AB6.12. Все три варианта являются на более чем 97% мономерными. На фиг. 8B представлен снимок ряда гуманизированных вариантов 2A1, полученный при осуществлении электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) с окрашиванием Кумасси синим в восстанавливающих (R) и невосстанавливающих (NR) условиях;

на фиг. 9 - серии диаграмм, отражающих способность антител к CD47 стимулировать фагоцитоз человеческой линии опухолевых клеток полученными из человеческих моноцитов макрофагами (MDM). На фиг. 9A представлена диаграмма, показывающая фагоцитарный индекс, при этом использовали коммерческое антитело B6H12, мышиное антитело 2A1, гуманизированный вариант антитела AB2.05, и неблокирующее коммерческое антитело 2D3. На фиг. 9B показана диаграмма, демонстрирующая фагоцитарный индекс, при этом использовали коммерческое антитело B6H12, гуманизированное антитело AB2.05 (IgG1 человека), и варианты IgG1, IgG4P и IgG4PE гуманизированного антитела AB6.12. Клетки CCRF-CEM использовали в качестве клеточной линии-мишени CD47 в этих экспериментах;

на фиг. 10 показаны серии графиков, демонстрирующих противоопухолевые эффекты антител к CD47 в опухолевой модели Raji. На фиг. 10A представлен график, который демонстрирует эффективность мышиных антител 9E4, 1B4, 2A1, и коммерческого антитела B6H12. на фиг. 10B представлен график, который демонстрирует эффективность изотипов IgG1, IgG4P и IgG4PE гуманизированного антитела AB6.12, наряду с мышиным антителом 2A1. В обеих моделях мышей обрабатывали антителами в дозах 200 мкг три раза в неделю;

на фиг. 11 представлено графическое изображение совместных кристаллических комплексов CD47-IgV с SIRP α -IgV-доменом (A, (Protein Data Bank (PDB) Reference No. 2JJS), B6H12 (B) и 2A1 (C). Антитела 2A1 и B6H12 связываются в сильно различающихся ориентациях и с разными эпитопами на CD47, оба из которых перекрываются с SIRP α -связывающим участком. Антитело 2A1 связывается в ориентации "голова-к-боку" на белке CD47;

на фиг. 12 - серии графиков, демонстрирующих уровни тромбоцитов в крови у макак-крабоедов после однократной дозы (носитель, 10, 30 или 100 мкг/кг) антитела к CD47 изотипов IgG1, IgG4P (для стабилизации шарнирной области: S228P) и IgG4PE (для стабилизации шарнирной области: S228P, и дополнительно для уменьшения связывания с Fc γ R мутант: L235E). Графики в левой колонке (A, C, E и G) представляют среднее количество тромбоцитов в цельной крови в динамике по времени. Графики в правой колонке (B, D, F и H) представляют средний процент оставшихся тромбоцитов в динамике времени, нормализованный к количеству тромбоцитов до введения дозы (4 дня до инъекции) для каждой обезьяны;

на фиг. 13 - график, показывающий среднее количество RBC у обработанных антителом макак-крабоедов, нормализованное к среднему количеству RBC у обезьян, обработанных носителем. Обработанным антителом обезьянам вводили различные дозы антител AB06.12-IgG4P или AB06.12-IgG4PE согласно изобретению.

Подробное описание изобретения

В изобретении предлагаются моноклональные антитела, которые специфически связываются с CD47, включая CD47 человека. Эти антитела совместно называются здесь как антитела к CD47.

Основными Fc-зависимыми функциями антитела для уничтожения клеток-мишеней являются комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), иницированная связыванием C1q с Fc-областью; антитело-зависимая цитотоксичность (ADCC), опосредованная взаимодействием Fc-области с рецепторами Fc γ (Fc γ R), главным образом Fc γ RIIIa на иммунных эффекторных клетках (например, NK-клетках и нейтрофилах); и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), который осуществляется макрофагами посредством распознавания опсонизированных клеток-мишеней через Fc γ RI. Подклассы антител различаются по своим способностям опосредовать Fc-зависимые эффекторные активности. У человека подклассы IgG1 и IgG3 обладают высокой активностью в отношении CDC благодаря связыванию с C1q. Кроме того, подкласс IgG1 обладает наиболее высокой аффинностью в отношении Fc γ Rs и поэтому является наиболее активным в отношении ADCC и Fc-зависимого ADCP. Подкласс IgG4 лишен способности к связыванию с C1q и обладает значительно сниженной аффинностью связывания с Fc γ R и поэтому значи-

тельно ослабленной эффекторной функцией.

CD47, многократно пронизывающий мембрану трансмембранный рецептор, принадлежащий суперсемейству иммуноглобулинов, взаимодействует с SIRP α (сигнальный-регуляторный белок альфа) на макрофагах и поэтому сдерживает фагоцитоз. Злокачественные клетки, которые выбирают этот путь, избегают фагоцитоза. Как описано подробно ниже, это представляет собой новый механизм избегания иммунной защиты опухоли, и поэтому терапевтическое направленное воздействие на CD47 имеет широкое применение во многих видах рака.

Экспрессия CD47 коррелирует с плохими клиническими исходами во многих различных злокачественных новообразованиях, включая неходжкинскую лимфому (NHL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), рак яичника, глиому, глиобластому и т.д. Кроме того, CD47 был идентифицирован как маркер раковых стволовых клеток в лейкомиях и солидных опухолях (Jaiswal et al., 2009 Cell, 138(2): 271-85; Chan et al., 2009 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106(33): 14016-21; Chan et al., 2010 Curr. Opin. Urol., 20(5): 393-7; Majeti R. et al., 2011 Oncogene, 30(9): 1009-19).

Блокирующие CD47 антитела продемонстрировали противоопухолевую активность во множестве моделей опухолей *in vivo*. Кроме того, было показано, что данные антитела синергически действуют с другими терапевтическими антителами, включая Rituxan® и Herceptin® в моделях опухолей. Блокирование взаимодействия CD47 с SIRP α может стимулировать фагоцитоз экспрессирующих CD47 клеток макрофагами (рассмотрено в работе Chao et al., 2012 Curr. Opin. Immunol, 24(2): 225-32). Мыши, лишенные CD47, высоко устойчивы к лучевой терапии, что указывает на роль направленного воздействия на CD47 в комбинации с лучевой терапией (Isenberg et al., 2008 Am. J. Pathol., 173(4): 1100-1112; Maxhimer et al., 2009 Sci. Transl. Med., 1(3): 3ra7). Кроме того, сингенные модели опухолей у этих мышей демонстрируют уменьшение метастаз в костях по сравнению с мышами дикого типа (Uluçkan et al., 2009 Cancer Res., 69(7): 3196-204).

Важно, что большинство антител к CD47, как сообщалось, вызывает агрегацию человеческих эритроцитов, а также истощение красных кровяных клеток и анемию. Агрегация является примером гомотипичной реакции, когда две экспрессирующие CD47 клетки агрегируют или склеиваются при обработке двухвалентной связывающей CD47 единицей. Например, сообщалось, что антитело к CD47, MABL, в виде полноразмерного IgG или F(ab')₂, вызывает агрегацию эритроцитов, и только после изменения MABL на scFv или двухвалентный scFv, этот эффект был уменьшен (см. например, Uno S., Kinoshita Y., Azuma Y. et al. Antitumor activity of a monoclonal antibody against CD47 in xenograft models of human leukemia. Oncol. Rep. 2007; 17: 1189-94; Kikuchi Y., Uno S., Yoshimura Y. et al. A bivalent single-chain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells. Biochem. Biophys Res. Commun 2004; 315: 912-8). Другие известные антитела к CD47, включая B6H12, BRC126 и CC2C6, также вызывают агрегацию RBC, как описано подробно ниже.

Кроме того, антитела к CD47 и вызывающие антагонизм CD47 белки слияния SIRP α -Fc, как сообщалось, вызывают истощение красных кровяных телец и анемию при введении мышам и/или макакам-крабоедам (см. Weiskopf et al. Engineered SIRP α Variants as Immunotherapeutic Adjuvants to Anticancer Antibodies. Science 2013; 341:88). Анемия представляет собой состояние, при котором кровь лишена достаточного количества красных кровяных телец или гемоглобина для снабжения тканей кислородом. Анемия может быть диагностирована с помощью ряда способов, обычно известных в данной области. Например, анемия диагностируется с помощью общего анализа крови (CBC), в котором определяется количество, размер, объем и содержание гемоглобина красных кровяных телец. Анемия также диагностируется путем измерения уровня железа в крови и/или уровня ферритина в сыворотке, которые являются показателями общих запасов железа в организме. Кроме того, анемия диагностируется путем измерения уровней витамина B12 и фолата, количества ретикулоцитов и билирубина.

Таким образом, агрегация клеток, истощение RBC и анемия являются основными ограничениями для терапевтического направленного воздействия на CD47 с помощью существующих в настоящее время полноразмерных антител IgG и/или белков слияния SIRP α -Fc.

Более того, важной характеристикой антител к CD47 является способность блокировать взаимодействие CD47 и SIRP α для содействия фагоцитозу экспрессирующих CD47 клеток макрофагами. Многие из существующих в данной области антител к CD47 блокируют SIRP α ; однако, до изобретения, описанного здесь, существующие в данной области антитела, которые блокировали SIRP α , вызывали побочный эффект в виде агрегации, которая, как описано выше, является нежелательной. Другие существующие в данной области антитела, такие как 2D3, не вызывают агрегации; однако эти антитела также не блокируют SIRP α , что делает их неэффективными с точки зрения содействия фагоцитозу. Таким образом, до описанного здесь изобретения существовала острая потребность в идентификации антител к CD47, которые блокировали SIRP α и не вызывали склеивания клеток.

Антитела к CD47 согласно настоящему изобретению избегают нежелательного эффекта агрегации, повышая, таким образом, эффективность терапевтического направленного воздействия на CD47, и сохраняют способность блокировать взаимодействие CD47 с SIRP α , содействуя, таким образом, фагоцитозу экспрессирующих CD47 клеток. В частности, полноразмерные антитела IgG к CD47 согласно

настоящему изобретению (например, 2A1 и его гуманизированные производные, включая производные, представленные в табл. 1) не агглютинируют клетки на значительном уровне. Например, антитела к CD47 согласно изобретению не гемагглютинируют RBC на значительном уровне. В настоящем документе описаны первые антитела к CD47 в формате полноразмерного IgG, которые блокируют SIRP α и не вызывают значительного уровня гемагглютинации и/или истощения RBC. Взятые вместе, антитела согласно изобретению (например, антитело 2A1 и его гуманизированные производные) являются единственными среди существующих в настоящее время антител к CD47 по своей способности блокировать SIRP α , но не вызывать значительного уровня гемагглютинации и/или истощения RBC.

Антитела к CD47 согласно изобретению демонстрируют ряд желательных свойств, таких как, в качестве неограничивающего примера, сильное блокирование взаимодействия между CD47 и его лигандом SIRP α без вызывания значительного уровня или иного модулирования гемагглютинации эритроцитов, а также сильную противоопухолевую активность. Например, антитела к CD47 согласно изобретению блокируют по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% взаимодействие между CD47 и SIRP α по сравнению с уровнем взаимодействия между CD47 и SIRP α , наблюдаемым в отсутствие антител к CD47, описанного здесь. Антитела к CD47 согласно изобретению не вызывают значительного уровня агглютинации клеток, например, антитела к CD47 согласно изобретению не вызывают значительного уровня гемагглютинации красных кровяных телец. Например, уровень агглютинации в присутствии антител к CD47 согласно изобретению является уменьшенным по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению с уровнем агглютинации в присутствии существующих в данной области антител к CD47. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD47 согласно изобретению не вызывают значительного уровня агглютинации, если уровень агглютинации в присутствии антител к CD47 является уменьшенным по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению с уровнем агглютинации в присутствии антитела к CD47, IB4, которое содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 81, соответственно. Антитела к CD47 согласно изобретению не вызывают значительного уровня истощения RBC. Например, количество RBC у субъекта после введения антитела согласно изобретению (через 5, 10, 30 мин, 1, 2, 3, 4, 5, 12, 24 ч, 2, 4, 6 дней, 1, 2, 3, 1, 2 месяца или более) составляет по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99, 99,5% от количества RBC до введения. Альтернативно или дополнительно количество RBC у субъекта после введения антитела согласно изобретению (через 5 мин, 10 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 12 ч, 24 ч, 2 дня, 4 дня, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца или более) составляет по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99, 99,5% от количества RBC у субъекта после введения плацебо (например, носителя). Количество RBC определяют стандартными способами, известными в данной области. Кроме того, антитела согласно настоящему изобретению являются значительно более активными в моделях опухолей по сравнению с антителами, известными в данной области. Например, способность макрофагов опосредовать фагоцитоз опухолевых клеток в присутствии антител к CD47 согласно изобретению, увеличилась по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению со способностью макрофагов опосредовать фагоцитоз опухолевых клеток в присутствии существующих в данной области антител к CD47.

Специалистам в данной области будет понятно, что без проведения излишних экспериментов можно количественно определить уровень агглютинации, например уровень гемагглютинации RBC. Например, специалистам в данной области будет понятно, что уровень гемагглютинации определяют путем измерения площади пятна RBC после выполнения анализа на гемагглютинацию в присутствии антител к CD47 согласно изобретению, как описано в примерах ниже. В некоторых случаях площадь пятна RBC в присутствии антител к CD47 согласно изобретению сравнивают с площадью пятна RBC в отсутствие антител к CD47, т.е. в присутствии нулевой гемагглютинации. В этом случае гемагглютинацию количественно определяют относительно исходного контроля. Более крупная площадь пятна RBC соответствует более высокому уровню гемагглютинации. Альтернативно, для количественного определения гемагглютинации можно применять денситометрию пятна RBC.

Кроме того, антитела, такие как антитела к CD47 согласно изобретению, могут влиять на истощение тромбоцитов (например, Fc-зависимым образом) после введения. Например, лечение макакрабоедов антителом подкласса IgG1, которое связывается с CD47, может привести к значительному истощению тромбоцитов при введении многократных доз. См., например, пример 12 и фиг. 12C-D. Нема-

тивный фактор истощения тромбоцитов состоит в том, что в случае тяжелого истощения это может привести к смертельному кровотечению. Настоящее изобретение основано отчасти на удивительном открытии того, что мутация антитела для ослабления связывания с FcγR приводит к истощению тромбоцитов на уровне от необнаруживаемого до низкого даже при высоких дозах (например, 100 мг/кг). См. например, пример 12 и фиг. 12G-H. Таким образом, антитело, связывающее CD47, со значительно сниженными связыванием с FcγR и эффекторной функцией не вызывает истощения тромбоцитов.

Количество тромбоцитов может быть измерено обычными методами, как правило, известными специалистам в данной области. Процентное содержание оставшихся тромбоцитов в динамике по времени может быть рассчитано как количество тромбоцитов, оставшихся на определенный момент времени после проведения терапии согласно изобретению (например, антитела к CD47), нормализованное к количеству тромбоцитов на некоторый момент времени до проведения терапии (например, 1, 3, 6, 12 ч, 1, 2, 4, 5, 6 дней или более). Значительное истощение тромбоцитов может определяться как оставшееся после введения процентное содержание тромбоцитов, составляющее менее 100% (например, менее 95, 90, 85, 80, 75, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10%). Терапии согласно настоящему изобретению (например, антителами) вызывают незначительный уровень истощения тромбоцитов (например, процентное содержание оставшихся после введения тромбоцитов, составляющее, по меньшей мере, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%). Антитела к CD47 согласно изобретению связываются с CD47 человека и блокируют его взаимодействие с SIRPα (фиг. 1B, 3 и 7J). Эти антитела не вызывают значительного уровня гемагглютинации человеческих эритроцитов (фиг. 4). Также, эти антитела могут не вызывать значительных уровней истощения тромбоцитов (например, пример 12 и фиг. 12). Эти антитела способны стимулировать фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами (фиг. 9). Кроме того, антитела к CD47 проявляют высокую противоопухолевую активность в мышинной модели лимфомы человека (фиг. 10). Таким образом, антитела к CD47 согласно изобретению обходят главный ограничивающий фактор для терапевтического направленного воздействия на CD47. Таким образом, антитела к CD47 согласно изобретению являются важными при лечении многих видов рака.

Антитела согласно изобретению, которые специфически связываются с CD47 человека, блокируют, ингибируют, прерывают или иным образом модулируют взаимодействие между CD47 человека и SIRPα человека без вызывания значительного уровня или иного модулирования гемагглютинации эритроцитов.

Антитела согласно настоящему изобретению связываются с эпитопом CD47 с равновесной константой связывания (K_d), составляющей ≤ 1 мкМ, например, ≤ 100 нМ, предпочтительно ≤ 10 нМ, и более предпочтительно ≤ 1 нМ. Например, антитела к CD47, представленные здесь, демонстрируют K_d в интервале приблизительно от ≤ 1 нМ до около 1 нМ.

Антитела к CD47 согласно изобретению предназначены для модулирования, блокирования, ингибирования, уменьшения, вызывания антагонизма, нейтрализации или иным образом препятствования функциональной активности широко распространенного CD47. Функциональные активности CD47 включают, например, передачу сигнала посредством взаимодействия с SIRPα, модулирование, например увеличение внутриклеточной концентрации кальция при клеточной адгезии к внеклеточному матриксу, взаимодействие с С-концевым клеточным связывающим доменом тромбоспондина, взаимодействие с фибриногеном и взаимодействие с различными интегринами. Например, антитела к CD47 полностью или частично ингибируют функциональную активность CD47 путем частичного или полного модулирования, блокирования, ингибирования, уменьшения, вызывания антагонизма, нейтрализации или иным образом препятствования связыванию CD47 с SIRPα.

Считается, что антитела к CD47 полностью модулируют, блокируют, ингибируют, уменьшают, вызывают антагонизм, нейтрализуют или иным образом препятствуют функциональной активности CD47, если уровень функциональной активности CD47 в присутствии антитела к CD47 уменьшается по меньшей мере на 95%, например на 96, 97, 98, 99 или 100% по сравнению с уровнем функциональной активности CD47, наблюдаемым в отсутствие связывания с описанным здесь антителом к CD47. Считается, что антитела к CD47 значительно блокируют, ингибируют, уменьшают, вызывают антагонизм, нейтрализуют или иным образом препятствуют функциональной активности CD47, если уровень активности CD47 в присутствии антитела к CD47 уменьшается по меньшей мере на 50%, например на 55, 60, 75, 80, 85 или 90% по сравнению с уровнем активности CD47 в отсутствие связывания с описанным здесь антителом к CD47. Считается, что антитела к CD47 частично модулируют, блокируют, ингибируют, уменьшают, вызывают антагонизм, нейтрализуют или иным образом препятствуют функциональной активности CD47, если уровень активности CD47 в присутствии антитела к CD47 уменьшается менее чем на 95%, например на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 85 или 90% по сравнению с уровнем активности CD47 в отсутствие связывания с описанным здесь антителом к CD47.

Определения.

Если не оговорено особо, то используемые в настоящем описании научные и технические термины имеют общепринятые значения, которые понимаются специалистами в данной области. Кроме того, если это не очевидно из контекста описания, то существительные, употребляемые в единственном числе, могут означать и существительные во множественном числе, а существительные, употребляемые во мно-

жественном числе, могут означать существительные в единственном числе. В общих чертах, номенклатура и способы культивирования клеток и тканей, методы молекулярной биологии, химии белков и олиго- или полинуклеотидов и их гибридизации, хорошо известны специалистам и широко применяются в данной области. Стандартными методами являются методы рекомбинантных ДНК, олигонуклеотидный синтез, а также культивирование и трансформация тканей (например, электропорация, липофекция). Ферментативные реакции и методы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителей или в соответствии со стандартными процедурами, описанными в настоящей заявке. Вышеуказанные способы и процедуры обычно осуществляют стандартными методами, хорошо известными и описанными в различных общих и специальных руководствах, цитируемых и обсуждаемых в настоящем описании. см. например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Используемая здесь номенклатура, лабораторные процедуры и методы аналитической химии, химии органического синтеза и медицинской и фармацевтической химии, описанные здесь, хорошо известны специалистам и широко применяются в данной области. Химический синтез, химические анализы, приготовление фармацевтических препаратов, составление композиций, их доставку и лечение пациентов осуществляют стандартными методами.

В описании настоящего изобретения используются указанные ниже термины, которые, если это не оговорено особо, имеют значения, определенные ниже.

Используемые здесь термины CD47, ассоциированный с интегрином белок (IAP), антиген ОА3 рака яичников, Rh-ассоциированный антиген и MER6 являются синонимами и могут применяться здесь взаимозаменяемо.

Термины "красное кровяное тельце(а)" и эритроцит(ы) являются синонимами и могут применяться здесь взаимозаменяемо.

Термин "агглютинация" относится к клеточному склеиванию, тогда как термин "гемагглютинация" относится к склеиванию специфической субпопуляции клеток, т.е. красных кровяных телец. Таким образом, гемагглютинация представляет собой тип агглютинации.

Используемый здесь термин "антитело" означает молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные части молекул иммуноглобулина (Ig), т.е. молекулы, которые содержат антигенсвязывающий участок, который специфически связывается (вступает в иммунную реакцию) с антигеном. Термин "специфически связывается" или "вступает в иммунную реакцию" или "направленный против" означает, что указанное антитело реагирует с одной или несколькими антигенными детерминантами нужного антигена и не реагирует с другими полипептидами или связывается с другими полипептидами с гораздо более низкой аффинностью ($K_d > 10^{-6}$). Таким антителами являются, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, химерные, dAb (доменное антитело), одноцепочечные фрагменты Fab, Fab' и F(ab')₂, Fv, scFvs, и библиотека экспрессируемых Fab-фрагментов.

Известно, что основную структурную единицу антитела составляет тетрамер. Каждый тетрамер состоит из идентичных пар полипептидных цепей, где каждая пара имеет одну "легкую" цепь (примерно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (примерно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельную область, состоящую из 100-110 или более аминокислот, ответственных за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяется константной областью, ответственной, главным образом, за эффекторную функцию. Как правило, молекулы антитела, полученные от человека, относятся к любому из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, которые отличаются друг от друга природой тяжелой цепи, присутствующей в молекуле. Определенные классы также имеют подклассы (также известные как изотипы), такие как IgG₁, IgG₂ и другие. Кроме того, у человека легкая цепь может представлять собой каппа-цепь или лямбда-цепь.

Термин "моноклональное антитело" (MAb) или "композиция моноклональных антител", используемый здесь, означает популяцию молекул антител, содержащих молекулы антител только одного вида, состоящие из одного генного продукта легкой цепи и одного генного продукта тяжелой цепи. В частности, определяющие комплементарность участки (CDR) моноклонального антитела являются идентичными у всех молекул данной популяции. Моноклональные антитела (MAb) содержат антигенсвязывающий участок, способный вступать в иммунную реакцию с конкретным эпитопом антигена, характеризующимся аффинностью специфического связывания с этим эпитопом.

В общих чертах, молекулы человеческих антител относятся к любому из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, которые отличаются друг от друга природой тяжелой цепи, присутствующей в данной молекуле. Некоторые классы также подразделяются на подклассы, такие как IgG₁, IgG₂ и другие. Кроме того, у человека легкая цепь может представлять собой к-цепь или λ-цепь.

Термин "антигенсвязывающий участок" или "связывающая часть" означает часть молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании с антигеном. Антигенсвязывающий участок образован аминокислотными остатками N-концевых вариабельных ("V") областей тяжелой цепи ("H") и легкой цепи ("L"). Три высокой степени вариабельных фрагмента, присутствующих в V-областях тяжелой и легкой цепей, называемых "гипервариабельными областями", расположены между более консервативными фланкирующими фрагментами, известными как "каркасные области" или "FR". Таким образом, термин "FR" означает аминокислотные последовательности, которые обычно расположены между гипервариа-

белковыми областями в иммуноглобулинах и являются смежными с этими гипервариабельными областями. В молекуле антитела три гипервариабельные области легкой цепи и три гипервариабельные области тяжелой цепи локализованы напротив друг друга в трехмерном пространстве и образуют антигенсвязывающую поверхность. Антигенсвязывающая поверхность комплементарна трехмерной поверхности связанного антигена, и указанные три гипервариабельные области каждой тяжелой и легкой цепей называются "определяющими комплементарность участками" или "CDR". Присвоение аминокислот каждому домену белков, представляющих интерес с точки зрения иммунологии, осуществляют в соответствии с определениями последовательностей по Kabat (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), или Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989).

Используемый здесь термин "эпитоп" означает любую детерминанту белка, способную специфически связываться с иммуноглобулином или его фрагментом, или с Т-клеточным рецептором. Термин "эпитоп" включает любую детерминанту белка, способную специфически связываться с иммуноглобулином или с Т-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи, и обычно имеют специфическую трехмерную структуру, а также специфические зарядовые характеристики. Считается, что антитело специфически связывается с антигеном, если константа диссоциации составляет ≤ 1 мкМ; например ≤ 100 нМ, предпочтительно ≤ 10 нМ и более предпочтительно ≤ 1 нМ.

Используемые здесь термины "иммунологическое связывание" и "иммунологические связывающие свойства" означают нековалентные взаимодействия определенного типа, которые происходят между молекулой иммуноглобулина и антигеном, по отношению к которому данный иммуноглобулин является специфическим. Сила связывания или аффинность иммунологических взаимодействий могут быть определены таким термином как "константа диссоциации" (K_d) взаимодействия, при этом чем меньше K_d , тем больше аффинность. Иммунологические связывающие свойства выбранных полипептидов количественно определяют методами, хорошо известными в данной области. Один из таких методов позволяет измерять скорость образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающий участок/антиген, где указанная скорость зависит от концентрации партнеров данного комплекса, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, которые в равной степени влияют на скорость в обоих направлениях. Таким образом, "константа скорости ассоциации" (k_{on}) и "константа скорости диссоциации" (k_{off}) могут быть определены путем вычисления концентраций и фактических скоростей ассоциации и диссоциации (см. Nature 361:186-87 (1993)). Отношение k_{off}/k_{on} позволяет исключить все параметры, не относящиеся к аффинности, и равно константе диссоциации K_d (см., в общем, Davies et al. (1990) Annual Rev. Biochem. 59:439-473). Считается, что антитело согласно изобретению специфически связывается с CD47, если константа равновесного связывания (K_d) составляет ≤ 1 мкМ, предпочтительно ≤ 100 нМ, более предпочтительно ≤ 10 нМ и наиболее предпочтительно от ≤ 100 до 1 пМ, как было измерено в анализах, таких как анализы на связывание с радиоактивным лигандом, поверхностный плазмонный резонанс (SPR), анализ связывания с помощью проточной цитометрии или аналогичные анализы, известные специалисту в данной области.

Используемый здесь термин "выделенный полинуклеотид" означает полинуклеотид, полученный от геномной ДНК, кДНК, или путем синтеза, или их некоторых комбинаций, где указанный "выделенный полинуклеотид" по своей природе (1) не ассоциирован со всеми полинуклеотидами или с частью полинуклеотидов, с которыми он ассоциируется в природе, (2) функционально присоединен к другому полинуклеотиду, с которым он не ассоциируется в природе, или (3) не встречается в природе как часть более крупной последовательности.

Используемый здесь термин "выделенный белок" означает белок, продуцируемый кДНК, рекомбинантной РНК синтезированный белок, или их комбинацию, где указанный "выделенный белок", по своему происхождению или источнику происхождения, (1) не ассоциирован с природными белками, (2) свободен от других белков, происходящих от того же источника, например, от мышечных белков, (3) экспрессируется клетками из другого вида, или (4) не встречается в природе.

Используемый здесь термин "полипептид" представляет собой общее понятие, означающее нативный белок или фрагменты или аналоги полипептидной последовательности. Следовательно, фрагменты нативного белка или его аналоги представляют собой молекулы типа полипептидов.

Используемый здесь термин "природный", относящийся к определенному объекту, означает, что данный объект может существовать в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, присутствующая в организме (включая вирусы), может считаться природной, если она выделена из ее природного источника и если она не была специально модифицирована человеком в лабораторных или каких-либо других условиях.

Используемый здесь термин "функционально присоединенный" относится к положениям компонентов, присоединенных друг к другу способом, позволяющим осуществлять их предназначенные функции. Регуляторная последовательность, "функционально присоединенная" к кодирующей последовательности, связана с этой последовательностью так, чтобы могла осуществляться экспрессия кодирующей последовательности в условиях, пригодных для функционирования данных регуляторных последо-

вательностей.

Используемый здесь термин "регуляторная последовательность" означает полинуклеотидные последовательности, необходимы для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, к которым они связаны. Природа таких регуляторных последовательностей варьируется в зависимости от организма-хозяина, причем в прокариотах такие регуляторные последовательности обычно включают промотор, сайт связывания с рибосомой и последовательность терминации транскрипции, а в эукариотах такими регуляторными последовательностями обычно являются промоторы и последовательности терминации транскрипции. Термин "регуляторные последовательности" включает как минимум все компоненты, присутствие которых является необходимым для экспрессии и процессинга, а также он может включать дополнительные компоненты, присутствие которых является предпочтительным, например лидерные последовательности и последовательности-партнеры по слиянию. Используемый здесь термин "полинуклеотид" означает полимерную форму нуклеотидной последовательности длиной по меньшей мере 10 нуклеотидов, либо рибонуклеотидной или дезоксирибонуклеотидной последовательности, либо модифицированную форму, состоящую из нуклеотидов любого типа. Этот термин включает одноцепочечные и двухцепочечные формы ДНК.

Используемый здесь термин "олигонуклеотид" означает природные и модифицированные нуклеотиды, связанные друг с другом природными и не природными олигонуклеотидными связями. Олигонуклеотиды представляют собой полинуклеотидную последовательность, имеющую длину обычно в 200 оснований или менее. Предпочтительно олигонуклеотиды имеют длину в 10-60 оснований, а наиболее предпочтительно в 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20-40 оснований. Обычно олигонуклеотиды являются одноцепочечными, например используемы в качестве зондов, хотя иногда олигонуклеотиды могут быть двухцепочечными, например, используемые для конструирования генных мутантов. Олигонуклеотиды согласно изобретению могут быть смысловыми или антисмысловыми.

Используемый здесь термин "природные нуклеотиды" означает дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Используемый здесь термин "модифицированные нуклеотиды" означает нуклеотиды с модифицированными или с замещенными сахарными группами и т.п. Используемый здесь термин "олигонуклеотидные связи" включает такие олигонуклеотидные связи, как фосфодиэфир, фосфодиэфир, фосфоселеноат, фосфодиселеноат, фосфоранитиоат, фосфоранилат, фосфорамидат и т.п. см., например, LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein et al. Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon et al. Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. патент США № 5151510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Если необходимо, олигонуклеотид может включать метку для детекции.

Используемый здесь термин "селективная гибридизация" относится к детектируемому и специфическому связыванию. Полинуклеотиды, олигонуклеотиды и их фрагменты согласно изобретению селективно гибридизуются с цепями нуклеиновой кислоты в таких условиях гибридизации и отмывки, которые значительно минимизируют количество детектируемого связывания с неспецифическими нуклеиновыми кислотами. Для обеспечения селективной гибридизации, известной специалистам и обсуждаемой здесь, могут быть использованы условия высокой жесткости. В общих чертах, гомология между последовательностями полинуклеотидов, олигонуклеотидов и фрагментов согласно изобретению и последовательностью представляющей интерес нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере 80%, а более предпочтительно по меньшей мере 85, 90, 95, 99 и 100%. Две аминокислотные последовательности являются гомологичными, если их последовательности являются частично или полностью идентичными. Например, 85%-ная гомология последовательностей означает, что при выравнивании этих двух последовательностей для сопоставления на их максимальное соответствие, 85% аминокислот являются идентичными. Пробелы (в любой из двух сопоставляемых последовательностей) позволяют максимально увеличить соответствие, при этом предпочтительная длина пробела составляет 5 аминокислот или менее, а более предпочтительно 2 аминокислоты или менее. Альтернативно и предпочтительно, две последовательности белка (или полипептидные последовательности, происходящие от этих последовательностей и имеющие длину по меньшей мере в 30 аминокислот) считаются гомологичными в общепринятом смысле этого слова, если они имеют цену выравнивания более чем 5 (в единицах стандартного отклонения) при сопоставлении, осуществляемом с использованием программы ALIGN с матрицей данных по мутации и со штрафом за пробел 6 или более. См. Dayhoff M.O., in Atlas of Protein Sequence and Structure, pp. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) and Supplement 2 to this volume, pp. 1-10). Две последовательности или их части являются более предпочтительными гомологами, если их аминокислоты идентичны на 50% или более при их оптимальном сопоставлении путем выравнивания с использованием программы ALIGN. Используемый здесь термин "соответствует" означает, что полинуклеотидная последовательность является гомологичной (т.е. идентичной, но не является строго эволюционно родственной) всей или части эталонной полинуклеотидной последовательности, либо этот термин означает, что данная полипептидная последовательность идентична эталонной полипептидной последовательности. В противоположность этому используемый здесь термин "комплементарный" означает, что комплементарная последовательность гомологична всей или части эталонной полинуклеотидной после-

довательности. Например, нуклеотидная последовательность "ТАТАС" соответствует эталонной последовательности "ТАТАС" и комплементарна эталонной последовательности "ГТАТА".

Для описания сходства между двумя или более полинуклеотидными или аминокислотными последовательностями используются следующие термины: "эталонная последовательность", "окно сравнения", "идентичность последовательностей", "процент идентичности последовательностей" и "значительная идентичность". Термин "эталонная последовательность" означает последовательность, которая используется в качестве основы для сравнения последовательностей; эталонная последовательность может представлять собой подпоследовательность более крупной последовательности, например сегмента полноразмерной кДНК или геновой последовательности, имеющейся в списке последовательностей, и может содержать полноразмерную последовательность кДНК или геновую последовательность. Как правило, эталонная последовательность имеет длину по меньшей мере в 18 нуклеотидов или 6 аминокислот, обычно по меньшей мере 24 нуклеотида или 8 аминокислот, а чаще всего по меньшей мере 48 нуклеотидов или 16 аминокислот. Поскольку каждая из двух полинуклеотидных или аминокислотных последовательностей (1) может содержать последовательность (т.е. часть полноразмерной полинуклеотидной или аминокислотной последовательности), которая является сходной у этих двух молекул, и (2) может, кроме того, содержать последовательность, которая отличается у этих двух полинуклеотидных или аминокислотных последовательностей, то сравнение последовательностей двух (или более) молекул обычно осуществляют путем сопоставления последовательностей этих двух молекул по "окну сравнения" для идентификации и сравнения локальных областей гомологии последовательностей. Используемый здесь термин "окно сравнения" означает концептуальный сегмент, состоящий по меньшей мере из 18 смежных нуклеотидов или из 6 аминокислот, где полинуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность могут сравниваться с эталонной последовательностью, состоящей по меньшей мере из 18 смежных нуклеотидов или из 6 аминокислот, и где часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления, делеции, замещения и тому подобное (т.е. пробелы), которые составляют 20% или менее по сравнению с эталонной последовательностью (не содержащей добавлений или делеций) и которые используются для оптимального выравнивания двух последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей, осуществляемое для их сопоставления по окну сравнения, может быть осуществлено с использованием алгоритма локальной гомологии (Smith and Waterman *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)), алгоритма выравнивания областей гомологии (Needleman and Wunsch *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)), методом поиска сходства (Pearson and Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:2444 (1988)), путем компьютерной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks или пакеты программного обеспечения MacVector), или с использованием программы контроля и построения наилучшего выравнивания (т.е. получения наиболее высокого процента гомологии по окну сравнения), достигаемого различными методами.

Термин "идентичность последовательностей" означает, что две полинуклеотидные или аминокислотные последовательности являются идентичными (т.е. на нуклеотидном или аминокислотном уровне) в окне сравнения. Термин "процент идентичности последовательностей" означает процент, который вычисляют путем сравнения двух оптимально выравниваемых последовательностей по окну сравнения; определения числа положений идентичных оснований нулеиновых кислот (например, А, Т, С, G, U или I) или остатков в обоих последовательностях с получением числа совпадающих положений; деления этого числа соответствующих положений на общее число положений в окне сравнения (т.е. на размер окна), и умножения полученного результата на 100 с получением процента идентичности последовательности. Используемый здесь термин "значительная идентичность" означает характеристику полинуклеотидной или аминокислотной последовательности, где указанный полинуклеотид или указанная аминокислота составляют последовательность, которая по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере от 90-95%, а более предпочтительно по меньшей мере на 99% идентична эталонной последовательности в окне сравнения, составляющем по меньшей мере 18 нуклеотидов (6 аминокислот), чаще всего составляющем по меньшей мере 24-48 нуклеотидов (8-16 аминокислот), где процент идентичности последовательностей вычисляют путем сравнения эталонной последовательности с последовательностью, которая может включать делеции или добавления, которые в целом составляют 20% или менее по сравнению с эталонной последовательностью, в окне сравнения. Эталонная последовательность может представлять собой подпоследовательность более крупной последовательности.

Используемые здесь двадцать главных аминокислот имеют общепринятые аббревиатуры. См. *Immunology - A Synthesis* (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland 7 Mass. (1991)). Стереизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати главных аминокислот, неприродных аминокислот, таких как α -, α -дизамещенные аминокислоты; N-алкилзамещенных аминокислот, молочной кислоты и других редких аминокислот могут также служить подходящими компонентами полипептидов согласно настоящему изобретению. Примерами редких аминокислот являются: 4-гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, α -N-метиларгинин и другие аналогичные аминокис-

лоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В используемой здесь системе обозначения полипептидов в соответствии с общепринятой практикой и с принятым соглашением о терминологии левый конец аминокислоты называется аминоконцом, а правый конец называется карбоксиконцом.

Аналогичным образом, если это не оговорено особо, левым концом одноцепочечных полинуклеотидных последовательностей является 5'-конец, а направлением слева направо для двухцепочечных полинуклеотидных последовательностей считается 5'-направление. Направление присоединения растущих РНК-транскриптов от 5' к 3' называется направлением транскрипции, при этом области последовательностей на ДНК-цепи, имеющей такую же последовательность, как и РНК-цепь, которые находятся со стороны 5'-конца к 5'-концу РНК-транскрипта, называются "предшествующими последовательностями", а области последовательностей на ДНК-цепи, имеющие такую же последовательность, как и РНК-цепь, которые находятся со стороны 3'-конца по отношению к 3'-концу РНК-транскрипта, называются как "последующими последовательностями".

Термин "в основном идентичный", используемый по отношению к полипептидам, означает, что две пептидных последовательности, при их оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием "весов" пробелов по умолчанию, имеют по меньшей мере 80%-ную идентичность последовательностей, предпочтительно по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательностей, более предпочтительно по меньшей мере 95%-ную идентичность последовательностей и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%-ную идентичность последовательностей.

Предпочтительно, чтобы положения остатков, которые не являются идентичными, отличались в результате консервативных аминокислотных замен.

Термин "консервативные аминокислотные замены" означает взаимозаменяемые остатки, составляющие сходные боковые цепи. Например, группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи, составляют глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; группу аминокислот, имеющих алифатические гидроксильные боковые цепи, составляют серин и треонин; группу аминокислот, имеющих амидсодержащие боковые цепи, составляют аспарагин и глутамин; группу аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, составляют фенилаланин, тирозин и триптофан; группа аминокислот, имеющих основные боковые цепи, составляют лизин, аргинин и гистидин; и группу аминокислот, имеющих серосодержащие боковые цепи, составляют цистеин и метионин. Предпочтительными консервативными аминокислотными заменами являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутаминовая кислота-аспарагиновая кислота и аспарагин-глутамин.

Как обсуждается в настоящем документе, незначительные изменения в аминокислотных последовательностях молекул антител или иммуноглобулинов рассматриваются как изменения, входящие в объем настоящего изобретения, при условии, что при таких изменениях в аминокислотная последовательность будет сохраняться по меньшей мере, на 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80, 90, 95%, и наиболее предпочтительно на 99%. В частности, предусматриваются консервативные аминокислотные замены. Консервативными заменами являются замены, которые входят в семейство аминокислот, являющихся родственными по их боковым цепям. Генетически кодируемые аминокислоты обычно подразделяются на следующие семейства: (1) кислые аминокислоты представляют собой аспартат, глутамат; (2) основные аминокислоты представляют собой лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные аминокислоты представляют собой аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан, и (4) незаряженные полярные аминокислоты представляют собой глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Гидрофильными аминокислотами являются аргинин, аспарагин, аспартат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобными аминокислотами являются аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Аминокислотами, принадлежащими к другим семействам, являются (i) серин и треонин, принадлежащие к семейству алифатических оксикислот; (ii) аспарагин и глутамин, принадлежащие к семейству амидсодержащих кислот; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, принадлежащие к семейству алифатических аминокислот; и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, принадлежащие к семейству ароматических аминокислот. Например, следует ожидать, что отдельная замена лейцина изолейцином или валином, замена аспартата глутаматом, замена треонина серином или аналогичная замена какой-либо аминокислоты структурно родственной аминокислотой не будет оказывать значительного влияния на функцию связывания или свойства полученной молекулы, особенно, если замена не является аминокислотной заменой в каркасном участке. Продуцирование функционального пептида в результате такой аминокислотной замены может быть легко установлено путем анализа на удельную активность полипептидного производного. Такие анализы подробно описаны в настоящем документе. Фрагменты или аналоги молекул антител или иммуноглобулинов могут быть легко получены специалистами в данной области. Предпочтительно, чтобы амино- и карбоксиконцы этих фрагментов или аналогов находились вблизи границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены могут быть идентифицированы путем сравнения данных о нуклеотидных и/или аминокислотных последовательностях с данными, имеющимися в известных общедоступных базах данных или базах данных, находящихся в частной собственности. Предпочтительно для идентификации мотивов последовательностей или конформационных доменов предсказанных белков, которые встречаются в других белках с известной структурой и/или функцией, применяются методы

компьютерного сравнения. Методы идентификации последовательностей белков, которые образуют известную трехмерную структуру, являются известными. Bowie et al. Science 253:164 (1991). Например, описанные ранее примеры продемонстрировали, что специалисты в данной области смогут легко выявить распознать мотивы последовательностей и структурные конформации, которые могут быть использованы для определения структурных и функциональных доменов в соответствии с изобретением.

Предпочтительными аминокислотными заменами являются замены, которые приводят: (1) к снижению чувствительности к протеолизу, (2) к снижению чувствительности к окислению, (3) к изменению аффинности связывания для образования белковых комплексов, (4) к изменению аффинности связывания, и (4) к сообщению или модификации других физико-химических или функциональных свойства таких аналогов. Аналоги могут включать различные мутеины с последовательностью, отличающейся от природной пептидной последовательности. Например, в природную последовательность (предпочтительно в ту часть полипептида, которая расположена за пределами доменообразующих межмолекулярных контактов) могут быть внесены одна или множество аминокислотных замен (предпочтительно консервативных аминокислотных замен). Консервативная аминокислотная замена не должна значительно влиять на структурные свойства родительской последовательности (например, аминокислотная замена не должна приводить к разрушению спирали, присутствующей в родительской последовательности, или к нарушению вторичной структуры других типов, которая характеризует родительскую последовательность). Примеры известных вторичных и третичных структур полипептидов описаны в работах Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); и Thornton et al. Nature 354:105 (1991).

Используемый здесь термин "фрагмент полипептида" означает полипептид, который имеет аминоконцевую и/или карбоксиконцевую делецию, но в котором остальная аминокислотная последовательность в соответствующих положениях аминокислот идентична природной аминокислотной последовательности, происходящей, например, от полноразмерной кДНК-последовательности. Фрагменты обычно имеют длину по меньшей мере 5, 6, 8 или 10 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 14 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 20 аминокислот, обычно по меньшей мере 50 аминокислот, и еще более предпочтительно по меньшей мере 70 аминокислот. Используемый здесь термин "аналог" означает полипептиды, которые состоят из сегмента, имеющего по меньшей мере 25 аминокислот, в основном, идентичных части выведенной аминокислотной последовательности, и которые обладают специфическим связыванием с CD47 в подходящих условиях связывания. Обычно полипептидные аналоги по сравнению с природной последовательностью содержат консервативную аминокислотную замену (добавление или делецию). Аналоги обычно имеют длину по меньшей мере 20 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 50 аминокислот или более, и часто имеют такую же длину, как и полноразмерный природный полипептид.

Пептидные аналоги обычно используются в фармацевтической промышленности в качестве непептидных лекарственных средств, обладающих свойствами, аналогичными свойствам матричного пептида. Непептидные соединения этого типа называются "пептидными миметиками" или "пептидомиметиками". Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986), Veber and Freidinger TINS p.392 (1985); и Evans et al. J. Med. Chem. 30:1229 (1987). Такие соединения часто разрабатывают с помощью компьютерной программы молекулярного моделирования. Пептидные миметики, структурно сходные с терапевтически ценными пептидами, могут быть использованы для достижения эквивалентного терапевтического или профилактического эффекта. Обычно пептидомиметики являются структурно сходными с репрезентативным полипептидом (т.е. с полипептидом, который обладает биохимическими свойствами или фармакологической активностью), таким как человеческое антитело, и они обычно имеют одну или несколько пептидных связей, которые могут быть заменены, но необязательно, связью, выбранной из группы, состоящей из --CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂-CH₂--, --CH=CH-- (цис и транс), --COCH₂--, CH(OH)CH₂-- и -CH₂SO--, в соответствии с хорошо известной методикой. Системная замена одной или нескольких аминокислот консенсусной последовательности D-аминокислотой такого же типа (например, замена L-лизина на D-лизин) может быть использована для генерирования более стабильных пептидов. Кроме того, пептиды с конформационными ограничениями, содержащие консенсусную последовательность или вариант последовательности, в основном идентичной консенсусной последовательности, могут быть генерированы известными методами (Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)); например, путем присоединения внутренних цистеиновых остатков, способных образовывать внутримолекулярные дисульфидные мостики, которые циклизируют данный пептид.

Используемый здесь термин "агент" означает химическое соединение, смесь химических соединений, биологическую макромолекулу или экстракт, полученный из биологических материалов.

Используемый здесь термин "метка" или "меченый" относится к включению в полипептид детектируемого маркера, например радиоактивно меченой аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинильной группы, которая может быть детектирована с использованием меченого авидина (например стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которые могут быть детектированы оптическими или калориметрическими методами). В некоторых случаях такая

метка или маркер могут быть также терапевтическими. Могут быть применены различные методы мечення полипептидов и гликопротеинов, известные в данной области. Примерами меток, используемых для мечення полипептидов, являются, но без ограничения, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, комплекс лантанид-фосфор), ферментативные метки (например, пероксидаза хрена, п-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные метки, биотинильные группы, предварительно определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторым репортером (например, пара последовательностей "лейциновой молнии", сайты связывания для "вторых" антител, металлсвязывающие домены, эпитопные метки). В некоторых вариантах осуществления метки присоединяют посредством спейсерных групп различной длины для предотвращения возможных стерических затруднений. Используемый здесь термин "фармацевтическое средство или лекарственное средство" означает химическое соединение или композицию, которые способны индуцировать желательный терапевтический эффект при их соответствующем введении пациенту.

Используемый здесь термин "противоопухолевое средство" означает средство, которое обладает функциональным свойством ингибировать развитие или прогрессирование опухоли у человека, в частности злокачественной (раковой) опухоли, такой как карцинома, саркома, лимфома или лейкоз. Таким свойством противоопухолевых средств часто является способностью ингибировать развитие метастазов.

Другие химические термины в настоящем документе используются в соответствии с обычным употреблением в данной области, как проиллюстрировано в The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Используемый здесь термин "в основном чистый" относится к рассматриваемой молекуле, которая является преобладающей молекулой (т.е. присутствует в более высокой молярной концентрации по сравнению с любыми другими отдельными молекулами, имеющимися в данной композиции), и предпочтительно этот термин означает "в основном очищенную фракцию", т.е. композицию, в которой рассматриваемая молекула составляет по меньшей мере примерно 50% (на молярном уровне) от всех присутствующих макромолекул данного вида.

Обычно в основном чистая композиция составляет примерно более 80% от всех макромолекул, присутствующих в данной композиции, более предпочтительно примерно более 85, 90, 95 и 99%. Наиболее предпочтительно, чтобы рассматриваемая молекула была очищена почти до полной гомогенности (где примеси, присутствующие в данной композиции, не могут быть детектированы стандартными методами детекции) так, чтобы указанная композиция состояла, в основном, из макромолекул одного вида.

Антитела к CD47.

Моноклональные антитела согласно изобретению обладают способностью связываться с CD47, ингибировать связывание SIRP α с CD47, уменьшать опосредованную CD47-SIRP α передачу сигнала, стимулировать фагоцитоз и ингибировать рост опухоли и/или миграцию. Ингибирование определяют, например, с использованием клеточного анализа, описанного здесь в примерах.

Иллюстративные антитела согласно изобретению включают антитело 2A1, химерную версию 2A1 и гуманизированные варианты 2A1. Иллюстративные антитела согласно изобретению включают антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH), выбранную из SEQ ID NOs: 5-30, и переменную область легкой цепи (VL), выбранную из SEQ ID NOs: 31-47. В частности, иллюстративные антитела включают антитела, представленные в табл. 1.

Таблица 1

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи (VH)	Варибельная область легкой цепи (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

Кроме того, в изобретение включены антитела, которые связываются с тем же самым эпитопом, что и описанные здесь антитела к CD47. Например, антитела согласно изобретению специфически связываются с эпитопом, который включает один или несколько аминокислотных остатков на человеческом CD47 (см., например, GenBank Accession No. Q08722.1).

Аминокислотная последовательность иллюстративного человеческого CD47 представлена ниже (GenBank Accession No. Q08722.1 (GI: 1171879), включенный здесь путем отсылки). Сигнальная последовательность (аминокислоты 1-18) подчеркнута

```

1 mwplvaalll gsaccgsaql lfnktsvfe tfcndtvvip cfvtmneaqn ttevyvkwkf
61 kgrdiytfdg alnkstvptd fssakievsg llkgdaslkm dksdavshgt nytcevtelt
121 regetiiek yrvvswfspn enilivifpi faillfwgqf giktlkyrsg gmdektiall
181 vaglvitviv ivgailfvpg eyslknatgl glivtstgil illhyvfst aigltsfvia
241 ilviqviayi lavvglsici aacipmhgpl lisglisilal aqllglvymk fvasnqkti
301 pprkaveepf nafkeskgmm nde (SEQ ID NO: 48)

```

Для ясности, аминокислотная последовательность иллюстративного человеческого CD47, исключая сигнальную последовательность, представлена ниже

```

1 qlfnktskv eftfcndtvv ipcfvtmnea qnttevyvkw kfkgrdiytf dgalnkstv
61 tdfssakiev sqllkgdasl kmkdsdavsh tgnytcevt ltregetiie lkyrvvswfs
121 pnenilivif pifaillfwg qfgiktlkyr sggmdektia llvaglvitv ivivgailfv
181 pgeyslknat glglivtstg ilillhyvfv staigltsfv iailviqvia yilavvglsi
241 ciaacipmhg pllislglil alaqlglvly mkfvasnqkt iqpprkavee plnafkeskg
301 mmnde (SEQ ID NO: 147)

```

Аминокислотная последовательность иллюстративного домена человеческого CD47-IgV представлена ниже

```

19 qlfnktskv eftfcndtvv ipcfvtmnea qnttevyvkw kfkgrdiytf dgalnkstv
79 tdfssakiev sqllkgdasl kmkdsdavsh tgnytcevt ltregetiie lkyrvv
(SEQ ID NO: 49)

```

Иллюстративные моноклональные антитела согласно изобретению включают, например, гуманизированные антитела, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH) и/или переменную область легкой цепи (VL), которые показаны в представленных ниже последовательностях.

Переменные области тяжелой цепи (VH) антител к CD47 представлены ниже и выделены цветом. Определяющие комплементарность участки (CDR) VH-цепи антител к CD47 представлены ниже и выделены цветом. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность VH CDR1 представляет собой GFNIKDYLLH (SEQ ID NO: 50), GYTFTYYLLH (SEQ ID NO: 57), GFTFTYYLLH (SEQ ID NO: 58), GYNFTYYLLH (SEQ ID NO: 59), GYTITYYYLLH (SEQ ID NO: 60), GYTFKYLLH (SEQ ID NO: 61), GYTFTDYLLH (SEQ ID NO: 62), GFTFTDYLLH (SEQ ID NO: 63), GFTITDYLLH (SEQ ID NO: 64), GYTFKDYLLH (SEQ ID NO: 65) или GFTFKDYLLH (SEQ ID NO: 66). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность VH CDR2 представляет собой WIDPDNGDTE (SEQ ID NO: 51), WIDPDQGDTE (SEQ ID NO: 72), WIDPDYGDTE (SEQ ID NO: 73), WIDPDSGDTE (SEQ ID NO: 74), WIDPDNADTE (SEQ ID NO: 75) или WIDPDNTDTE (SEQ ID NO: 76). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность VH CDR3 представляет собой NAAYGSSSPYPMY (SEQ ID NO: 52) или NAAYGSSPYPMY (SEQ ID NO: 77).

EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPDNGDTEFAPKFQ GKATMTADTSSN
TAYLQLSSLTSED TAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQTSVTV (SEQ ID NO: 5)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYLLHWVQQAPGKGLEWMGWIDPDNGDTEYAEKFQGRVTITADTSTD
TAYMELSSLRSED TAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQTTVT V (SEQ ID NO: 6)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSED TAMY CNAAYGSSSYPM DYWGQTTVT V (SEQ ID NO: 7)

EVQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSED TAMY CNAAYGSSSYPM DYWGQTTVT V (SEQ ID NO: 8)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQGRVTMTADTSSN
TAYMELSSLRSED TAMY CNAAYGSSSYPM DYWGQTTVT V (SEQ ID NO: 9)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQGRVTMTEDTSTD
TAYMELSSLRSED TAMY CNAAYGSSSYPM DYWGQTTVT V (SEQ ID NO: 10)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDQGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSED TAMY CNAAYGSSSYPM DYWGQTTVT V (SEQ ID NO: 11)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDYGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSED TAMY CNAAYGSSSYPM DYWGQTTVT V (SEQ ID NO: 12)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDSGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 13)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNADTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 14)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNTDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 15)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 16)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYFTTYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 17)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFFTTYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 18)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYNFTTYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 19)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYTITYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 20)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYTFKYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 21)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYTFTDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 22)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFFTDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 23)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFTITDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 24)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYTFKDYYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 25)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFTFKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 26)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYLQLSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMQYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 27)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMQYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 28)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMQYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 29)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIDYLLHWVQAPGKGLEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMQYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 30)

Вариабельные области легкой цепи (VL) антител к CD47 представлены ниже. Определяющие комплементарность участки (CDR) VL-цепи антител к CD47 представлены ниже и выделены цветом. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность VL CDR1 представляет собой KASQDIHRYLS (SEQ ID NO: 53), RASQDIHRYLA (SEQ ID NO: 67) или RARQGIHRYLS (SEQ ID NO: 68). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность VL CDR2 представляет собой RANRLVD (SEQ ID NO: 54), RANRLQS (SEQ ID NO: 69), RANRRAT (SEQ ID NO: 70) или RANRLVS (SEQ ID NO: 71). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность VL CDR3 представляет собой LQYDEFPYT (SEQ ID NO: 55).

DIKMTQSPSSLYASLGERVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKSPKILYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISS
LEYEDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEMK (SEQ ID NO: 31)

DIKMTQSPSSLYASLGERVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKSPKILYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISS
LEYEDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 32)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDIHRYLSWYQQKPGKAPKLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDFTFTISS
LQPEDATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 33)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 34)

NIQMTQSPSAMSASVGRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS
LQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 35)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDIHRYLSWYQQKPGKAPKRLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS
LQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 36)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHRYLAWYQQKPGKVPKLLIYRANRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDVATYYCLQYDEFPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 37)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHRYLAWYQQKPGQAPRLLIYRANRRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS
LEPEDFAVYYCLQYDEFPYTFGQTRLEIK (SEQ ID NO: 38)

DIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
LQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 39)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
LQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 40)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKILIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
LQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 41)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
LQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 42)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKILIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
LQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 43)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
LQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 44)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
LQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 45)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
LQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 46)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
LQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 47)

В некоторых случаях антитела к CD47, описанные здесь, содержат вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NOs: 5-30, и вариабельную область легкой цепи, выбранную из SEQ ID NOs: 31-47. Иллюстративное антитело к CD47 содержит вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 5 и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 31; вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 35; вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 42; вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 32; вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 33; вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 34; вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 36; вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 37; вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 38; вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 35; вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 30, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 35; вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 43; вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 43; вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 43.

NO: 47; переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 43; переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 44; переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 44; переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 35; переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 39; переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 39; переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 16, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 35; переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 20, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 35; переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 21, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 35; переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 35; переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 35; или переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 27, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 35.

Антитела к CD47, описанные здесь, содержат любую из VH-областей, представленных в SEQ ID NOs: 5-30, спаренную с любой из VL-областей, представленных в SEQ ID NOs: 31-47. В частности, антитела к CD47, описанные здесь, содержат любую из VH-областей, представленных в SEQ ID NOs: 5, 7, 8, 11, 15-17, 20-22, и 27-30, спаренную с любой из VL-областей, представленных в SEQ ID NOs: 31-39, 42, 43, 44 и 47.

Антитела к CD47, описанные здесь, содержат любую из CDR1-областей VH, представленных в 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 и SEQ ID NO: 66; любую из CDR2-областей VH, представленных в SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76; любую из CDR3-областей VH, представленных в SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 77; любую из CDR1-областей VL, представленных в SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 68; любую из CDR2-областей VL, представленных в SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 71; и CDR3-область VL, представленную в SEQ ID NO: 55.

Специалистам в данной области будет понятно, что без проведения экспериментов можно определить, обладает ли моноклональное антитело такой же специфичностью, как моноклональное антитело согласно изобретению (например, антитело 2A1 или антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NOs: 5-31, и переменную область легкой цепи, выбранную из SEQ ID NOs: 31-47), путем установления способности первого из указанных антител предотвращать связывание второго из указанных антител с CD47. Если тестируемое моноклональное антитело конкурирует с моноклональным антителом согласно изобретению, на что будет указывать снижение уровня связывания с моноклональным антителом согласно изобретению, то эти два моноклональных антитела связываются с одним и тем же или близкородственным эпитопом.

Альтернативный способ определения того, обладает ли моноклональное антитело специфичностью моноклонального антитела согласно изобретению, состоит в предварительной инкубации моноклонального антитела согласно изобретению с растворимым белком CD47 (с которым оно обычно реагирует), и последующем добавлении тестируемого моноклонального антитела для того, чтобы определить, ингибируется ли способность тестируемого моноклонального антитела связываться с CD47. Если такое ингибирование тестируемого моноклонального антитела происходит, то, по всей вероятности, это антитело обладает такой же или функционально эквивалентной специфичностью к эпитопу, как и моноклональное антитело согласно изобретению.

Антитела согласно настоящему изобретению.

Скрининг моноклональных антител согласно изобретению также может быть проведен, например, путем измерения CD47- и/или CD47/SIRP α -опосредованной передачи сигнала, и определения способности тестируемого моноклонального антитела модулировать, блокировать, ингибировать, уменьшать, вызывать антагонизм, нейтрализовать или иным образом препятствовать CD47- и/или CD47/SIRP α -опосредованной передаче сигнала. Данные анализы могут включать анализы конкурентного связывания. Кроме того, в данных анализах можно измерять биологические свойства, например способность стимулировать фагоцитоз CD47-экспрессирующих клеток макрофагами, как описано в примере 9 (фиг. 9).

Для продуцирования моноклональных антител, направленных против CD47 или против его производных, фрагментов, аналогов, гомологов или ортологов, применяются различные процедуры, известные в данной области (см., например, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow E., and Lane D., 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, включенные здесь путем отсылки). Полностью человеческими антителами являются молекулы антител, в которых все последовательности легкой и тяжелой цепей, включая CDR, происходят от человеческих генов. Такие антитела называются здесь "чело-

вещескими антителами" или "полностью человеческими антителами". Человеческие моноклональные антитела получают, например, в соответствии с процедурами, описанными ниже в примерах. Человеческие моноклональные антитела могут быть также получены триомным методом; методом с использованием человеческой В-клеточной гибридомы (см. Kozbor et al., 1983 *Immunol Today* 4: 72); и методом EBV-гибридом с продуцированием человеческих моноклональных антител (см. Cole et al., 1985 In: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Человеческие моноклональные антитела могут быть продуцированы с использованием человеческого гибридом (см. Cote et al., 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030) или путем трансформации человеческих В-клеток вирусом Эпштейна-Барра in vitro (см. Cole et al., 1985 In: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Антитела очищают хорошо известными методами, такими как аффинная хроматография на белке А или белке G, которая позволяет получать, главным образом, IgG-фракцию в иммунной сыворотке. Затем или альтернативно, специфический антиген, который является мишенью для иммуноглобулина, или его эпитоп могут быть иммобилизованы на колонке для очистки иммуноспецифического антитела с помощью иммуноаффинной хроматографии. Очистка иммуноглобулинов обсуждается, например, в работе D. Wilkinson (*The Scientist*, published by The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28).

Антитела к CD47 согласно изобретению представляют собой моноклональные антитела. Моноклональные антитела, которые модулируют, блокируют, ингибируют, уменьшают, вызывают антагонизм, нейтрализуют или иным образом препятствуют CD47-и/или CD47/SIRP α -опосредованной клеточной сигнализации, генерируют, например, путем иммунизации животного мембранно-связанным и/или растворимым CD47, таким как, например, человеческим CD47 или его иммуногенным фрагментом, производным или вариантом. Альтернативно, животное иммунизируют клетками, трансфицированными вектором, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CD47, таким образом, что CD47 экспрессируется и связывается с поверхностью трансфицированных клеток. Альтернативно, антитела получают путем скрининга библиотеки, которая содержит последовательности антитела или антигенсвязывающего домена для связывания с CD47. Данную библиотеку получают, например, в бактериофаге в виде белка или пептида, слитого с покрывающим бактериофаг белком, который экспрессируется на поверхности собранных фаговых частиц и кодирует последовательности ДНК, содержащиеся в пределах фаговых частиц (т.е. "библиотека фагового дисплея"). Гибридомы, полученные в результате слияния клеток миеломы/В-клеток затем подвергают скринингу на реакционную способность с CD47.

Моноклональные антитела получают, например, используя способы гибридомы, такие как способы, описанные Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). В способе гибридомы мышью, хомяком или других подходящих животных-хозяев обычно иммунизируют иммунизирующим агентом для того, чтобы вызвать появление лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые специфически связываются с иммунизирующим агентом. Альтернативно, лимфоциты можно иммунизировать in vitro.

Иммунизирующий агент обычно включает в себя антиген белка, его фрагмент или их гибридный белок. В целом, используются любые лимфоциты периферической крови, если желательны клетки человеческого происхождения, или используются клетки селезенки или клетки лимфатических узлов, если желательны источники млекопитающих, кроме человека. Затем лимфоциты сливаются с линией immortalized клеток с использованием подходящего агента слияния, такого как полиэтиленгликоль, для формирования клетки гибридомы (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Линии immortalized клеток представляют собой обычно трансформированные клетки млекопитающих, в частности клетки миеломы, происходящие от грызунов, коров и человека. Обычно используются линии клеток миеломы крыс или мышей. Можно культивировать клетки гибридомы в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, которые ингибируют рост или выживание неслившихся, immortalized клеток. Например, если материнские клетки лишены фермента гипоксантин-гуанин-фосфорибозил трансферазы (HGPRT или HPRT), то культуральная среда для гибридом обычно включает гипоксантин, аминоптерин и тимидин ("среда HAT"), причем эти вещества предотвращают рост клеток с дефицитом HGPRT.

Предпочтительными линиями immortalized клеток являются те, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильный высокий уровень экспрессии антитела выбранными клетками, продуцирующими антитело, и чувствительны к среде, такой как среда HAT. Более предпочтительные линии immortalized клеток представляют собой линии мышинной миеломы, которые можно получить, например, из распределительного центра Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California и Американской коллекции типовых культур American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Линии клеток человеческой миеломы и мышинной-человеческой гетеромиеломы также были описаны для продукции моноклональных антител (см. Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63).

Культуральную среду, в которой культивируются клетки гибридомы, можно затем анализировать на присутствие моноклональных антител, направленных против антигена. Предпочтительно, специфич-

ность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяется иммунопреципитацией или анализом связывания *in vitro*, таким как радиоиммуноанализ (RIA) или ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA). Такие методики и анализы известны в данной области. Аффинность связывания моноклональных антител можно, например, определить анализом Scatchard из документа Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980). Кроме того, в терапевтических применениях моноклональных антител важно идентифицировать антитела, обладающие высокой степенью специфичности и высокой аффинностью связывания в отношении целевого антигена.

После идентификации желательных клеток гибридомы клоны можно субклонировать процедурами ограничивающего разбавления и выращивать стандартными способами (см. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Подходящие культуральные среды для этой цели включают, например, модифицированную по способу Дульбекко среду Игла и среду RPMI-1640. Альтернативно, клетки гибридомы можно выращивать *in vivo* в виде асцитов у млекопитающего.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, можно выделять или очищать из культуральной среды или свободной жидкости в брюшной полости стандартными способами очистки иммуноглобулинов, такими как, например, гидроксиапатитовая хроматография на сефарозе с белком А, гелеэлектрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Моноклональные антитела можно также получать способами рекомбинантной ДНК, например такими, которые описаны в патенте США № 4816567. ДНК, кодирующую моноклональные антитела согласно изобретению, можно легко выделить и определить их последовательность, используя обычные процедуры (например, использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи мышиных антител). Клетки гибридомы согласно изобретению служат в качестве предпочтительного источника такой ДНК. После выделения ДНК можно поместить в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки яичников китайского хомячка (CHO), человеческие эмбриональные клетки почек 293 (HEK), обезьяньи клетки COS, PER.C6®, клетки NS0, SP2/0, YB2/0 или клетки миеломы, которые иначе не продуцируют белок иммуноглобулина, для получения моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. ДНК также можно модифицировать, например, замещением кодирующей последовательности для константных доменов тяжелой и легкой цепей человека вместо гомологичных мышиных последовательностей (см. патент США № 4816567; Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994)), или ковалентным связыванием к последовательности, кодирующей иммуноглобулин, полной или частичной кодирующей последовательности для неиммуноглобулинового полипептида. Такой неиммуноглобулиновый полипептид может быть замещен на константные домены антитела согласно изобретению или может быть замещен на переменные домены одного комбинирующего антигена сайта антитела согласно изобретению для создания химерного бивалентного антитела.

Человеческие антитела и гуманизация антител.

Моноклональные антитела согласно изобретению включают полностью человеческие антитела или гуманизированные антитела. Данные антитела являются подходящими для введения человеку без вызывания иммунного ответа человеком против введенного иммуноглобулина.

Антитело к CD47 продуцируют, например, в соответствии с процедурами, описанными ниже в примерах. Например, антитело к CD47 согласно изобретению идентифицируют путем использования модифицированной стратегии иммунизации RIMMS (Repetitive Immunization Multiple Sites) у мышей и последующего создания гибридомы.

В других альтернативных способах антитело к CD47 получают, например, методами фагового дисплея с использованием антител, содержащих только человеческие последовательности. Такие методы хорошо известны в данной области и описаны, например, в заявке WO 92/01047 и патенте США № 6521404, которые включены здесь путем отсылки. В этом методе комбинаторную фаговую библиотеку, несущую рандомизированные пары легких и тяжелых цепей, скринируют с использованием природного или рекомбинантного источника CD47 или их фрагментов. В другом подходе антитело к CD47 получают способом, в котором по меньшей мере одна стадия включает иммунизацию трансгенного животного, не являющегося человеком, человеческим белком CD47. В этом методе некоторые эндогенные локусы тяжелой и/или легкой цепи капла указанного ксеногенного животного, не являющегося человеком, были блокированы, а поэтому они были неспособны к реаранжировке, требуемой для генерирования генов, кодирующих иммуноглобулины в ответ на антиген. Кроме того, животное стабильно трансфицируют по меньшей мере одним локусом человеческой тяжелой цепи и по меньшей мере одним локусом человеческой легкой цепи. Таким образом, в ответ на введение антигена человеческий локус подвергается реаранжировке с генерированием генов, кодирующих человеческие переменные области, обладающие иммуноспецифичностью к данному антигену. Поэтому после иммунизации у мыши *Xenomouse* продуцируются В-клетки, которые секретируют полностью человеческие иммуноглобулины.

Существует ряд хорошо известных методов получения ксеногенных животных, не являющихся человеком. Например, см. патенты США № 6075181 и 6150584, которые включены здесь путем отсылки в полном объеме. Указанная общая стратегия, которая была продемонстрирована в комбинации с проду-

цированием первых штаммов XenoMouse™, была описана в 1994 году. См. Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994), который включен здесь путем отсылки в полном объеме. См. также патенты США № 6162963; 6150584; 6114598; 6075181; и 5939598, и японские патентные заявки № 3068180 B2, 3068506 B2 и 3068507 B2, европейский патент EP 0463151 B1, и Международные патентные заявки WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310, и родственные заявки.

В альтернативном методе другие исследователи использовали "минилокусы", в котором был имитирован локус экзогенного Ig путем включения фрагментов (отдельных генов) локуса Ig. Таким образом, из одного или нескольких генов V_H, одного или нескольких генов D_H, одного или нескольких генов J_H, константной μ -области и второй константной области (предпочтительно константная γ -области) была создана конструкция для введения животному. см., например, патенты США № 5545806; 5545807; 5591669; 5612205; 5625825; 5625126; 5633425; 5643763; 5661016; 5721367; 5770429; 5789215; 5789650; 5814318; 5877397; 5874299; 6023010; и 6255458; и европейский патент № 0546073 B1; и Международные заявки на патент WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 и WO 98/24884, и родственные заявки.

Было продемонстрировано продуцирование человеческих антител у мышей, которым путем слияния микроклеток вводили большие сегменты хромосом или целые хромосомы. Смотри европейские патентные заявки 773288 и 843961.

Вырабатывание человеческих антимышиных антител (НАМА) послужило стимулом к целой индустрии продуцирования химерных или как-либо иначе гуманизированных антител. Поскольку химерные антитела имеют человеческую константную область и иммуновариабельную область, то предполагается, что в данном случае будут продуцироваться некоторые ответы в виде вырабатывания человеческих антител против химерных антител (НАСА), в частности, при постоянном или многократном введении этого антитела. Таким образом, для устранения этих недостатков и/или предотвращения эффектов НАМА-или НАСА-ответов желательно получить полностью человеческие антитела против CD47.

Получение антител с пониженной иммуногенностью также осуществляют методами гуманизации, химеризации и дисплея с использованием соответствующих библиотек. Следует отметить, что мышиные антитела или антитела, происходящие от других видов, могут быть гуманизированы или "приматизированы" методами, хорошо известными в данной области. см. например, Winter and Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) and Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992). Представляющее интерес антитело может быть сконструировано методами рекомбинантных ДНК для замены CH1, CH2, CH3, шарнирных доменов и/или каркасных доменов соответствующими человеческими последовательностями (См. WO 92102190 и патенты США № 5530101; 5585089; 5693761; 5693792; 5714350; и 5777085). Специалистам также известно применение кДНК Ig для конструирования химерных генов иммуноглобулина (Liu et al. *P.N.A.S.* 84:3439 (1987) и *J. Immunol.* 139:3521 (1987)). мРНК выделяют из гибридом или других клеток, продуцирующих антитело, и используют для продуцирования кДНК. Представляющая интерес кДНК может быть амплифицирована с помощью полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров (патенты США № 4683195 и 4683202). Альтернативно, для выделения представляющей интерес последовательности получают и скринируют библиотеку. Затем последовательность ДНК, кодирующую вариабельную область антитела, присоединяют к последовательностям человеческой константной области. Описание последовательностей генов человеческих константных областей можно найти у Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of immunological Interest*, N.I.H. publication no. 91-3242. Гены человеческой С-области могут быть легко выделены из известных клонов. Изотип может быть выбран с учетом желаемых эффекторных функций, таких как фиксация комплемента или антителозависимая клеточная цитотоксичность. Предпочтительными изотипами являются IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Могут быть использованы человеческие константные области легкой цепи каппа или лямбда. Затем химерное гуманизированное антитело экспрессируют стандартными методами.

Фрагменты антител, такие как Fv, F(ab')₂ и Fab, могут быть получены путем расщепления интактного белка, например протеазного или химического расщепления. Альтернативно, может быть сконструирован усеченный ген. Например, химерный ген, кодирующий часть F(ab')₂-фрагмента, должен включать последовательности ДНК, кодирующие CH1-домен и шарнирную область Н-цепи, за которыми следует кодон терминации трансляции, в результате чего может быть получена усеченная молекула.

Консенсусные последовательности Н- и L-J-областей могут быть использованы для конструирования олигонуклеотидов в целях их применения в качестве праймеров для введения нужных рестрикционных сайтов в J-область и последующего присоединения сегментов V-области с сегментами человеческой С-области. кДНК С-области может быть модифицирована с помощью сайт-направленного мутагенеза для введения рестрикционного сайта в аналогичное положение человеческой последовательности.

Экспрессионными векторами являются плазмиды, ретровирусы, YAC, EBV-эписомы и т.п. Подходящим вектором является вектор, кодирующий функционально полноразмерную последовательность СН- и CL-области человеческого иммуноглобулина с соответствующими рестрикционными сайтами, сконструированными в целях облегчения инсерции и экспрессии любой последовательности V_H или V_L. В таких векторах сплайсинг обычно происходит между донорным сайтом сплайсинга во встроенной J-

области и акцепторным сайтом сплайсинга, за которым находится человеческая С-область, а также в областях сплайсинга, которые присутствуют в человеческих СН-экзонах. Полиаденилирование и терминация транскрипции происходят в природных участках хромосом, расположенных ниже кодирующих областей. Полученное химерное антитело может быть присоединено к любому сильному промотору, включая LTR ретровирусов, например ранний промотор SV-40 (Okayama et al. *Mol. Cell. Bio.* 3:280 (1983)), LTR вируса саркомы Рауса (Gorman et al. *P.N.A.S.* 79:6777 (1982)), и LTR вируса мышинного лейкоза Молони (Grosschedl et al. *Cell* 41:885 (1985)). Также следует отметить, что могут быть также использованы нативные промоторы Ig и т.п.

Кроме того, человеческие антитела или антитела других видов могут быть получены с применением технологии дисплея, включая, но не ограничиваясь ими, фаговый дисплей, ретровирусный дисплей, рибосомный дисплей и другие хорошо известные методы, а затем полученные молекулы могут быть подвергнуты дополнительному созреванию, такому как аффинное созревание, например, методами, хорошо известными в данной области. Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992), Hanes and Plückthun *PNAS USA* 94:4937-4942 (1997) (рибосомный дисплей), Scott, *TIBS*, vol. 17:241-245 (1992), Cwirla et al. *PNAS USA* 87:6378-6382 (1990), Russel et al. *Nucl. Acids Research* 21:1081-1085 (1993), Hoganboom et al. *Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992), Chiswell and McCafferty *TIBTECH*; 10:80-8A (1992), и патент США № 5733743. Если технологии представления применяются для продуцирования антител, которые не являются человеческими, то такие антитела могут быть гуманизированы, как описано выше.

С применением таких технологий могут быть созданы антитела против CD47-экспрессирующих клеток, растворимых форм CD47, их эпитопов или пептидов, и экспрессирующих их библиотек (см. например, патент США № 5703057), которые затем могут быть скринированы на вышеуказанные активности, как описано выше.

Антитела к CD47 по изобретению можно экспрессировать с помощью вектора, содержащего сегмент ДНК, кодирующий одноцепочечное антитело, описанное выше.

Это может включать векторы, липосомы, депротеинизированную ДНК, ДНК с помощью адьюванта, генную пушку, катетеры и т.п. Векторы включают химические конъюгаты, например такие, которые описаны в WO 93/64701, которые содержат направляющий фрагмент (например, лиганд рецептора клеточной поверхности), и фрагмент, связывающий нуклеиновую кислоту (например, полилизин), вирусный вектор (например, основанный на ДНК или РНК вирусный вектор), белки слияния, например такие, которые описаны в PCT/US95/02140 (WO 95/22618), которые представляют собой белки слияния, содержащие направляющий фрагмент (например, антитело, специфичное в отношении клетки-мишени), и фрагмент, связывающий нуклеиновую кислоту (например, протамин), плазмиды, фаг и т.п. Векторы могут быть хромосомными, нехромосомными или синтетическими.

Предпочтительные векторы включают вирусные векторы, белки слияния и химические конъюгаты. Ретровирусные векторы включают вирусы лейкоза мышей Молони. Предпочтительными являются вирусные векторы, основанные на ДНК. Данные векторы включают векторы поксвекторы, такие как ортопокс- или авипоксвекторы, герпесвирусные векторы, такие как вектор на основе вируса простого герпеса 1 типа (HSV) (см. Geller A.I. et al., *J. Neurochem.* 64:487 (1995); Lim F. et al., in *DNA Cloning: Mammalian Systems*, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller A.I. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:7603 (1993); Geller A.I. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87:1149 (1990), аденовирусные векторы (см. LeGal LaSalle et al., *Science*, 259:988 (1993); Davidson et al., *Nat. Genet* 3:219 (1993); Yang et al., *J. Virol.* 69:2004 (1995) и векторы на основе аденоассоциированных векторов (см. Kaplitt M.G. et al., *Nat. Genet.* 8:148 (1994)).

Поксвирусные векторы вводят ген в цитоплазму клеток. Авипоксвирусные векторы приводят лишь к кратковременной экспрессии нуклеиновой кислоты. Аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы и векторы на основе вируса простого герпеса типа 1 (HSV) являются предпочтительными для введения нуклеиновой кислоты в нервные клетки. Аденовирусный вектор приводит к более краткосрочной экспрессии (примерно 2 месяца), чем аденоассоциированный вирус (примерно 4 месяца), который, в свою очередь, действует в течение более короткого времени, чем векторы HSV. Выбор конкретного вектора зависит от клетки-мишени и подлежащего лечению состояния. Введение может осуществляться стандартными способами, например путем инфекции, трансфекции, трансдукции или трансформации. Примеры способов переноса генов включают, например, депротеинизированную ДНК, преципитацию CaPO_4 , DEAE-декстран, электропорацию, слияние протопласта, липофекцию, микроинъекцию в клетки и вирусные векторы.

Вектор может применяться в отношении, по существу, любой желательной клетки-мишени. Например, для направления векторов можно использовать инъекцию путем стереотаксиса (например, аденовирус, HSV) в требуемое положение. Кроме того, частицы могут быть доставлены путем интрацеребровентрикулярной (icv) инфузии с использованием системы инфузии мининасосом, такой как система инфузии SynchroMed. Способ, основанный на объемном потоке, называемый конвекцией, также доказал свою эффективность по доставке больших молекул в обширные области головного мозга и может применяться при доставке вектора к клетке-мишени (см. Bobo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2076-2080 (1994); Morrison et al., *Am. J. Physiol.* 266:292-305 (1994)). Другие способы, которые могут применяться, вклю-

чают катетеры, внутривенную, парентеральную, интраперитонеальную и подкожную инъекцию, и пероральный или другие известные пути введения.

Данные вектора могут применяться для экспрессии больших количеств антител, которые могут быть использованы различными способами. Например, для детекции присутствия в образце CD47. Антитело также можно применять для связывания или разрушения CD47- и/или CD47/SIRP α взаимодействия и CD47/SIRP α -опосредованной передачи сигнала.

Методы могут быть адаптированы для получения одноцепочечных антител, специфических к антигенному белку по изобретению (см., например, патент США № 4946778). Кроме того, способы могут быть адаптированы для конструирования Fab-экспрессионных библиотек (см., например, Huse et al., 1989 Science 246: 1275-1281) для обеспечения быстрой и эффективной идентификации моноклональных Fab-фрагментов с желательной специфичностью в отношении белка или производных, их фрагментов, аналогов или гомологов. Фрагменты антител, которые содержат идиотипы к белковому антигену, могут быть получены с помощью методов, известных в данной области, включая, но без ограничения: (i) F(ab')₂-фрагмент, полученный путем разложения пепсина молекулы антитела; (ii) Fab-фрагмент, генерированный путем восстановления дисульфидных мостиков F(ab')₂-фрагмента; (iii) Fab-фрагмент, генерированный путем обработки молекулы антитела папаином и восстанавливающим агентом, и (iv) Fv-фрагменты.

Изобретение также включает фрагменты Fv-, Fab-, Fab'- и F(ab')₂-фрагменты антитела к CD47, одноцепочечные антитела к CD47, однодоменные антитела (например, нанотела или VHH), биспецифические антитела к CD47 и гетероконъюгаты антител к CD47.

Биспецифическими антителами являются антитела, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере с двумя различными антигенами. В данном случае одной из таких специфичностей связывания является специфичность к CD47. Второй мишенью связывания является любой другой антиген, а предпочтительно белок клеточной поверхности, рецептор или субъединица рецептора.

Методы получения биспецифических антител известны в данной области. Традиционный метод рекомбинантного продуцирования биспецифических антител основан на коэкспрессии двух пар тяжелых цепей/легкая цепь иммуноглобулина, где две тяжелые цепи обладают различными специфичностями (Milstein and Cuello, Nature, 305:537-539(1983)).

В результате случайной реаранжировки тяжелых и легких цепей иммуноглобулина эти гибридомы (квадромы) продуцируют смесь из десяти возможных различных молекул антитела, из которых только одна имеет правильную биспецифическую структуру. Очистку такой "правильной" молекулы обычно осуществляют путем проведения постадийной аффинной хроматографии. Аналогичные процедуры описаны в заявке WO 93/08829, опубликованной 13 мая 1993 года, и в работе Trautnecker et al., EMBO J., 10:3655-3659(1991).

Вариабельные домены антитела, обладающие нужной специфичностью связывания (имеющие сайты связывания с антигеном) могут быть присоединены к последовательностям константного домена иммуноглобулина. Такой гибрид предпочтительно имеет константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий по меньшей мере часть шарнирной области, CH2-области и CH3-области. При этом предпочтительно, чтобы по меньшей мере в одном из гибридов присутствовала первая константная область тяжелой цепи (CH1), содержащая сайт, необходимый для связывания с легкой цепью. ДНК, кодирующие гибриды тяжелых цепей иммуноглобулина и, если это необходимо, гибриды легких цепей иммуноглобулина, встраивают в отдельные экспрессионные векторы, и котрансфицируют в подходящий организм хозяина. Более подробное описание получения биспецифических антител можно найти, например, в публикации Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

В соответствии с другим подходом, описанным в WO 96/27011, пограничная область между парой молекул антител может быть сконструирована в целях максимального увеличения процента содержания гетеродимеров, которые выделяют из рекомбинантной клеточной культуры. Предпочтительная пограничная область содержит по меньшей мере часть CH3-области константного домена антитела. В этом методе одну или несколько небольших аминокислот боковых цепей в пограничной области молекулы первого антитела заменяют более крупными аминокислотами боковых цепей (например, тирозином или триптофаном). Компенсирующие "полости" идентичного или аналогичного размера для крупной боковой цепи(ей) создают на пограничной области второй молекулы антитела путем замены крупных аминокислот боковых цепей более мелкими аминокислотами (например, аланином или треонином). Такая замена обеспечивает механизм увеличения выхода гетеродимеров по отношению к выходам других нежелательных побочных продуктов, таких как гомодимеры.

Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или их фрагментов (например, F(ab')₂-фрагментов биспецифических антител). Методы получения биспецифических антител из фрагментов антител описаны в литературе. Так, например, биспецифические антитела могут быть получены посредством химического связывания. В работе Brennan et al., Science 229:81 (1985) описана процедура протеолитического расщепления интактных антител с получением F(ab')₂-фрагментов. Эти фрагменты восстанавливают в присутствии агента, образующего комплексы с дитиолом, а именно арсенита натрия, для стабилизации соседних дитиолов и для предотвращения образования межмолеку-

лярных дисульфидных связей. Затем полученные Fab'-фрагменты превращают в тионитробензоатные (TNB) производные. После этого одно из производных Fab'-TNB снова превращают в Fab'-тиол путем восстановления меркаптоэтиламинном и смешивают с эквимоллярным количеством другого производного Fab'-TNB, в результате чего получают биспецифическое антитело. Полученные биспецифические антитела могут быть использованы в качестве агентов для селективной иммобилизации ферментов.

Кроме того, Fab'-фрагменты могут быть непосредственно выделены из *E. Coli* и подвергнуты химическому связыванию с образованием биспецифических антител. В публикации Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) описано продуцирование полностью гуманизированной молекулы F(ab')₂-фрагмента биспецифического антитела. Каждый Fab'-фрагмент был отдельно секретирован из *E. Coli* и подвергнут непосредственному химическому связыванию *in vitro* с образованием биспецифического антитела. Полученное таким образом биспецифическое антитело обладает способностью связываться с клетками, сверхэкспрессирующими рецептор ErbB₂ и с нормальными человеческими Т-клетками, а также способностью индуцировать литическую активность человеческих цитотоксических лимфоцитов, направленную против опухоли-мишени молочной железы человека.

Были также описаны различные методы получения и выделения биспецифических фрагментов антител непосредственно из рекомбинантной клеточной культуры. Например, биспецифические антитела были продуцированы с использованием "лейциновых молний". Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Пептиды "лейциновой молнии" белков Fos и Jun были присоединены к Fab'-фрагментам двух различных антител путем лигирования их генов. Гомодимеры антитела были восстановлены в шарнирной области с образованием мономеров, а затем снова окислены с образованием гетеродимеров антител. Этот метод может быть также применен для продуцирования гомодимеров антител. Техника "диантител", описанная Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), представляет собой альтернативный метод получения фрагментов биспецифических антител. Эти фрагменты содержат вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), присоединенный к вариабельному домену легкой цепи (V_L) посредством линкера, который является лишком коротким для образования пары между двумя доменами на одной и той же цепи. В соответствии с этим домены V_H и V_L одного фрагмента вынуждены спариваться с комплементарными доменами V_H и V_L другого фрагмента и, тем самым, образовывать два антигенсвязывающих сайта. Была также описана и другая стратегия получения фрагментов биспецифических антител, предусматривающая использование одноцепочечных Fv(sFv)-димеров. См. Gruber et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

Рассматриваются также антитела, имеющие более чем две валентности. Так, например, могут быть получены триспецифические антитела. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Репрезентативные биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами, по меньшей мере один из которых присутствует в антигене белка согласно изобретению. Альтернативно, антигенсвязывающий домен молекулы иммуноглобулина может быть присоединен к домену, который связывается со стимулирующей молекулой на лейкоцитах, такой как молекула Т-клеточного рецептора (например, CD2, CD3, CD28 или B7), или с Fc-рецепторами IgG (FcγR), такими как FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), так, чтобы их механизм клеточной защиты был направлен на клетки, экспрессирующие конкретный антиген. Биспецифические антитела могут быть также использованы для направления цитотоксических агентов на клетки, которые экспрессируют конкретный антиген. Эти антитела имеют антигенсвязывающий домен и домен, который связывается с цитотоксическим агентом или с агентом, образующим хелатный комплекс с радионуклидом, таким как EOTUBE, DPTA, DOTA или TE-TA. Другое представляющее интерес биспецифическое антитело связывается с описанным здесь антигеном белка, а также связывается с тканевым фактором (TF).

Гетероконъюгированные антитела также входят в объем настоящего изобретения. Гетероконъюгированные антитела состоят из двух ковалентно связанных антител. Такие антитела используются, например, для направления клеток иммунной системы на нежелательные клетки (см. патент США № 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекций (смотри WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Предполагается, что такие антитела могут быть получены *in vitro* известными методами химического синтеза белков, включая методы с использованием перекрестносшивающих агентов. Так, например, иммунотоксины могут быть сконструированы путем проведения реакций дисульфидного обмена или образования тиоэфирной связи. Примерами реагентов, подходящих для этих целей, являются имиотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат, и реагенты, описанные, например, в патенте США № 4676980.

Может быть желательной модификация антитела согласно изобретению в отношении эффекторной функции, например, таким образом, чтобы усилить эффективность антитела при лечении заболеваний и нарушений, связанных с aberrантной передачей сигнала CD47. Например, остаток цистеина (остатки цистеина) может быть введен в Fc-область, что делает возможным образование между цепями дисульфидной связи в этой области. Полученное таким образом гомодимерное антитело может иметь улучшенную способность интернализации и/или увеличенное комплемент-опосредованное уничтожение клеток и антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) (см. Caron et al., *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 (1992) and Shopes, *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992)). Альтернативно, может быть сконструировано ан-

титело, которое имеет двойные Fc-области и может посредством этого иметь повышенный лизис комплекса и эффективности ADCC (см. Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230(1989)).

Изобретение также относится к иммуноконъюгатам, содержащим антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом, таким как токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, или его фрагменты), или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат).

Ферментативно активными токсинами и их фрагментами, которые могут быть использованы, являются А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (от *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модела, α -сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантины, белки фитолакки американской (*Phytolacca Americana*) (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены. Для продуцирования антител, конъюгированных с радионуклидом, могут быть использованы различные известные радионуклиды. Примерами являются ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y и ^{186}Re .

Конъюгаты антител и цитотоксических агентов получают с использованием различных бифункциональных белок-связывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметилдипимидат-HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидо-соединения (такие как бис(пара-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис(пара-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные фторсодержащие соединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин риксин может быть получен, как описано в работе Vitetta et al., *Science* 238: 1098 (1987). Репрезентативным хелатообразующим агентом для конъюгирования радионуклида с антителом является C^{14} -меченная 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилен-триаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) (см. WO 94/11026).

Специалистам в данной области известно, что к полученным антителам согласно изобретению могут быть присоединены различные молекулы широкого ряда (см., например, "Conjugate Vaccines", *Contributions to Microbiology and Immunology*, J.M. Cruse and R.E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), полное содержание которых включено здесь путем отсылки).

Присоединение осуществляют посредством любой химической реакции связывания двух молекул, при условии, что указанное антитело и другая молекула будут сохранять свою активность. Такое связывание может происходить посредством многих химических механизмов, например посредством ковалентного связывания, аффинного связывания, интеркаляции, координированного связывания и образования комплексов. Однако предпочтительным связыванием является ковалентное связывание. Ковалентное связывание осуществляют либо путем прямой конденсации имеющихся боковых цепей, либо путем включения внешних молекул, образующих мостиковые связи. Для присоединения молекул белка, например антител согласно изобретению, к другим молекулам может быть использовано множество двухвалентных и поливалентных связывающих агентов. Например, репрезентативными связывающими агентами могут быть органические соединения, такие как тиоэфиры, карбодиимиды, сукцинимидо-эфиры, диизоцианаты, глутаральдегид, диазобензолы и гексаметилендиамины. Этот список не является исчерпывающим списком связывающих агентов различных классов, известных в данной области, а просто включает примеры наиболее часто используемых связывающих агентов (см. Killen and Lindstrom, *Jour. Immun.* 133:1335-2549 (1984); Jansen et al., *Immunological Reviews* 62:185-216 (1982); и Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987)).

Предпочтительные линкеры описаны в литературе (см. например, Ramakrishnan S. et al., *Cancer Res.* 44:201-208 (1984), где описано использование MBS (М-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидоэфира). См. также патент США № 5030719, где описано использование галогенированного производного ацетилгидразида, присоединенного к антителу посредством олигопептидного линкера. Наиболее предпочтительными линкерами являются: EDC (гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида; (ii) SMPT (4-сукцинимидилоксикарбонил- α -метил- α -(2-пиридилдитио)толуол (Pierce Chem. Co., номер по каталогу 21558G); (iii) SPDP (сукцинимидил-6-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]гексаноат (Pierce Chem. Co., номер по каталогу 21651G); (iv) сульфо-LC-SPDP (сульфосукцинимидил-6-[3-(2-пиридилдитио)пропионамид] гексаноат (Pierce Chem. Co. Номер по каталогу. 2165-G); и (v) сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид; Pierce Chem. Co., номер по каталогу 24510), конъюгированные с EDC.

Описанные выше линкеры содержат компоненты, которые имеют различные признаки, позволяющие получать конъюгаты с различными физико-химическими свойствами. Например, сульфо-NHS-эфиры алкилкарбоксилатов являются более стабильными, чем сульфо-NHS-эфиры ароматических карбоксилатов. Линкеры, содержащие NHS-эфир, являются менее растворимыми, чем линкеры, содержащие сульфо-NHS-эфиры. Кроме того, указанный линкер SMPT содержит стерически затрудненную дисульфидную связь и может образовывать конъюгаты с более высокой стабильностью. Дисульфидные связи обычно являются менее стабильными, чем другие связи, поскольку дисульфидная связь расщепляется in

vitro, что приводит к образованию менее доступного конъюгата. В частности, сульфо-NHS может повышать стабильность карбодиимидных связей. Карбодиимидные связи (такие как EDC), если они используются в сочетании с сульфо-NHS, образуют сложные эфиры, которые являются более резистентными к гидролизу, чем связи, полученным только посредством реакции карбодиимидного связывания.

Антитела, описанные здесь, можно также формулировать в виде иммунолипосом. Липосомы, содержащие антитело, получают способами, известными в данной области, например такими, которые описаны в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); и патентах США № 4485045 и 4544545. В патенте США № 5013556 раскрыты липосомы с повышенным временем циркуляции.

Особенно пригодные липосомы можно получить обратнотазовым выпариванием с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и PEG-derivатизированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE). Липосомы пропускают через фильтры с определенным размером пор с получением липосом с желаемым диаметром. Фрагменты Fab' антитела согласно настоящему изобретению можно конъюгировать с липосомами, как описано Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982), посредством реакции дисульфидного обмена.

Применение антител против CD47.

Следует отметить, что терапевтические средства согласно изобретению могут быть введены вместе с подходящими носителями, наполнителями и другими средствами, включенными в данные препараты для улучшения их переноса и доставки, и повышения толерантности и т.п. Химикам-фармацевтам известны различные фармацевтические препараты, которые можно найти в известном реестре лекарственных средств: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), в частности, в гл. 87, Blaug, Seymour. Такими препаратами являются, например, порошки, пасты, мази, гели, воски, масла, липиды, везикулы, содержащие липиды (катионогенные или анионогенные) (такие как Lipofectin™), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии типа "масло-в-воде" и "вода-в-масле", эмульсионный карбовакс (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Для лечения и терапии согласно изобретению могут быть использованы любые вышеупомянутые смеси при условии, что активный ингредиент в данной композиции не будет инактивироваться, и что данная композиция будет физиологически совместимой и будет хорошо переноситься при выбранном способе введения. См. также публикации Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein Pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman W.N. "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J. Pharm. Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J. Pharm. Sci. Technol. 52:238-311 (1998) и указанную в них дополнительную информацию, относящуюся к лекарственным препаратам, наполнителям и носителям, хорошо известным химикам-фармацевтам.

В одном варианте осуществления антитела согласно изобретению, которые включают моноклональное антитело согласно изобретению, могут применяться в качестве терапевтических агентов. Такие агенты, как правило, применяются для диагностики, прогнозирования, мониторинга, лечения, ослабления и/или предупреждения заболевания или патологии, связанной с нарушенной экспрессией, активностью и/или передачей сигнала CD47 у субъекта. Терапевтический режим осуществляют стандартными методами путем идентификации субъекта, например пациента-человека, страдающего (или имеющего риск развития) заболеванием или нарушением, связанным с нарушенной экспрессией, активностью и/или передачей сигнала CD47, например раком или другим неопластическим нарушением. Препарат антитела, предпочтительно антитела, обладающего высокой специфичностью и высокой аффинностью к его целевому антигену, вводят субъекту, в результате чего достигается эффект благодаря связыванию антитела с мишенью. Введение антитела может подавлять или ингибировать, или препятствовать экспрессии, активности и/или сигнальной функции мишени (например, CD47). Введение антитела может подавлять или ингибировать, или препятствовать связыванию мишени (например, CD47) с эндогенным лигандом (например, SIRPα), с которым он естественным образом связывается. Например, антитело связывается с мишенью и модулирует, блокирует, ингибирует, уменьшает, вызывает антагонизм, нейтрализует или иным образом препятствует экспрессии, активности и/или передаче сигнала CD47.

Заболевания или нарушения, связанные с нарушенной экспрессией, активностью и/или передачей сигнала CD47, включают, в качестве неограничивающего примера, гематологическую злокачественную опухоль и/или солидные опухоли. Гематологические злокачественные опухоли включают, например, лейкоз, лимфому и миелому. Некоторые формы лейкоза включают, в качестве неограничивающего примера, острый лимфоцитарный лейкоз (ALL); хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); хронический миелогенный лейкоз (CML); миелопролиферативные нарушения/злокачественные опухоли (MPDS); и миелодиспластический синдром. Некоторые формы лимфомы включают, в качестве неограничивающего примера, лимфому Ходжкина, индолентную и агрессивную неходжкинскую лимфому, лимфому Буркетта и фолликулярную лимфому (мелкоклеточную и крупноклеточную). Некоторые формы миеломы включают, в качестве неограничивающего примера, множественную миелому (MM), гигантоклеточную

миелому, миелому тяжелых цепей и миелому легких цепей или миелому Бенс-Джонса. Солидные опухоли включают, например, опухоли молочной железы, опухоли яичника, опухоли легких, опухоли поджелудочной железы, опухоли предстательной железы, опухоли меланомы, колоректальные опухоли, опухоли легкого, опухоли головы и шеи, опухоли мочевого пузыря, опухоли пищевода, опухоли печени и опухоли почек.

Симптомы, связанные с раком и другими неопластическими нарушениями, включают, например, воспаление, повышенную температуру, общее недомогание, озноб, боль, часто локализованную в области воспаления, потерю аппетита, потерю веса, отеку, головную боль, утомляемость, высыпания, анемию, мышечную слабость, мышечное утомление и абдоминальные симптомы, такие как, например, боль в животе, диарея или констипация.

Терапевтически эффективное количество антитела согласно изобретению относится, как правило, к количеству, необходимому для достижения терапевтической цели. Как отмечалось выше, указанная цель может представлять собой связывающее взаимодействие между антителом и его целевым антигеном, который, в определенных случаях, препятствует функционированию мишени. Необходимое для введения количество будет зависеть, кроме того, от аффинности связывания антитела с его специфическим антигеном, а также будет зависеть от скорости, при которой введенное антитело истощается из свободного объема другого субъекта, которому оно было введено. Типичный диапазон терапевтически эффективных доз антитела или фрагмента антитела согласно изобретению может составлять, в качестве неограничивающего примера, от около 0,1 мг/кг массы тела до около 100 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления антитело согласно изобретению вводят субъекту в дозе 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100 мг/кг или выше. Типичная частота введения доз может изменяться, например, от введения двух раз в день до одного раза в неделю.

Эффективность лечения определяют любым известным способом диагностики или лечения конкретного связанного с воспалением нарушения. Ослабление одного или более симптомов связанного с воспалением нарушения указывает на то, что антитело является клинически полезным.

Методы скрининга на антитела, которые обладают желательной специфичностью, включают, но без ограничения, ферментативный иммуносорбентный анализ (ELISA) и другие иммунологические анализы, известные в данной области.

В другом варианте осуществления антитела, направленные против CD47, можно использовать методами, известными в данной области, которые относятся к определению местоположения и/или количественному определению CD47 (например, для использования в измерении уровней CD47 и/или как CD47, так и SIRPα в подходящих физиологических образцах, для использования в диагностических методах, для использования в визуализации белка и т.п.). В данном варианте осуществления антитела, специфические к CD47, или их производные, фрагменты, аналоги или гомологи, которые содержат антигенсвязывающий домен антигена, используются в качестве фармакологически активных соединений (называемых здесь как "терапевтические средства").

В другом варианте осуществления антитело, специфическое к CD47, можно использовать для выделения полипептида CD47 с использованием обычных методов, таких как иммуноаффинная хроматография или иммунопреципитация. Антитела, направленные против белка CD47 (или их фрагменты), можно использовать в диагностических целях для определения уровней белка в ткани в качестве составной части процедуры клинического тестирования, например для определения эффективности конкретной схемы лечения. Детектирование можно облегчить сочетанием антитела (т.е. физическим связыванием) с детектируемым соединением. Примеры детектируемых соединений включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества, биолюминесцентные вещества и радиоактивные вещества. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих простетических групп-комплексов включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных веществ включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлоротриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; примеры люминесцентного вещества включают люминол; примеры биолюминесцентных веществ включают люциферазу, люциферин и экворин; и примеры подходящих радиоактивных веществ включают ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S или ^3H .

В еще другом варианте осуществления антитело в соответствии с изобретением можно использовать в качестве агента для детекции присутствия CD47 и/или обоих, белка CD47 и SIRPα (или его белкового фрагмента) в образце. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит детектируемую метку. Антитела могут быть поликлональными или, более предпочтительно, моноклональными. Можно использовать интактное антитело или его фрагмент (например, Fab, scFv или F(ab')₂). Полагают, что термин "меченый" относительно зонда или антитела охватывает прямое мечение зонда или антитела путем связывания (т.е. физического соединения) детектируемого вещества с зондом или антителом, также как непрямое мечение зонда или антитела в помощь взаимодействия с другим реагентом, который непосредственно метят. Примеры непрямого мечения включают детектирование первичного антитела, используя флуоресцентно-меченное вторичное антитело и меченый на конце ДНК-зонд с биотином, так что

он может быть детектирован флуоресцентно-меченным стрептавидином. Термин "биологический образец" включает ткани, клетки и биологические жидкости, выделенные у субъекта, а также ткани, клетки и жидкости, присутствующие у субъекта. Таким образом, в термин "биологический образец" включена кровь и фракция или компонент крови, включая сыворотку крови, плазму крови или лимфу. Таким образом, способ детектирования согласно изобретению можно использовать для детектирования маркерной мРНК, белка или геномной ДНК в биологическом образце *in vitro*, а также *in vivo*. Например, методы *in vitro* для детектирования маркерной мРНК включают Нозерн-гибридизации и гибридизации *in situ*. Методы *in vitro* для детектирования маркерного белка включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию и иммунофлуоресценцию. Методы *in vitro* для детектирования маркерной геномной ДНК включают Саузерн-гибридизацию. Процедуры для выполнения иммуноанализов описаны, например, в "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J.R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; and "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Кроме того, методы *in vivo* для детектирования маркерного белка включают введение субъекту меченого антимаркерного антитела. Например, антитело может быть мечено радиоактивным маркером, присутствие которого и местоположение у субъекта можно детектировать с помощью стандартных методов визуализации.

Терапевтическое введение и композиции антител к CD47.

Антитела согласно изобретению (также называемые здесь как "активные соединения"), а также их производные, фрагменты, аналоги и гомологи могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Принципы и обсуждения, связанные с получением таких композиций, а также руководство по выбору компонентов можно найти, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences: The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; и Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

Такие композиции обычно содержат антитело и фармацевтически приемлемый носитель. При использовании фрагментов антитела наименьший ингибирующий фрагмент, который специфически связывается со связывающим доменом целевого белка, является предпочтительным. Например, на основании последовательностей варибельной области антитела можно сконструировать пептидные молекулы, сохраняющие способность связывать с белковую последовательность-мишень. Такие пептиды можно синтезировать химически и/или получать методами рекомбинантной ДНК (см., например, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)).

Используемый здесь термин "фармацевтически приемлемый носитель" подразумевает любые и все растворители, дисперсионные среды, оболочки, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и им подобные, совместимые с фармацевтическим введением. Подходящие носители описаны в основном в последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартном тексте в данной области, который включен здесь путем отсылки. Предпочтительные примеры таких носителей или разбавителей включают, но без ограничения, воду, солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% человеческий сывороточный альбумин. Липосомы и неводные носители, такие как нелетучие масла, также могут быть использованы. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. Кроме случаев, когда любая типичная среда или агент является несовместимым с активным соединением, его применение в композициях подлежит рассмотрению.

Композиции, которые подлежат введению *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко осуществляется путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны.

Фармацевтическую композицию согласно изобретению готовят таким образом, чтобы она была совместимой с предполагаемым способом введения. Примеры способов введения включают в себя парентеральное, например внутривенное, интрадермальное, подкожное, пероральное (например, ингаляцией), трансдермальное (т.е. местное), трансмукозальное и ректальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, интрадермального или подкожного применения, могут включать в себя следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, солевой раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатообразующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для коррекции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Значение pH можно регулировать с помощью кислот или щелочей, таких соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы, изготовленные из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, подходящие для применения путем инъекции, включают в себя стерильные водные растворы (если компоненты являются водорастворимыми) или дисперсии и стериль-

ные порошки для непредусмотренного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Для внутривенного введения подходящие носители включают в себя физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) или забуференный фосфатом солевой раствор (PBS). Во всех случаях эта композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко ввести шприцем. Она должна быть стабильной в условиях приготовления и хранения, и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащая текучесть может, например, поддерживаться посредством применения покрытия, такого как лецитин, поддержанием требуемого размера частиц в случае дисперсии и использованием поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с использованием различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимерозала и т.п. Во многих случаях может оказаться целесообразным включение в композицию агентов для придания изотоничности, например, сахаров, полиспиртов, таких как манит, сорбит, хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть вызвано включением в композицию агента, который задерживает всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъекционные растворы могут быть приготовлены путем включения активного соединения в требуемом количестве в подходящем растворителе с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов из перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит базовую дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов способами приготовления являются вакуумная сушка и лиофилизация, которые дают порошок активного ингредиента плюс любого дополнительного желаемого ингредиента из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Пероральные композиции обычно включают в себя инертный разбавитель или годный в пищу носитель. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы или спрессованы в таблетки. Для перорального терапевтического введения активное соединение может быть объединено со вспомогательными веществами и использовано в форме таблеток, пастилок или капсул. Пероральные композиции могут быть также приготовлены в жидком носителе для применения в виде жидкости для полоскания рта, где это соединение в жидком носителе применяют перорально и прополаскивают рот и соединение сплевывают или проглатывают. Фармацевтически совместимые связывающие агенты и/или вспомогательные вещества могут быть включены в виде части композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и т.п. могут содержать любые из следующих ингредиентов или соединений сходного характера: связывающее вещество, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагантовая камедь или желатин; вспомогательные вещества, такие как крахмал или лактоза; дезинтегрирующий агент, такой как альгиновая кислота, Примогель или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или Sterotes; скользящий агент, такой как коллоидный диоксид кремния; подслащивающий агент, такой как сахароза или сахарин; или ароматизирующий агент, такой как мята перечная, метилсалицилат или апельсиновая отдушка.

Для введения ингаляцией эти соединения доставляются в форме аэрозольного спрея из находящегося под давлением контейнера или диспенсера, который содержит подходящий пропеллент, например газ, такой как диоксид углерода, или распылителя.

Системное введение может выполняться также с использованием трансмукозальных или трансдермальных средств. Для трансмукозального или трансдермального введения в лекарственной форме используют пенетранты, пригодные для барьера, через который композиции должны проникнуть. Такие пенетранты обычно известны в данной области и включают в себя, например, для трансмукозального введения, детергенты, соли желчных кислот и производные фусидовой кислоты. Трансмуккозальное введение может выполняться с использованием спреев для носа или суппозитория. Для трансдермального введения активные соединения готовят в виде мазей, целебных мазей, гелей или кремов, обычно известных в данной области.

Соединения также могут быть приготовлены в форме суппозитория (например, с общепринятыми основами для суппозитория, такими как масло какао и другие глицериды) или удерживающей клизмы для ректальной доставки.

В одном варианте осуществления активное соединение готовят с носителями, которые будут защищать это соединение против быстрого выведения из организма, например композиция с замедленным/контролируемым высвобождением, в том числе имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы изготовления таких композиций будут очевидными для специалистов в данной области.

Например, активные ингредиенты могут быть заключены в микрокапсулы, изготовленные, например, при помощи методик коацервации или межфазной полимеризации, например гидроксиметилцеллю-

лозные или желатиновые микрокапсулы и полиметилметакрилатные микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и нанокapsулах) или в макроэмульсиях.

Могут быть изготовлены препараты замедленного высвобождения. Подходящие примеры препаратов замедленного высвобождения включают полупроницаемые основы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, эти основы изготовлены в виде сформированных предметов, например пленок или микрокапсул. Примеры основ для замедленного высвобождения включают полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поливиниловый спирт), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутамовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной и гликолевой кислот, такие как LUPRON DEPOT (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислот и ацетата лейпролида), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота. Несмотря на то что полимеры, такие как этиленвинилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота обеспечивают высвобождение молекул в течение 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки за более короткие периоды времени.

Материалы могут быть также получены коммерческим путем от фирмы Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомальные суспензии (включая липосомы, нацеленные на инфицированные клетки с моноклональными антителами к вирусным антигенам) также могут быть использованы в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области, например, описанными в патенте США № 4522811.

Особенно предпочтительно формулирование пероральных и парентеральных композиций в виде стандартной лекарственной формы для более легкого введения и равномерности дозирования. Стандартная лекарственная форма, используемая здесь, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве однократных доз для субъекта, подлежащего лечению; каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Состав стандартных лекарственных форм согласно изобретению продиктован и напрямую зависит от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и ограничений, характерных в области составления такого активного соединения для лечения индивидуумов.

Фармацевтические композиции могут быть заключены в контейнер, упаковку или диспенсер вместе с инструкциями по введению.

Композиция может также содержать более одного активного соединения, в случае необходимости для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно, соединения с комплементарными активностями, не оказывающими вредного действия друг на друга. Альтернативно или дополнительно композиция может содержать агент, который усиливает ее функцию, такой как, например, цитотоксический агент, цитокин, химиотерапевтический агент или агент, ингибирующий рост. Такие молекулы подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для предназначенной цели.

В одном варианте осуществления активные соединения вводят в виде комбинированной терапии, т.е. в сочетании с другими агентами, например терапевтическими агентами, которые применяются для лечения патологических состояний или нарушений, таких как различные формы рака, аутоиммунные нарушения и воспалительные заболевания. Термин "в сочетании" в данном контексте означает, что агенты вводят, по существу, в одно и то же время либо одновременно, либо последовательно. При последовательном введении на момент введения второго соединения первое из двух соединений предпочтительно все еще является обнаруживаемым в эффективных концентрациях в участке лечения.

Например, комбинированная терапия может включать одно или несколько антител согласно изобретению, совместно формулированных и/или совместно вводимых с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, например одним или несколькими цитокинами и ингибиторами фактора роста, иммуносупрессорами, противовоспалительными агентами, ингибиторами метаболизма, ингибиторами ферментов и/или цитотоксическими или цитостатическими агентами, как описано более подробно ниже. Такие комбинированные терапии могут успешно использовать более низкие дозировки вводимых терапевтических агентов, таким образом, избегая возможных вариантов токсичности или осложнений, ассоциированных с различными видами монотерапии.

Предпочтительные терапевтические агенты, используемые в сочетании с антителом согласно изобретению, представляют собой такие агенты, которые препятствуют воспалительному ответу на разных стадиях. В одном варианте осуществления одно или несколько антител, описанных здесь, может составляться в общий препарат и/или вводиться совместно с одним или несколькими дополнительными агентами, например с другими антагонистами цитокинов или факторов роста (например, растворимыми рецепторами, ингибиторами пептидов, малыми молекулами, слитыми белками с лигандами); или с антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, которые связываются с другими мишенями (например, антителами, которые связываются с другими цитокинами или факторами роста, их рецепторами или другими молекулами клеточной поверхности); и противовоспалительными цитокинами или их агонистами.

В других вариантах осуществления антитела согласно изобретению применяют в качестве вакцин-

ных адъювантов против аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний и т.д. Комбинации адъювантов для лечения данных типов нарушений подходят для применения в сочетании с разнообразными антигенами из аутоантигенов-мишеней, например аутоантигенов, участвующих в аутоиммунитете, например, из основного белка миелина; провоспалительных аутоантигенов, например, из белка амилоидного пептида, или антигенов трансплантата, например аллоантигенов. Антиген может включать в себя пептиды или полипептиды, полученные из белков, а также фрагменты любого из следующих соединений: сахараиды, белки, полинуклеотиды или олигонуклеотиды, аутоантигены, белок амилоидного пептида, антигены трансплантата, аллергены или другие макромолекулярные компоненты. В некоторых случаях в антигенную композицию включают более одного антигена.

Разработка и получение других терапевтических средств.

В соответствии с настоящим изобретением и исходя из активности антител, которые были продуцированы и охарактеризованы в настоящем документе в отношении CD47, помимо способов с использованием фрагментов антител, могут быть легко разработаны и другие терапевтические способы. Такими способами являются, но без ограничения, улучшенные терапевтические методы с применением антитела, таких как биспецифические антитела, иммунотоксины и радиоактивно меченные терапевтические средства, методы получения пептидных терапевтических средств, методы генотерапии, в частности, методы с применением телец включения, антисмысловых терапевтических молекул и малых молекул.

Например, что касается биспецифических антител, то могут быть получены биспецифические антитела, которые включают (i) два антитела, одно из которых обладает специфичностью к CD47, а другое обладает специфичностью ко второй молекуле, где указанные два антитела являются конъюгированными, (ii) одно антитело, которое имеет одну цепь, специфическую в отношении CD47, и вторую цепь, специфическую в отношении второй молекулы, или (iii) одноцепочечное антитело, которое обладает специфичностью в отношении CD47 и второй молекулы. Такие биспецифические антитела получают методами, хорошо известными специалистам, например получение антител по пунктам (i) и (ii) описано, например, Fanger et al. *Immunol Methods* 4:72-81 (1994) и Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992), и получение антитела по пункту (iii) описано, например, Trautnecker et al. *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992).

Что касается иммунотоксинов, то путем модификации методами, хорошо известными в данной области, могут быть получены антитела, которые действуют как иммунотоксины. См., например, Vitetta *Immunol. Today* 14:252 (1993). См. также патент США № 5194594. Что касается радиоактивно меченных антител, то такие модифицированные антитела также могут быть легко получены методами, хорошо известными в данной области. см. например, Junghans et al. in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2d edition, Chaffer and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). См. также патенты США № 4681581, 4735210, 5101827, 5102990 (RE 35500), 5648471 и 5697902. Каждый из иммунотоксинов и каждая из радиоактивно меченных молекул, вероятно, будут разрушать клетки, экспрессирующие CD47.

Что касается генерирования терапевтических пептидов, то с использованием информации о структуре молекулы CD47 и антител против этой молекулы, таких как антитела согласно изобретению, или с применением скрининга пептидных библиотек могут быть получены терапевтические пептиды против CD47. Получение и скрининг пептидных терапевтических средств обсуждается в публикациях Houghten et al. *Biotechniques* 13:412-421 (1992), Houghten *PNAS USA* 82:5131-5135 (1985), Pinalla et al. *Biotechniques* 13:901-905 (1992), Blake and Litzi-Davis *BioConjugate Chem.* 3:510-513 (1992). Иммунотоксины и радиоактивно меченные молекулы могут быть также получены способом, аналогичным способу получения пептидных молекул, обсуждаемых выше для получения антител. Если предположить, что молекула CD47 (или ее форма, такая как вариант сплайсинга или альтернативная форма) является функционально активной при данном заболевании, то может быть также сконструирован ген или его антисмысловые терапевтические последовательности с применением стандартных методов. Такие методы могут быть осуществлены для модулирования функции CD47. В соответствии с этим с помощью антител согласно настоящему изобретению могут быть легко разработаны и применены функциональные анализы, связанные с применением этих антител. Протоколы и стратегия получения антисмысловых терапевтических последовательностей подробно обсуждаются в Международной заявке на патент № WO 94/29444. Протоколы и стратегии проведения генотерапии хорошо известны специалистам. Однако, в частности, было подтверждено, что особенно предпочтительными являются методы генотерапии, включающие использование телец включения. см., например, Human Gene Therapy 5:595-601 (1994) и Marasco Gene Therapy 4:11-15 (1997). Общие протоколы и обсуждение методов генотерапии можно найти в Международной заявке на патент № WO 97/38137.

Информация о структуре молекулы CD47 и ее взаимодействиях с другими молекулами в соответствии с настоящим изобретением, такими как SIRP α , и/или антителами согласно изобретению, такими как антитела согласно изобретению и т.п., может быть использована для рациональной разработки других терапевтических методов. В этой связи, рациональные методы разработки лекарственных средств, такие как рентгеновская кристаллография, компьютерное (или с применением компьютера) молекулярное моделирование (CAMM), установление количественной или качественной взаимосвязи "структура-активность" (QSAR), и аналогичные методы могут быть направлены на обнаружение новых лекарствен-

ных средств. Рациональный план исследований позволяет предсказывать структуры белков или синтетических молекул, способных взаимодействовать с данной молекулой или ее конкретными формами, которые могут быть использованы для модификации или модулирования активности IL-6Rc. Такие структуры могут быть химически синтезированы или экспрессированы в биологических системах. Такой подход описан в публикации в Capsey et al. *Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs* (Stockton Press, NY (1988)). Кроме того, могут быть сконструированы и синтезированы комбинаторные библиотеки, и такие библиотеки могут быть использованы в программах скрининга, таких как высокоэффективный скрининг.

Способы скрининга.

В изобретении предлагаются способы (также называемые здесь как "скрининговые анализы") для идентификации модуляторов, т.е. соединений-кандидатов или тестируемых соединений или агентов (например, пептидов, пептидомиметиков, малых молекул или других лекарственных средств), которые модулируют или иным образом препятствуют связыванию CD47 с SIRP α , или соединений-кандидатов или тестируемых соединений, или агентов, которые модулируют или иным образом препятствуют сигнальной функции CD47 и/или CD47-SIRP α . Кроме того, предлагаются способы идентификации соединений, которые применяются для лечения заболеваний, связанных с нарушенной экспрессией, активностью и/или передачей сигнала CD47 и/или CD47-SIRP α . Способы скрининга могут включать способы, известные или используемые в данной области, или способы, описанные в настоящем документе. Например, CD47 можно иммобилизовать на микротитровальном планшете и инкубировать с кандидатным или тестируемым соединением, например антителом к CD47, в присутствии SIRP α . Затем связанный SIRP α можно детектировать с использованием вторичного антитела, и поглощение можно детектировать на планшетном ридере.

Также предлагаются способы идентификации соединений, способных стимулировать фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами. Эти способы могут включать способы, известные или используемые в данной области, или способы, описанные в настоящем документе. Например, макрофаги инкубируют с мечеными опухолевыми клетками в присутствии кандидатного соединения, например, антитела к CD47. Через некоторый период времени макрофаги можно наблюдать в отношении интернализации опухолевой метки для идентификации фагоцитоза. Дополнительная подробная информация, касающаяся этих способов, например анализы блокирования SIRP α и анализы фагоцитоза, представлена в примерах.

Изобретение также включает соединения, идентифицированные в скрининговых анализах, описанных в настоящем документе.

В одном варианте осуществления в изобретении предлагаются анализы для скрининга соединений-кандидатов или тестируемых соединений, которые модулируют сигнальную функцию CD47. Тестируемые соединения согласно изобретению могут быть получены с использованием любого из многочисленных подходов в методах комбинаторных библиотек, известных в данной области, включая биологические библиотеки; пространственно адресуемые библиотеки с параллельной твердой фазой или фазой раствора; методы синтетических библиотек, требующих деконволюции; метод библиотеки "одна гранула-одно соединение"; и синтетические методы библиотеки с использованием отбора аффинной хроматографией. Биологический библиотечный подход ограничивается библиотеками пептидов, в то время как другие четыре подхода применимы к пептидам, непептидному олигомеру или библиотекам малых молекул. (см., например, Lam, 1997. *Anticancer Drug Design* 12: 145).

Используемый здесь термин "малая молекула" обозначает композицию, которая имеет молекулярную массу менее чем около 5 кДа и наиболее предпочтительно менее чем около 4 кДа. Малые молекулы могут представлять собой, например, нуклиновые кислоты, пептиды, полипептиды, пептидомиметики, углеводы, липиды или другие органические или неорганические молекулы. Библиотеки химических и/или биологических смесей, таких как экстракты грибов, бактерий или водорослей, известны в данной области и могут подвергаться скринингу в любом из анализов согласно изобретению.

Примеры способов синтеза молекулярных библиотек можно найти в данной области, например, в DeWitt et al., 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6909; Erb et al., 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 11422; Zuckermann et al., 1994. *J. Med. Chem.* 37: 2678; Cho et al., 1993. *Science* 261: 1303; Carrell et al., 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carrell et al., 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; и Gallop et al., 1994. *J. Med. Chem.* 37: 1233.

Библиотеки соединений могут находиться в растворе (см., например, Houghten, 1992. *Biotechniques* 13: 412-421), или на гранулах (см. Lam, 1991. *Nature* 354: 82-84), на чипах (см. Fodor, 1993. *Nature* 364: 555-556), бактериях (см. патент США № 5223409), спорах (см. патент США № 5233409), плазмидах (см. Cull, et al., 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869) или на фарах (см. Scott and Smith, 1990. *Science* 249: 386-390; Devlin, 1990. *Science* 249: 404-406; Cwirla et al., 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 6378-6382; Felici, 1991. *J. Mol. Biol.* 222: 301-310; и патент США № 5233409).

В одном варианте осуществления соединение-кандидат вводят в комплекс антитело-антиген и определяют, разрушает ли соединение-кандидат комплекс антитело-антиген, при этом разрушение этого комплекса указывает на то, что соединение-кандидат модулирует сигнальную функцию CD47 и/или взаимодействие между CD47 и SIRP α . В другом варианте осуществления растворимый CD47 и/или оба бел-

ка, CD47 и SIRP α , согласно изобретению обеспечиваются и подвергаются воздействию, по меньшей мере, одного нейтрализующего моноклонального антитела. Детектируют образование комплекса антитело-антиген, и одно или более соединений-кандидатов вводят в комплекс. Если комплекс антитело-антиген разрушается после введения одного или нескольких соединений-кандидатов, то соединения-кандидаты являются подходящими для лечения заболеваний, связанных с нарушенной передачей сигнала CD47 и/или CD47-SIRP α .

Способность тестируемого соединения препятствовать или разрушать комплекс антитело-антиген можно определить, например, путем присоединения к тестируемому соединению радиоизотопа или ферментативной метки таким образом, что связывание тестируемого соединения с антигеном или его биологически активной частью можно определить путем детекции в комплексе меченого соединения. Например, тестируемые соединения могут быть прямо или косвенно помечены ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C или ^3H , и меченое радиоактивным изотопом тестируемое соединение обнаруживают прямым измерением радиоизлучения или подсчетом сцинтилляций. Альтернативно, тестируемые соединения могут быть помечены ферментом, например, пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой или люциферазой, и ферментную метку выявляют по превращению соответствующего субстрата в продукт.

В одном варианте осуществления анализ предусматривает приведение в контакт комплекса антитело-антиген с тестируемым соединением и измерение способности тестируемого соединения взаимодействовать с антигеном или иным образом разрушать существующий комплекс антитело-антиген. В этом варианте осуществления определение способности тестируемого соединения взаимодействовать с антигеном и/или разрушать комплекс антитело-антиген предусматривает определение способности тестируемого соединения избирательно связываться с антигеном или его биологически активной частью по сравнению с антителом.

В другом варианте осуществления анализ предусматривает приведение в контакт комплекса антитело-антиген с тестируемым соединением и определение способности тестируемого соединения модулировать комплекс антитело-антиген. Определение способности тестируемого соединения модулировать комплекс антитело-антиген может быть выполнено, например, путем определения способности антигена связываться или взаимодействовать с антителом в присутствии тестируемого соединения.

Специалистам в данной области будет понятно, что в любом из способов скрининга, раскрытых здесь, антитело может представлять собой нейтрализующее антитело, которое модулирует или иным образом препятствует активности и/или передаче сигнала CD47.

Способы скрининга, раскрытые здесь, могут быть выполнены как анализ на основе клеток или бесклеточный анализ. Бесклеточные анализы согласно изобретению можно использовать для растворимой формы или мембраносвязанной формы CD47 или его фрагментов. В случае бесклеточных анализов мембраносвязанной формы CD47 может оказаться желательным использовать солюбилизирующее средство, такое что мембраносвязанная форма белка удерживается в растворе. Примеры таких солюбилизирующих средств включают неионогенные детергенты, такие как н-октилглюкозид, н-додецилглюкозид, н-додецилмальтозид, октаноил-N-метилглюкамид, деканоил-N-метилглюкамид, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, изотридециполи(этиленгликолевый эфир)_n, N-додецил-N,N-диметил-3-аммоний-1-пропансульфонат, 3-(3-холамидопропил)диметиламминийол-1-пропансульфонат (CHAPS) или 3-(3-холамидопропил)диметиламминийол-2-гидроксид-1-пропансульфонат (CHAPSO).

В более чем одном варианте осуществления может быть желательным иммобилизовать антитело или антиген для облегчения разделения форм, образовавших или не образовавших комплекса одного или обоих белков после введения соединения-кандидата, а также для приспособления автоматизации анализа. Наблюдение за комплексом антитело-антиген в присутствии и в отсутствие соединения-кандидата может быть выполнено в любом сосуде, подходящем для содержания реагентов. Примеры таких сосудов включают микротитровальные планшеты, тестовые пробирки и микроцентрифужные пробирки. В одном варианте осуществления может быть добавлен слитый белок, который добавляет домен, позволяющий одному или обоим белкам связываться с матрицей. Например, слитые белки GST-антитело или слитые белки GST-антиген могут адсорбироваться на гранулах глутатиона-сефарозы (Sigma Chemical, St. Louis, MO) или обработанных глутатионом микротитровальных планшетах, которые затем объединяют с тестируемым соединением, и смесь инкубируют в условиях, способствующих образованию комплекса (например, при физиологических значениях концентрации соли и pH). После инкубации бусинки или лунки микротитровального планшета промывают для удаления любых несвязанных компонентов, матрицу в случае гранул иммобилизуют, комплекс определяют прямо или косвенно. Альтернативно, комплексы могут диссоциировать из матрицы, и уровень образования комплекса антитело-антиген определяют, используя стандартные методы.

Другие методы иммобилизации белков на матрицах можно использовать в скрининговых анализах согласно изобретению. Например, антитело (например, антитело 2A1 или антитело, содержащее вариативную тяжелую цепь, выбранную из SEQ ID NOs: 5-30, и вариативную легкую цепь, выбранную из SEQ ID NOs: 31-47) или антиген (например, белок CD47) можно быть иммобилизовать, используя коъюгацию биотина и стрептавидина. Биотинилированные молекулы антитела или антигена могут быть полу-

чены методами с использованием биотина-NHS (N-гидроксисукцинимид), известными в данной области (например, набор для биотинилирования, Pierce Chemicals, Rockford, III), и иммобилизованы в лунках 96-луночных планшетов, покрытых стрептавидином (Pierce Chemical). Альтернативно, другие антитела, реагирующие с представляющим интерес антителом или антигеном, но которые не препятствуют формированию представляющего интерес комплекса антитело-антиген, могут быть дериватизированы на лунках планшета, и несвязанное антитело или антиген удерживается за счет конъюгации с антителом. Методы обнаружения таких комплексов, помимо описанных выше для GST-иммобилизованных комплексов, включают иммунологический анализ комплексов с использованием таких других антител, реагирующих с антителом или антигеном.

Кроме того, изобретение относится к новым агентам, идентифицированным с помощью любого из указанных выше скрининговых анализов, и их применениям для лечения, как описано здесь.

Диагностические и профилактические композиции.

Моноклональные антитела (MAb) к CD47 согласно изобретению используют для получения диагностических и профилактических препаратов. В одном варианте осуществления моноклональные антитела (MAb) к CD47 согласно изобретению вводят пациентам, которые имеют риск развития одного или нескольких из указанных выше заболеваний, таких как, например, без ограничения, рак или другое неопластическое состояние. Предрасположенность пациента или органа к одному или нескольким из указанных выше видов рака или других неопластических состояний может быть определена с использованием генотипических, серологических или биохимических маркеров.

В другом варианте осуществления антитело к CD47 вводят индивидууму-человеку, у которого диагностирован клинический симптом, связанный с одним или несколькими из указанных выше заболеваний, таких как, например, без ограничения, рак или другое неопластическое состояние. После установления диагноза пациенту вводят антитело к CD47 для ослабления или предотвращения развития у него клинического симптома, связанного с одним или несколькими из указанных выше заболеваний.

Антитела согласно изобретению могут быть также использованы для детекции CD47 и/или SIRP α в образцах, взятых у пациента, т.е. они могут быть использованы в качестве диагностических средств. Например, антитела к CD47 согласно изобретению используются в анализах *in vitro*, например ELISA, для детекции уровней CD47 и/или SIRP α в образцах, взятых у пациента.

В одном варианте осуществления антитело к CD47 согласно изобретению иммобилизуют на твердом носителе (например, лунке(ах) микротитровального планшета). Иммобилизованное антитело служит в качестве антитела для захвата любого CD47 и/или SIRP α , который может присутствовать в тестируемом образце. Перед приведением в контакт иммобилизованного антитела с образцом, взятым у пациента, твердый носитель промывают и обрабатывают блокирующим агентом, таким как белок молока или альбумин, для предотвращения неспецифической адсорбции аналита.

Затем лунки обрабатывают тестируемым образцом, который предположительно содержит антиген, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Таким образом является, например, проба сыворотки, взятая у субъекта с подозрением на наличие у него определенных уровней циркулирующего антигена, которые рассматриваются как диагностические индикаторы данной патологии. После промывки тестируемого образца или стандарта твердый носитель обрабатывают вторым антителом, которое является детектируемо меченным. Указанное меченое второе антитело служит в качестве детектирующего антитела. Затем измеряют уровень детектируемой метки и определяют концентрацию CD47 и/или SIRP α в тестируемом образце путем сравнения со стандартной кривой, построенной по данным, полученным для стандартных образцов.

Следует отметить, что на основании результатов, полученных с использованием антител к CD47 согласно изобретению в диагностическом анализе *in vitro*, может быть определена стадия заболевания (например, клинический симптом, связанный с ишемией, аутоиммунным или воспалительным расстройством) у субъекта, исходя из уровней экспрессии CD47 и/или SIRP α . Для этого у субъектов, у которых проводят диагностику, берут пробы крови на различных стадиях течения заболевания и/или в различные периоды терапевтического лечения заболевания. С использованием набора образцов, которые дают статистически значимые результаты для каждой стадии течения заболевания или терапии, определяют интервалы концентраций антигена, которые могут рассматриваться как характерные для каждой стадии заболевания.

Все цитируемые здесь публикации и патентные документы вводятся в настоящее описание посредством отсылки, как если бы каждая такая публикация или документ были конкретно и отдельно введены в настоящее описание посредством отсылки. При этом подразумевается, что цитируемые здесь публикации и патентные документы не относятся к предмету изобретения, и предполагается, что они не входят в объем настоящего изобретения и не датированы таким же числом, как и настоящее изобретение. Настоящее изобретение было представлено здесь в виде описания заявки, однако для специалистов очевидно, что настоящее изобретение может быть осуществлено в различных вариантах и что представленное здесь описание и нижеследующие примеры приводятся лишь в иллюстративных целях и не ограничивают объема изобретения, определенного в представленной ниже формуле изобретения.

Примеры

Нижеследующие примеры, включающие описание проводимых экспериментов и полученных результатов, приводятся лишь в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничение изобретения.

Пример 1. Получение и селекция антител к CD47.

Антитела к CD47 получали путем иммунизации мышей рекомбинантным белком, представляющим CD47-IgV (иммуноглобулин-подобный вариабельный тип), осуществляя стратегию модифицированной быстрой иммунизации во множестве участков (Kilpatrick et al. (1997) Rapid development of affinity matured monoclonal antibodies using RIMMS. *Hybridoma* 16, 381-389). Кроме того, половина мышей в иммунизированной группе получала однократную инъекцию антитела против мышинного агониста GITR, DTA-1. После выполнения согласно схеме иммунизации лимфатические узлы от всех мышей (обработанные и не обработанные DTA-1) собирали и разделяли, обеспечивая, таким образом, выделение В-клеток и последующее слияние с клеточной линией мышинной миеломы. Супернатанты гибридомы подвергали скринингу на связывание с CD47 с помощью ELISA и проточной цитометрии на клетках Daudi (ATCC# CCL-213) (фиг. 1A). Супернатанты гибридомы также анализировали на способность блокировать взаимодействие CD47-SIRP α (фиг. 1B). Рекомбинантный CD47 иммобилизовали на микротитровальном планшете Medisorp (NUNC) и затем инкубировали с супернатантами гибридомы в присутствии рекомбинантного человеческого SIRP α -ECD, слитого с человеческим Fc-доменом IgG. Связывание SIRP α детектировали с использованием Fc-специфического HRP-конъюгированного вторичного антитела против IgG человека (Jackson Immuno Research), и детектировали поглощение при 650 нм на планшетном ридере.

Пример 2. Характеристика антител к CD47.

Иллюстративные мышинные антитела к CD47 согласно настоящему изобретению показаны на фиг. 2. Оценку аффинности блокирующих SIRP α антител к CD47 выполняли с помощью проточной цитометрии на клетках Raji (ATCC# CCL-86) (фиг. 2A) и CCRF-CEM (ATCC# CCL-119) (фиг. 2B). Связывание антител к CD47 детектировали с использованием FITC-конъюгированного вторичного антитела против IgG мыши (Jackson ImmunoResearch). Известное в данной области антитело к CD47, B6H12, было включено в качестве положительного контроля (см., например, патент США № 5057604). На фиг. 2B, оба антитела, B6H12 и 2D3, коммерчески доступные, не блокирующие SIRP α , сравнивали с антителами, генерированными в настоящем документе. Антитела согласно настоящему изобретению показали более высокую аффинность в отношении эндогенной (клеточная поверхность) формы CD47 по сравнению с антителами B6H12 и 2D3.

Пример 3. Блокирующая SIRP α активность антител к CD47.

Активность блокирования SIRP α антителами к CD47 измеряли с помощью ELISA при этом рекомбинантный His-меченый-CD47-IgV иммобилизовали на микротитровальном планшете Medisorp. Связывание рекомбинантного SIRP α , слитого с Fc-доменом человеческого IgG, контролировали в присутствии возрастающего количества антител к CD47. Связывание с SIRP α определяли с использованием HRP-конъюгированного вторичного антитела против IgG человека (Fc-специфического) (Jackson ImmunoResearch). Антитела согласно настоящему изобретению показали повышенную активность в отношении блокирования SIRP α по сравнению с антителом B6H12. На фиг. 3A показаны репрезентативные данные анализа ELISA на основе данных анализа блокирования SIRP α .

Антитела к CD47 анализировали с помощью проточной цитометрии на их способность блокировать связывание рекомбинантного SIRP α с CD47 клеточной поверхности. Клетки CCRF-CEM (ATCC# CCL-119) использовали в качестве источника CD47 в анализе, и связывание рекомбинантного SIRP α , слитого с Fc-доменом IgG человека, наблюдали в присутствии увеличивающихся количеств антител к CD47. Связывание SIRP α определяли с использованием APC-конъюгированного вторичного антитела против IgG человека (Fc-специфического) (Jackson ImmunoResearch) (фиг. 3B). B6H12 и 2D3, коммерчески доступное, не блокирующее SIRP α антитело к CD47, использовали в качестве положительного и отрицательного контроля соответственно.

Пример 4. Опосредованные антителом к CD47 гомотипичные взаимодействия.

Блокирующие SIRP α антитела к CD47 анализировали на их способность индуцировать клеточную агрегацию, известную как гомотипичные взаимодействия, между CD47-положительными клетками. Клетки Daudi и Raji использовали в качестве кандидатных CD47-экспрессирующих клеточных линий. Среди исследуемых антител антитело 2A1 согласно настоящему изобретению представляло собой только SIRP α -блокирующее антитело, которое не стимулировало гомотипичные взаимодействия CD47-экспрессирующих клеток.

Пример 5. Активность антител к CD47 в отношении гемагглютинации.

Одним из примеров гомотипичного взаимодействия является гемагглютинация, о чем свидетельствует агрегация RBC. Антитела к CD47 скринировали на агглютинацию RBC, оцениваемую по способности антитела предотвращать осаждение RBC человека. Неожиданно было обнаружено, что антитело 2A1 является единственным среди других антител к CD47, которое не способно вызывать гемагглютинацию,

несмотря на высокую аффинность и способность блокировать SIRP α . Другие антитела, которые проявили пониженную гемагглютинацию, не блокировали связывание SIRP α с CD47.

Для оценки способности антител к CD47 вызывать гемагглютинацию RBC человека разводили до 10% в PBS и инкубировали при 37°C в течение 2-6 ч с титрованием антител к CD47 в 96-луночных круглодонных планшетах. Наличие гемагглютинации продемонстрировано присутствием неосажденных RBC в виде мутности по сравнению с красными пятнами негемагглютинированных RBC. Неожиданно было обнаружено, как показано на фиг. 4А, что антитела к CD47 согласно изобретению, особенно антитела, называемые здесь как 2А1, не проявили активности в отношении гемагглютинации. На графике показан количественный анализ гемагглютинации, обозначенный как "индекс гемагглютинации", определенный путем количественного определения площади пятна RBC в присутствии антитела, нормализованный к количеству в отсутствие антитела.

Мышиное антитело 9Е4 вызывало наиболее значительную гемагглютинацию при всех тестируемых концентрациях. Таким образом, антитело 9Е4 связывается с CD47 и блокирует взаимодействие CD47 с SIRP α ; однако антитело 9Е4 вызывает значительную гемагглютинацию.

Вариабельная область тяжелой цепи (VH) антитела 9Е4 представлена ниже

EVQLRQSGPELVKPGASVKISCKASGYSTFDYMYWVKQSRVRS LAWIGRINPYTGATGYDQNFKD KASLIVDKSSS

TAYMELRSLTSEDSAVYYCARGNRYDGWFAYWGQGT LTVT (SEQ ID NO: 78)

Вариабельная область легкой цепи (VL) антитела 9Е4 представлена ниже

EIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISN

LDQEDIATYFCQQGNALPPTFGGGTNLEIK (SEQ ID NO: 79)

Контрольное антитело В6Н12 вызывало гемагглютинацию, как предполагается для блокирующих SIRP α антител к CD47.

Для исследования уникальности антитела 2А1 в отношении не вызывающей гемагглютинацию активности множество других антител к CD47 было подвергнуто скринингу в анализе на гемагглютинацию RBC (фиг. 4В). В анализ были включены химерные версии антитела 2А1 (2А1-х), которые состояли из мышиной вариабельной области тяжелой цепи 2А1, мышиной вариабельной области легкой цепи 2А1, модифицированной в положении аминокислоты 106 (т.е. М106I), и константных областей человеческого IgG1 и человеческого Ig-к. Последовательности VH- и VL-областей антитела 2А1 и антитела 2А1-х представлены в табл. 1. Антитела тестировали при 12,5, 25, 50 и 100 нМ. Неожиданно было обнаружено, что 2А1 является уникальным среди антител к CD47, исследованных на фиг. 4В, в том, что оно является единственным антителом на фиг. 4В, у которого отсутствует или снижена активность в отношении гемагглютинации. На фиг. 4Е показано, что 2А1, химерное 2А1 (2А1-х) и гуманизированные варианты не вызывают гемагглютинации.

На фиг. 4С показаны результаты скрининга дополнительных антител к CD47 в анализе на гемагглютинацию RBC. Как показано на фиг. 4С, коммерчески доступное моноклональное антитело 2D3 к CD47, которое не блокирует SIRP α , не вызывает гемагглютинации. Однако другие коммерчески доступные антитела к CD47 (например, CC2C6, BRC126 и В6Н12), которые блокируют SIRP α , вызывают гемагглютинацию (фиг. 4С). Таким образом, существующие в данной области до описанного здесь изобретения антитела, которые блокируют SIRP α , вызывали гемагглютинацию, тогда как существующие в данной области антитела, такие как 2D3, которые не блокируют SIRP α , не вызывали гемагглютинацию. Взятые вместе, антитела согласно изобретению (например, антитело 2А1 и его гуманизированные производные) являются единственными среди существующих антител к CD47 по своей способности блокировать SIRP α , но не вызывать гемагглютинации.

Диапазон высоких концентраций отобранных антител к CD47 тестировали в анализе гемагглютинации (фиг. 4D). Этот анализ выявил эффект прозоны гемагглютинации, вызванной В6Н12 и 9Е4, при этом гемагглютинация была снижена при значениях концентрации в верхнем и нижнем концах диапазона концентраций. Графическое изображение индекса гемагглютинации также выявляет эффект прозоны.

Эффект прозоны также наблюдался на фиг. 4С и 4Е. Важно, что мышиные 2А1 и химерные 2А1 антитела к CD47 не проявляли гемагглютинирующей активности при всех концентрациях.

Как показано на фиг. 4Е, мышиное антитело 1В4 проявило гемагглютинацию в узком диапазоне.

Вариабельная область тяжелой цепи (VH) антитела 1В4 представлена ниже

QIQ LQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYIINWVQRPQGGLWIGWIYPGSGNTKYNERFKGKATLTVATSSS

TAYMQLSLSTSEDTAVYFCARREEDYFDYWGQGT LTVT (SEQ ID NO: 80)

Вариабельная область легкой цепи (VL) антитела представлена ниже

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLYSSNQNYLTWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF

TLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 81)

Гемагглютинирующая способность гуманизированных антител 2А1, полученных от мышей тестировали, как указано выше. Важно, что репрезентативное гуманизированное антитело АВ6.12 в различных человеческих изотипах IgG (IgG1, IgG4-S228P и IgG4-S228P/L235E) не вызывало какой-либо гемагглютинации RBC. 2А1 и 2А1-х были включены в качестве контролей для негемагглютинирующих антител,

тогда как В6Н12 и 9Е4 были включены в качестве положительных контролей гемагглютинации (фиг. 4F).

Пример 6. Связывание с CD47 макак-крабоедов.

Оценивали способность мышиного антитела 2A1 связываться с CD47 макак-крабоедов (супо). Ранее сообщалось, что антитело В6Н12 является кросс-реактивным по отношению CD47 макак-крабоедов и было использовано в анализе в качестве положительного контроля присутствия на CD47 макак-крабоедов. Эксперимент по измерению связывания 2A1 с CD47 макак-крабоедов был разработан для сравнения связывания 2A1 с CD47 на В-клетках макак-крабоедов и человеческих клетках, при этом линии клеток Raji использовали в качестве человеческих CD47-положительных клеток. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) макак-крабоедов выделяли из цельной крови макак-крабоедов посредством центрифугирования в градиенте фиколл-пак. В-клетки (Raji) макак-крабоедов и человека метили человеческим антителом против CD20 офатумумабом (Арзерра) при концентрации 10 мкг/мл, и подвергали реакции с серийно разведенным мышиным антителом к CD47, 2A1 или В6Н12. В-клетки, меченые человеческим антителом против CD20, детектировали с помощью поликлонального античеловеческого антитела, конъюгированного с DyLite 649, тогда как мышиные антитела к CD47 детектировали с помощью поликлонального антимышиного антитела, конъюгированного с DyLite 488. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, сначала гейтировали живые клетки с помощью FSC и SSC, затем клетки, положительные на FL4 (CD20-положительные), и в заключение измеряли среднее значение FL1 (CD47-положительные). Данные нормализовали путем деления сигнала при каждой концентрации на максимальный сигнал для каждого антитела на каждую клеточную популяцию. Нормализованные результаты, показанные на фиг. 5, выявили, что 2A1 дает перекрестную реакцию с CD47 макак-крабоедов и обладает идентичной аффинностью по сравнению с CD47 человека. В соответствии с результатами, представленными выше, можно сделать вывод о том, что В6Н12 обладает более низкой аффинностью к CD47 клеточной поверхности, как на клетках Raji, так и В-клетках макак-крабоедов, по сравнению с антителами согласно настоящему изобретению.

Пример 7. Генерирование химерных антител.

Для идентификации последовательностей переменных областей тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей мышиного антитела 2A1 рибонуклеиновую кислоту (РНК) выделяли из гибридомы и использовали в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) (Phusion RT-PCR Kit Thermo Scientific) для генерирования первой цепи кДНК. Набор вырожденных праймеров, который охватывает полный репертуар лидерных последовательностей VH- и VL-областей мышиного антитела, использовали в PCR, при этом первая цепь кДНК служила в качестве матрицы.

Следующие праймеры (лидерные последовательности мышиного IgG) представлены ниже

VH1-1	CACTGCAGGTRTCCACTCC (SEQ ID NO: 82)
VH1-2	CATAGCAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 83)
VH1-3	CRCTACAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 84)
VH1-4	GCTACAGMTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 85)
VH1-5	CACTGCAGGTGTCCWMTCC (SEQ ID NO: 86)
VH1-6	CRCTRCAGGTGTCKACTCC (SEQ ID NO: 87)
VH1-7	GCTAWMGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 88)
VH1-8	CCTCAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 89)
VH1-9	GCTACAGGTGCTCACTCC (SEQ ID NO: 90)
VH1-10	CACTGCAGGTGTCTCTCT (SEQ ID NO: 91)
VH1-11	CACTGCAGGTGTCCAYTGC (SEQ ID NO: 92)
VH1-12	GCTAMMGGTGTCCACTTC (SEQ ID NO: 93)
VH1-13	CTCCTGTCAKTAACKCAGGT (SEQ ID NO: 94)
VH1-14	CACTGCAGGTGTCTCTCT (SEQ ID NO: 95)
VH1-15	CRCTRCAGGYGTCCACTCT (SEQ ID NO: 96)
VH2-1	CCAAGCTGTATCCTTTCC (SEQ ID NO: 97)

VH2-2	CCAAGCTGTGTCCTRTCC (SEQ ID NO: 98)
VH3-1	CTTGACAGYCVTTCCGGT (SEQ ID NO: 99)
VH3-2	CTTCACAGCCTTTCCTGGT (SEQ ID NO: 100)
VH4	CTTAAAAGGGTCCAGTGT (SEQ ID NO: 101)
VH5-1	CAYTTTAAAARGTGTCMAGTGT (SEQ ID NO: 102)
VH5-2	GTTTTAAAAGGTGTCCTGTG (SEQ ID NO: 103)
VH6	CTYTTAAAAGGKGTCAGWG (SEQ ID NO: 104)
VH7-1	CYTTTAMATGGTATCCAGTGT (SEQ ID NO: 105)
VH7-2	CTTTTACATGGTTTCAAGTGT (SEQ ID NO: 106)
VH8	GTCCCTGCATATGTCYT (SEQ ID NO: 107)
VH9	GATGGCAGCWGCYCAAAG (SEQ ID NO: 108)
VH10	CTATCAAGGTGTGCATTGT (SEQ ID NO: 109)
VH11	CTTTTAAAAGWTGTCCAGKGT (SEQ ID NO: 110)
VH12	GTGACAGTCCTTCTGGTAG (SEQ ID NO: 111)
VH14	CTTCCTGATGGCAGTGTT (SEQ ID NO: 112)
VH15	GCTACAGGTATCCAATCC (SEQ ID NO: 113)

Обратный праймер (константная область мышиного IgG) представлен ниже

Наименование	Последовательность
HC-Rev	CCGTCTAGAAУСТССАCАCAGGRRCCAGTGGATAGAC (SEQ ID NO: 114)

Следующие праймеры (лидерная последовательность мышиного Ig-каппа) представлены ниже

Наименование	Последовательность
VK1-1	CTGWTGTTCTGGATTCCTG (SEQ ID NO: 115)
VK1-2	GGTCAGACAGTCAGCAGT (SEQ ID NO: 116)
VK2	GTGCTCTGGATTCGGGAA (SEQ ID NO: 117)
VK4/5-1	CAGCTTCYTGCTAATCAGTG (SEQ ID NO: 118)
VK4/5-2	CTAATCAGTGCTTCAGGA (SEQ ID NO: 119)
VK8-1	GTGGGTATCTGGTRCSTGTG (SEQ ID NO: 120)
VK8-2	GGAAATTTAAAAGTACCTGTGGG (SEQ ID NO: 121)
VK9A/9B-1	GGTTTCMAGGTRCCAGATGT (SEQ ID NO: 122)
VK9A/9B-2	CTCTGGTTYCCAGGTATC (SEQ ID NO: 123)
VK10	CTGTTTTCAAGGTRCCAGATGT (SEQ ID NO: 124)
VK11	GTTGTAATGTCCAGAGGA (SEQ ID NO: 125)
VK12/13-1	CTTACAGGTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 126)
VK12/13-2	CTCAATTGTAGRTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 127)
VK12/13-3	CACAGTAGGTGTCAGATGT (SEQ ID NO: 128)
VK12/13-4	GTCGTAGTTGTCAGATGT (SEQ ID NO: 129)

VK12/13-5 CCTCCTTCTTGGCCAAGA (SEQ ID NO: 130)
 VK19/28-1 CTTATATGGAGCTGATGGG (SEQ ID NO: 131)
 VK19/28-2 GTGTCTGGTGCTCATGGG (SEQ ID NO: 132)
 VK19/28-3 CTSTGGTTGTCTGGTGTGA (SEQ ID NO: 133)
 VK20 GTCTCTGATTCTAGGGCA (SEQ ID NO: 134)
 VK21-1 CTKCKCTGGGTTCAG (SEQ ID NO: 135)
 VK21-2 GCAGGTGTTGACGGA (SEQ ID NO: 136)
 VK22-1 CAGGTGCCTCGTGAC (SEQ ID NO: 137)
 VK22-2 CTCTGGTGCTGTGCA (SEQ ID NO: 138)
 VK23 CTGGAYTYCAGCCTCCAGA (SEQ ID NO: 139)
 VK24/25-1 GWTCTCTRGAGTCAGTGGG (SEQ ID NO: 140)
 VK24/25-2 CTGGATCCCTGGAKCYACT (SEQ ID NO: 141)
 VK32 GTTCTGCTTTTATAGGTGTG (SEQ ID NO: 142)
 VK33/34 GATCCCAGGCATGATATGT (SEQ ID NO: 143)
 VK31/38C CTTTCATGGTGCTCAGTGT (SEQ ID NO: 144)
 VKRF CCATATCAGGTGCCCAGTGT (SEQ ID NO: 145)

Обратный праймер (константная область мышиного Ig-каппа) представлен ниже

Наименование Последовательность

CCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG (SEQ ID NO:

LC -rev 146)

Затем амплифицированные VH и VL клонировали в пределах рамки считывания в векторы, содержащие подходящие последовательности секретируемого антитела и константные области человеческого IgG1 и Ig-κ, соответственно, для генерирования мышь:человек химерных конструкций ДНК. Эти конструкции котрансфицировали в клетки 293Freestyle (Life Technologies), и полученное антитело очищали из супернатанта клеточной культуры хроматографией на Белке-А. Для определения того, что были идентифицированы правильные последовательности VH и VL, химерное антитело 2A1 (обозначенное как 2A1-хi) сравнивали с мышинным родительским антителом 2A1, и анализ связывания с CD47 проводили с помощью проточной цитометрии на клетках Raji (фиг. 6). Антитело B6H12 также было включено в качестве положительного контроля в этом анализе. Связывание с 2A1-хi детектировали с использованием FITC-конъюгированного вторичного антитела против IgG человека. Связывание 2A1 и B6H12 детектировали с использованием FITC-конъюгированного вторичного антитела против IgG мыши. Кажущиеся аффинности определяли путем нелинейной подгонки (Prism Graphpad Software) средних интенсивностей флуоресценции при различных концентрациях антитела (табл. 2). Антитело 2A1-хi обладает аффинностью связывания, сходной с аффинностью связывания мышинного антитела 2A1 в отношении CD47 клеточной поверхности, демонстрируя, что последовательности VH и VL были идентифицированы правильно.

Таблица 2

	КД (кажущаяся) (полезная модель)	Стандартная ошибка	R ²
2A1-mIgG1	93,6	±10,1	0,9977
2A1-хi	78	±14,9	0,9922
B6H12	3786	±310	0,9998

Пример 8. Гуманизация антитела.

Мышиное антитело 2A1 к CD47 гуманизировали для уменьшения возможной иммуногенности при введении пациенту-человеку. Последовательности VH- и VL-областей 2A1 сравнивали с последовательностями человеческого антитела в базе данных IMGT. Затем генерировали структурную модель VH- и VL-областей 2A1 с использованием известных структур самых близкородственных гуманизированных и человеческих антител в базе данных Protein Data Bank (PDB). Три определяющих комплементарных участка (CDR) как в тяжелой, так и в легкой цепи антитела 2A1 фиксировали, и мышинные каркасные участки заменяли на множество человеческих каркасных участков, которые обладали самой высокой способностью сохранять нужную ориентацию CDR. Конструкции, соответствующие каждому из гуманизированных вариантов 2A1, генерировали путем генного синтеза и клонировали в пределах рамки считывания в векторы, содержащие подходящую последовательность секретируемого антитела и константные области IgG1 и Ig-κ человека. Различные комбинации гуманизированных тяжелых и легких цепей котрансфицировали в клетки 293Freestyle (Life Technologies), и полученные антитела очищали из супернатанта клеточной культуры с помощью хроматографии на Белке-А.

Гуманизированные антитела тестировали на их способность связываться с клетками Raji с помо-

щью проточной цитометрии (фиг. 7). Антитело 2A1- χ i использовали в качестве контроля в большинстве из этих анализов для установления критерия для аффинности связывания. Гуманизированные антитела затем оптимизировали для усиления экспрессии и снижения проблемных участков, включая возможную изомеризацию и участки деамидирования. Пример оптимизированного гуманизированного антитела, полученного из мышиного антитела 2A1, обозначен как антитело AB6.12, которое проявляет аффинность связывания, сходную с антителом 2A1- χ i (фиг. 7H; табл. 3). Кажущиеся аффинности определяли с помощью программ нелинейной подгонки (Prism Graphpad Software) средних интенсивностей флуоресценции при различных концентрациях антитела.

Таблица 3

	KD (кажущаяся) (пМ)	Стандартная ошибка	R ²
2A1- χ i	36,4	$\pm 8,54$	0,9908
AB6.12	39,9	$\pm 5,54$	0,9964

Затем антитело AB6.12 конвертировали из IgG1 в другие изотипы IgG человека путем замены константного домена тяжелой цепи. Как показано на фиг. 7I, замена изотипа IgG на версию IgG4 со стабилизированной шарнирной областью (IgG4P: S228P), и вариант IgG4 со стабилизированной шарнирной областью с пониженным связыванием с Fc-рецептором (IgG4PE: S228P/L235E) не изменила аффинность связывания гуманизированного антитела по отношению к CD47 клеточной поверхности (фиг. 7I; табл. 4). Кажущиеся аффинности определяли с помощью программ нелинейной подгонки (Prism Graphpad Software) средних интенсивностей флуоресценции при различных концентрациях антитела.

Таблица 4

	KD (кажущаяся) (пМ)	Стандартная ошибка	R ²
AB6.12-IgG1	38,6	$\pm 10,5$	0,9798
AB6.12-IgG4P	35,7	$\pm 8,4$	0,9841
AB6.12-IgG4PE	34,6	$\pm 10,9$	0,9727

В течение всего процесса гуманизации антитела CD47 тестировали для гарантирования того, что функциональное свойство в отношении блокирования SIRP α не изменялось. Как показано на фиг. 7J, множество изотипов IgG гуманизированного антитела, AB6.12, блокировали взаимодействие SIRP α :CD47 по данным метода на основе проточной цитометрии, описанного выше в примере 3. Иллюстративные антитела к CD47 и их соответствующие VH-область и VL-область представлены в табл. 1.

В течение процесса гуманизации было определено, что в некоторых вариантах осуществления мотив аминокислотной последовательности, "NA", в начале VH CDR3 (SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 77) является важным для связывания антител к CD47, описанных здесь. В некоторых вариантах осуществления в отсутствие аминокислотных остатков "NA" в начале VH CDR3 (SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 77) антитела к CD47 согласно изобретению не связываются или связываются с более низкой аффинностью с их мишенью, чем в присутствии аминокислотных остатков "NA". Например, когда мотив "NA" был заменен на более канонические мотивы "AR" или "AT", связывание было значительно снижено (т.е. больше, чем в десять раз). В других вариантах осуществления в отсутствие аминокислотных остатков "NA" в начале VH CDR3 (SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 77) антитела к CD47 согласно изобретению связываются со своей мишенью с эквивалентной аффинностью по сравнению со связыванием в присутствии аминокислотных остатков "NA".

Специалистам в данной области будет понятно, что без проведения экспериментов можно определить, приведет ли аминокислотной замещение в последовательностях антител к CD47 согласно изобретению к получению антитела, обладающего, по существу, такой же функцией, например, антитела к CD47, обладающего способностью блокировать SIRP α и не вызывать значительного уровня гематтлотинии и/или истощения тромбоцитов.

Изображение кривых, полученных гель-хроматографией на колонке Superdex 200 системы AKTA FLPC с, представлено на фиг. 8A. Показаны варианты IgG1, IgG4P и IgGPE антитела AB6.12. Все три варианта являются более чем на 98% мономерными. На фиг. 8B представлен снимок ряда гуманизированных вариантов 2A1, полученный при осуществлении электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) с окрашиванием Кумасси синим в восстанавливающих (R) и невосстанавливающих (NR) условиях.

Пример 9. Антитела к CD47 стимулируют фагоцитоз опухолевых клеток клеточных линий.

CD47 представляет собой рецептор клеточной поверхности, который повышающе регулирован на опухолевых клетках и также, по-видимому, способствует ускользанию от иммунологического надзора посредством его взаимодействия с его природным лигандом SIRP α . Лигирование CD47 с SIRP α на макрофагах приводит к снижению фагоцитарной активности. Как описано подробно ниже, было определено, стимулирует ли активность антитела 2A1 и его вариантов в отношении связывания с CD47 и блокирования SIRP α фагоцитоз опухолевых клеток в присутствии человеческих макрофагов.

PBMC выделяли из человеческой крови и моноциты дифференцировали в макрофаги путем их ин-

кубации в среде AIM-V (Life Technologies) в течение 7 дней. Эти макрофаги моноцитарного происхождения (MDM) стали адгезивными, что позволило удалить путем промывания другие клетки. MDM соскребали, повторно заседали в 12-луночные планшеты и оставляли для адгезии на 24 ч. Линию опухолевых клеток человека CCRF-CEM выбирали в качестве клето-мишеней из-за их высокой экспрессии CD47. Клетки линии CCRF-CEM метили 0,3 мкМ CFSE при 37°C в течение 15 мин, затем промывали и добавляли в MDM в соотношении 4:1 опухолевых клеток и фагоцитов, и антитело к CD47 добавляли в различных концентрациях. Фагоцитоз клеток-мишеней протекал в течение 3 ч. Затем нефагоцитированные клетки-мишени удаляли путем промывания с помощью PBS. Оставшиеся фагоциты соскребали, окрашивали антителом к макрофагу, маркером CD14, конъюгированным с DyLite 649 (Biolegend), и анализировали с помощью проточной цитометрии. Фагоцитоз измеряли путем гейтинга (gating) живых клеток, которые были FL4-положительными (CD14+), и затем вычисляли процент FL1 (CFSE+)-положительных клеток.

На фиг. 9 показано, что антитело 2A1 к CD47 и его гуманизированные варианты продемонстрировали дозозависимое увеличение фагоцитоза опухолевых клеток посредством MDM. Антитело 2A1 и его гуманизированный вариант AB2.05 были уникальными по своей способности индуцировать фагоцитоз опухолевых клеток при 66,7 пМ, тогда как B6H12 не обладал активностью при этой концентрации (фиг. 9A). На фиг. 9B показано, что 2A1 и гуманизированные варианты AB2.05, AB6.12-IgG1, AB6.12-IgG4P и AB6.12-IgG4PE все индуцируют максимальный фагоцитоз при концентрации 0,3 мкг/мл или 2 нМ, тогда как B6H12 требует более высоких концентраций. Эти данные демонстрируют, что антитело 2A1 к CD47 (и его гуманизированные варианты) индуцирует опосредованный макрофагами фагоцитоз CD47-положительных опухолевых клеток. В этом примере клетки линии CCRF-CEM использовали в качестве CD47-положительных клеток-мишеней.

Пример 10. Противоопухолевая активность антител к CD47.

Противоопухолевую активность мышиных антител к CD47 оценивали в модели лимфомы Raji. Клетки Raji имплантировали подкожно мышам NOD/SCID и мышей рандомизировали в 5 групп (10 мышей на группу, день 0). Группа 1: носитель (только буфер); группа 2: B6H12 (положительный контроль); группа 3: 1B4; группа 4: 2A1; и группа 5: 9E4. Лечение каждым антителом или носителем (только буфером) начинали, когда опухоли были пальпируемым (50 мм³, день 13), и мышей анестезировали, когда объем их опухолей достигал ~1500 мм³. Объем опухолей измеряли 3 раза в неделю. Антитела вводили внутривенно (IV) в дозе 200 мкг 3 раза в неделю в течение 3 недель (всего 9 доз на мышь). Лечение начинали на день 13 и завершали на день 32.

Как показано на фиг. 10A, антитела к CD47 согласно изобретению, в частности антитело 2A1 продемонстрировало противоопухолевую активность в этой животной модели лимфомы. Для достижения объема опухоли 1500 мм³ группе 1 (только носитель) требовалось ~25 дней; группе 2 (B6H12.2) требовалось ~45 дней; группе 3 (1B4) требовалось ~37 дней; группе 4 (2A1) требовалось ~85 дней; и группе 5 (9E4) требовалось ~40 дней. Эти данные указывают на то, что антитело 2A1 является значительно более сильным, чем все CD47-связывающие подвергнутые тестированию антитела, включая B6H12, которое, как известно, связывается с CD47, блокирует взаимодействие CD47 с SIRPα и подавляет образование опухоли в мышиных моделях рака человека. Неожиданно было обнаружено, что опухоль-супрессорная активность этих антител к CD47 не коррелирует с их силой связывания с CD47 или блокирования взаимодействия CD47 с SIRPα, которые ожидалось на основе опубликованных данных.

Как описано в примерах 2 и 3, антитела 2A1, 1B4 и 9E4 обладали сходной аффинностью к CD47 и сходной силой в отношении блокирования взаимодействия CD47 с SIRPα. Кроме того, повышенная эффективность 2A1 не может объясняться различиями в Fc-домене описанных антител, так как все антитела, используемые в этом исследовании, состояли из идентичных мышиных доменов IgG1. Таким образом, дополнительно к уникальной композиции, антитело 2A1 обладает неожиданными и уникальными характеристиками, включая неспособность индуцировать гомотипичные взаимодействия между клетками, экспрессирующими CD47, например красными кровяными тельцами, и усиленную опухоль-супрессорную активность, которая не может объясняться усиленным связыванием с CD47 или усиленной способностью блокировать взаимодействие CD47 с SIRPα.

Для подтверждения того, что гуманизированные антитела 2A1 сохраняют свою противоопухолевую активность, проводили аналогичное исследование опухоли Raji. Дизайн исследования был таким же, как описано выше. Клетки Raji имплантировали подкожно мышам NOD/SCID и рандомизировали в 5 групп (10 мышей на группу, день 0). В этом исследовании антитела вводили интраперитонеально (IP) в дозе 200 мкг 3 раза в неделю в течение 3 недель (всего 9 доз на мышь), и объем опухоли измеряли 3 раза в неделю. Однако в этом исследовании мышиное антитело IgG1 2A1 (группа 2) сравнивали с гуманизированным производным, AB6.12. Для этого исследования антитело AB6.12 встраивали (как описано в примере 8) в человеческий IgG1 (группа 3), человеческий IgG4P (группа 4) и человеческий IgG4PE (группа 4). Таким образом, этот эксперимент был разработан для того, чтобы направить влияние гуманизации 2A1 на его опухоль-супрессорную активность и потенциальную роль эффекторной функции Fc-домена, которая, как известно в данной области, оказывает влияние на противоопухолевые активности многих

антител. Было подтверждено, что человеческий IgG1 обладает значительно более эффекторной функцией по сравнению с человеческим IgG4P. IgG4PE был разработан для дополнительного снижения эффекторной функции. Как видно на фиг. 10B, гуманизация 2A1 не ослабила противоопухолевую активность 2A1, а фактически ее усилила. AB6.12-hIgG1, AB6.12-hIgG4P и AB6.12-hIgG4PE, все показали сходную противоопухолевую активность, которая оказалась значительно выше, чем мышинового 2A1 (2AlmIgG). Этот результат является неожиданным, так как 2AlmIgG1, AB6.12-hIgG1, AB6.12-hIgG4P и AB6.12-hIgG4PE обладают сходными активностями в отношении связывания с CD47 и блокирования SIRP α . Кроме того, так как AB6.12-hIgG1, AB6.12-hIgG4P и AB6.12-hIgG4PE обладают сходными противоопухолевыми активностями, оказалось, что эффекторная функция не влияет на эффективность гуманизированного 2A1 антитела AB6.12.

Пример 11. Совместная кристаллизация антител к CD47 с CD47.

CD47 представляет собой 5-проходный трансмембранный белок с одним внеклеточным доменом IgV (иммуноглобулин-подобный варибельный тип), который является высокогликолизированным в 6 участках. Структура CD47-IgV-домена была определена в комплексе с IgV-доменом SIRP α , его природным лигандом (Protein Data Bank (PDB) Reference No. 2JJS; Hatherley et al., 2008 Mol. Cell, 25;31(2): 266-77 (фиг. 11A)). Структура показывает связывание SIRP α -IgV с CD47-IgV на апикальном эпитопе, включая N-концевой пироглутамат CD47. Эта структура в достаточной степени объясняет, каким образом оба трансмембранных белка клеточной поверхности могут эффективно взаимодействовать из соседних клеток в ориентации "голова-голова". Рентгеновская кристаллографическая структура CD47-IgV в комплексе в Fab B6H12 представлена на фиг. 11B. Для упрощения, константные области Fab (CH1 и CL) были пропущены на фигуре, и показан только Fv (VH и VL). Был обнаружен апикальный участок связывания, располагающий данное антитело на поверхности, значительно удаленной от клеточной мембраны (фиг. 11B). Механизм блокирования SIRP α антителом B6H12 является очевидным из этой структуры. Ориентация относительно локализации клеточной мембраны показана штриховой линией на фиг. 11.

Для определения эпитопа-мишени антител согласно настоящему изобретению определяли рентгеновскую кристаллографическую структуру совместного комплекса CD47-IgV-домена и Fab 2A1-xi (химерного антитела с человеческими доменами CH1 и CL). Для упрощения, на фиг. константные области Fab (CH1 и CL) были пропущены и показан только Fv (VH и VL). В отличие от ранее определенной структуры CD47, связывающегося с SIRP α в ориентации "голова-голова" (фиг. 11A), и антитела B6H12, расположенного апикально в сторону от мембраны (фиг. 11B), структура 2A1 в комплексе с CD47 выявила связывание антитела с CD47 возле мембраны в неожиданной и уникальной ориентации "голова-сторона" (фиг. 11C). Эпитоп 2A1 на CD47 является прерывистым и включает остатки Y37, K39, K41, петлю KGRD (SEQ ID NO: 56) (остатки 43-46), D51, H90, N93, E97, T99, E104 и E106 CD47 при нумерации в соответствии с SEQ ID NO: 147 (т.е. SEQ ID NO: 48, за исключением сигнальной последовательности (аминокислоты 1-18)). Структура 2A1, связанного с CD47, также показывает, что VH участвует преимущественно в связывании с петлей KGRD (SEQ ID NO: 56) CD47, тогда как домен VK взаимодействует с апикальными остатками, включая Y37, T102 и E104, которые участвуют в связывании с SIRP α . Таким образом, доменом, который физически препятствует связыванию SIRP α с CD47, является, главным образом, домен VK. Данные структурные исследования дают основание предположить, что единственный эпитоп, который связывается с 2A1, находится на стороне CD47. В противоположность антителам к CD47, известным в данной области, ориентация VH-области 2A1 в проксимальном положении к мембране, является важным отличительным свойством этого антитела, которое позволяет предотвратить значительный уровень гемагглютинации красных кровяных телец путем удерживания антитела таким образом, что оно не может образовывать связь с молекулами CD47 на соседних клетках.

Пример 12. Эффект изотипа и мутаций изотипа на истощение тромбоцитов.

Основными Fc-зависимыми функциями антитела (например, антитела к CD47) для уничтожения клеток-мишеней являются комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), инициированная связыванием C1q с Fc-областью; антителозависимая цитотоксичность (ADCC), опосредованная взаимодействием Fc-области с рецепторами Fc γ (Fc γ Rs), главным образом Fc γ RIIIa, на иммунных эффекторных клетках (например, NK-клетках и нейтрофилах); и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), который осуществляется макрофагами посредством распознавания опсонизированных клеток-мишеней через Fc γ RI. Подклассы антитела различаются по своим способностям опосредовать Fc-зависимые эффекторные активности. У человека подклассы IgG1 и IgG3 обладают высокой активностью в отношении CDC вследствие связывания с C1q. Кроме того, подкласс IgG1 обладает самой высокой аффинностью в отношении Fc γ Rs и является, таким образом, наиболее активным в отношении ADCC и Fc-зависимого ADCP. Подкласс IgG4 лишен способности связываться с C1q и обладает значительно сниженной аффинностью связывания с Fc γ R и, таким образом, обладает значительно ослабленной эффекторной функцией.

Исследовали эффект антител, которые связываются с CD47, на истощение тромбоцитов. Лечение макак-крабоедов однократной дозой антитела подкласса IgG1, которое связывается с CD47, привело к значительному истощению тромбоцитов при всех тестируемых дозах (10, 30, 100 мг/кг) (фиг. 12C-D) по сравнению с отсутствием значительного истощения тромбоцитов при введении носителя (фиг. 12A-

В). Таким образом, антитела подкласса IgG1, которые связываются с CD47, могут привести к истощению тромбоцитов Fc-зависимым образом.

Для определения, вызывают ли также различные подклассы антитела истощение тромбоцитов, эксперимент повторяли с антителом к CD47 подкласса IgG4. Подкласс IgG4 антитела, которое связывается с CD47 (IgG4P, с мутацией S228P для стабилизации шарнирной области антитела) также привел к истощению тромбоцитов при всех тестируемых концентрациях, хотя и до меньшей степени по сравнению с версией подкласса IgG1 (фиг. E-F). Затем на истощение тромбоцитов тестировали мутантную форму подкласса IgG4 антитела к CD47 (IgG4PE, с мутацией S228P, а также с мутацией L235E для уменьшения связывания с FcγR) (фиг. 12G-H). Неожиданно было обнаружено, что антитело IgG4PE не приводило к истощению тромбоцитов даже при высоких дозах (100 мг/кг). Таким образом, связывающее CD47 антитело с сильно пониженным связыванием с FcγR и эффекторной функцией не приводило к истощению тромбоцитов.

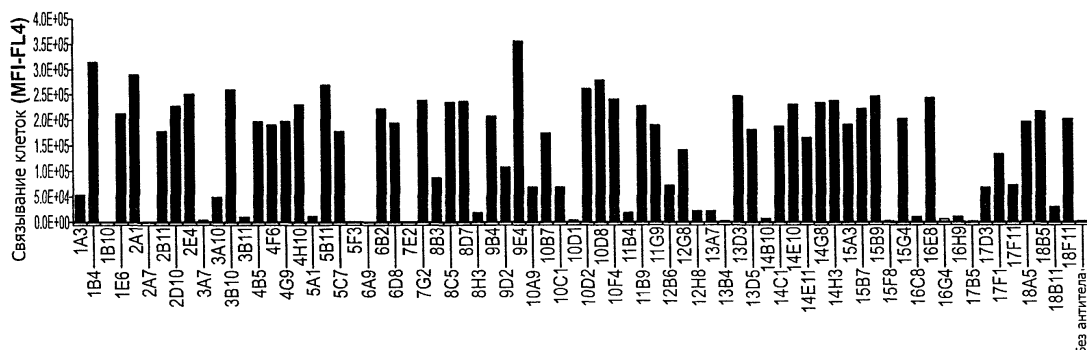
Пример 13. Активность антител к CD47 в отношении истощения красных кровяных телец (RBC).

Weiskopf et al. обнаружил, что при введении антитела к CD47, которое связывается с мышинным CD47 или высокоаффинным белком слияния SIRPα-Fc, мышам и/или макакам-крабоедам, наблюдается потеря красных кровяных телец и анемия (см. Weiskopf et al. Engineered SIRPα Variants as Immunotherapeutic Adjuvants to Anticancer Antibodies; Science 2013; 341:88). Все известные ранее, до представленного здесь изобретения, связывающие CD47 молекулы (например, антитела к CD47 и рекомбинантные белки слияния SIRPα-Fc), которые блокируют SIRPα и содержат Fc-домен, также индуцируют истощение RBC.

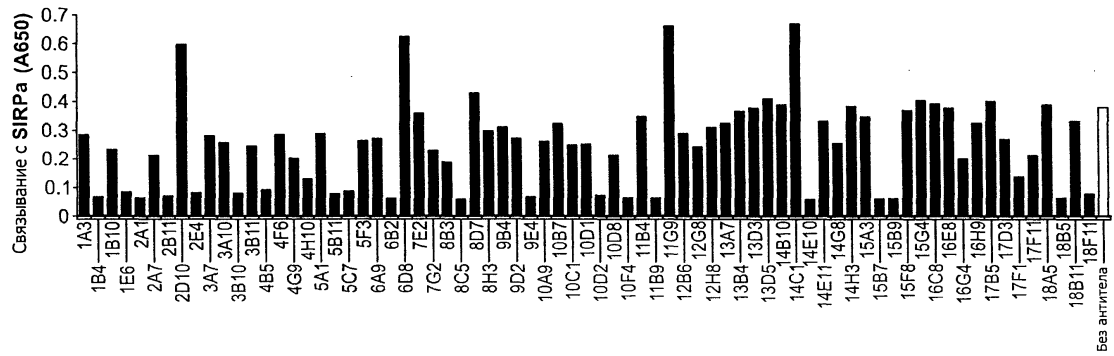
Эксперименты проводили для определения эффекта блокирующих SIRPα, негемагглютинирующих антител к CD47 согласно изобретению на истощение красных кровяных телец *in vivo*. Неожиданно было обнаружено, что негемагглютинирующие антитела к CD47 согласно изобретению не вызывают значительного истощения красных кровяных телец после введения. В частности, варианты IgG4-P и IgG4-PE антитела AB06.12 вводили макакам-крабоедам в дозах 10, 30 и 100 мг/кг путем внутривенной инфузии. Трех макак использовали на дозовую группу для каждого антитела. Количество красных кровяных телец определяли в динамике по времени и сравнивали с макаками, обработанными носителем. На фиг. 13 показано среднее количество RBC у обработанных носителем макак, нормализованное к среднему количеству RBC макак, обработанных носителем. Значительного истощения RBC у макак, обработанных антителом, не наблюдалось по сравнению с животными, обработанными носителем, что указывает на то, что негемагглютинирующее антитело к CD47 можно вводить в высоких дозах и без вызывания анемии у субъекта.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

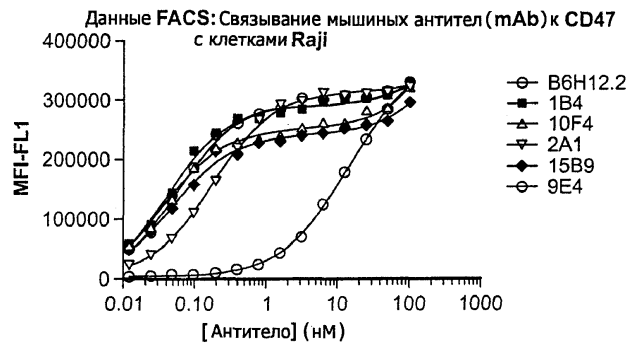
1. Применение эпитопа CD47, содержащего петлю KGRD (SEQ ID NO: 56) (аминокислотные остатки 43-46) и аминокислотные остатки Y37, T102 и E104 CD47, пронумерованные в соответствии с SEQ ID NO: 147, для получения антитела к CD47, где антитело имеет сниженную аффинность связывания с FcγR по сравнению с IgG1 дикого типа.
2. Применение по п.1, где CD47 представляет собой человеческий CD47.
3. Применение по п.1 или 2, где эпитоп содержит аминокислотные остатки Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, T102, E104 и E106 из CD47, пронумерованные в соответствии с SEQ ID NO: 147.



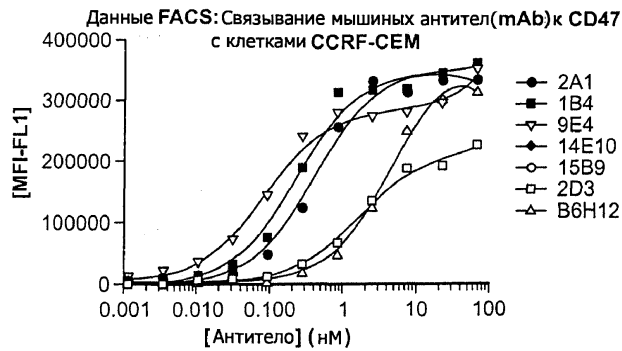
Фиг. 1A



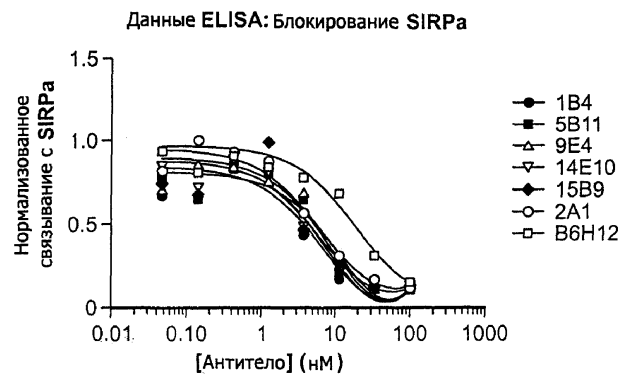
Фиг. 1B



Фиг. 2A



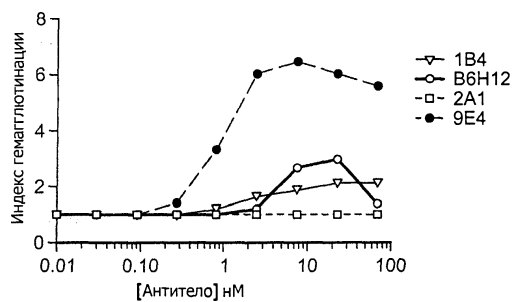
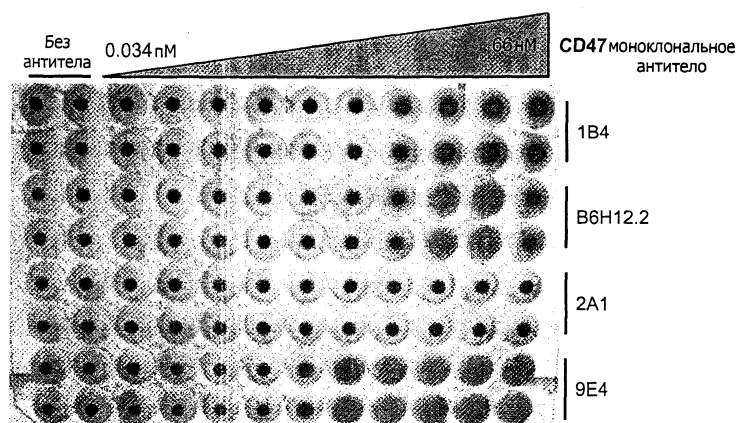
Фиг. 2B



Фиг. 3A

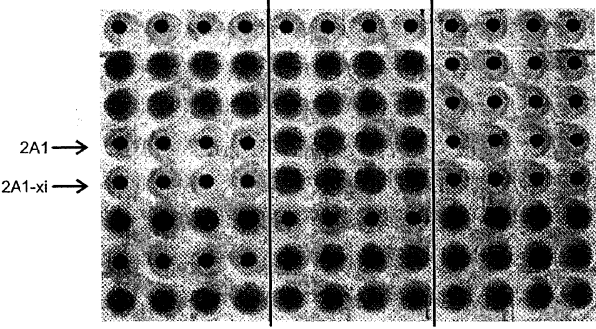


Фиг. 3В

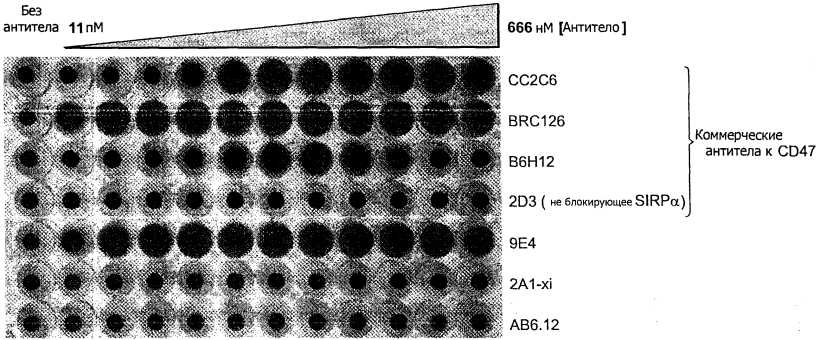


Фиг. 4А

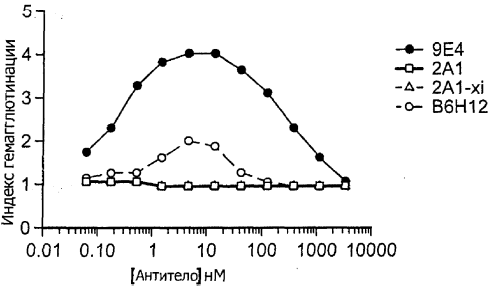
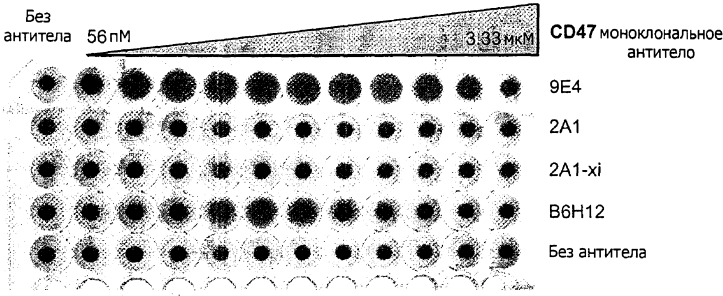
[Антитело] (нМ)	100	50	25	12.5	100	50	25	12.5	100	50	25	12.5
A	9E4	9E4	9E4	9E4	11B9	11B9	11B9	11B9	15B9	15B9	15B9	15B9
B	пустой	пустой	пустой	пустой	10F4	10F4	10F4	10F4	18F11	18F11	18F11	18F11
C	B6H12	B6H12	B6H12	B6H12	пустой	пустой	пустой	пустой	18B5	18B5	18B5	18B5
D	2A1	2A1	2A1	2A1	3B10	3B10	3B10	3B10	17F11	17F11	17F11	17F11
E	2A1-XI	2A1-XI	2A1-XI	2A1-XI	15B7	15B7	15B7	15B7	пустой	пустой	пустой	пустой
F	6B2	6B2	6B2	6B2	2B11	2B11	2B11	2B11	пустой	пустой	пустой	пустой
G	14E10	14E10	14E10	14E10	5B11	5B11	5B11	5B11	пустой	пустой	пустой	пустой
H	пустой	пустой	пустой	пустой	пустой	пустой	пустой	пустой	пустой	пустой	пустой	пустой
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12



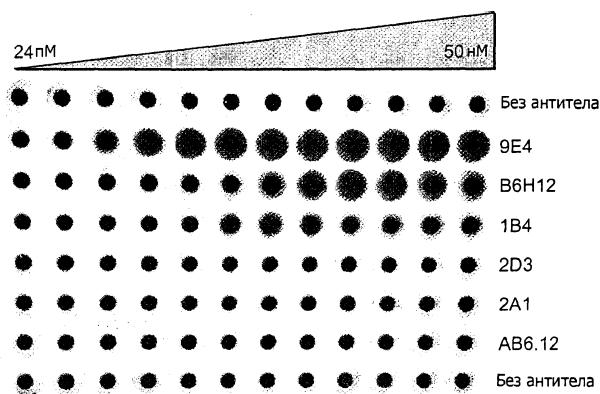
Фиг. 4B



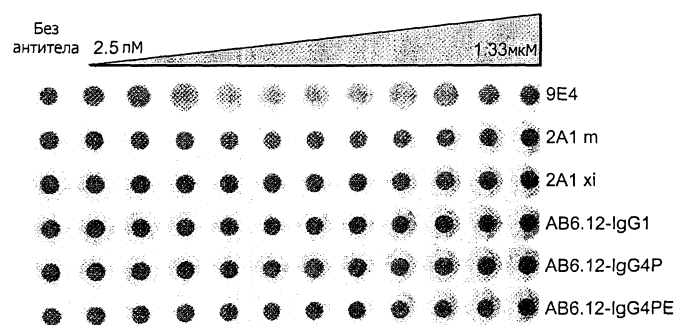
Фиг. 4C



Фиг. 4D

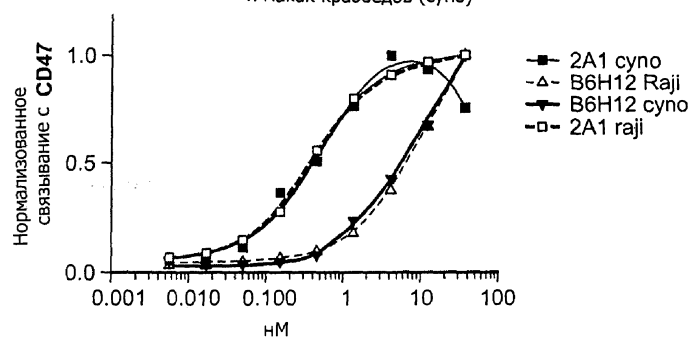


Фиг. 4Е

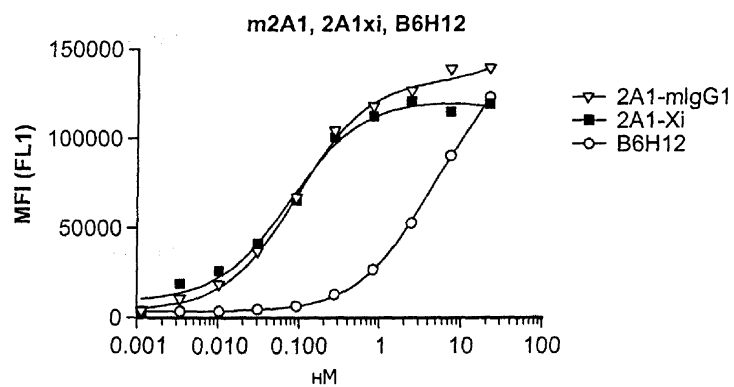


Фиг. 4F

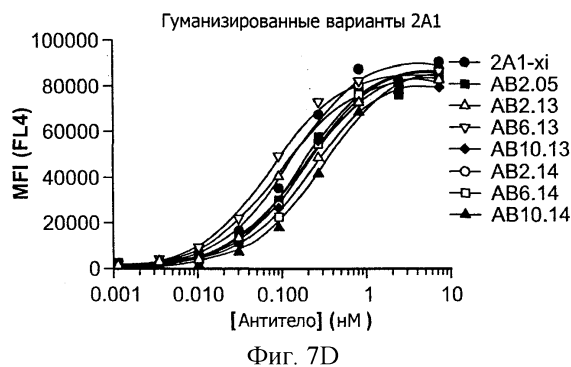
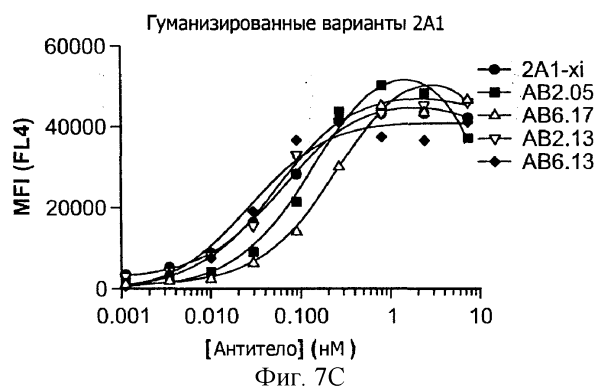
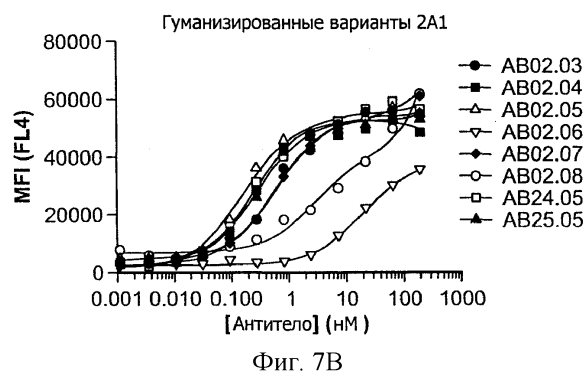
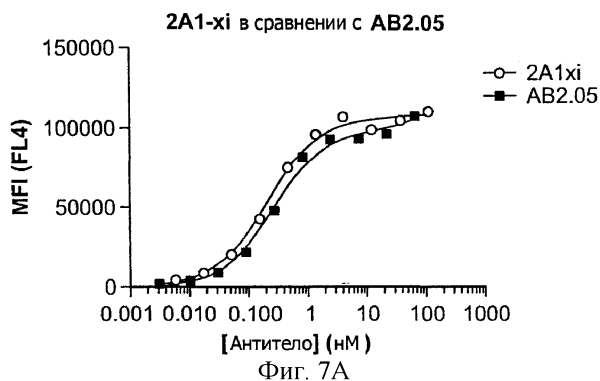
Сравнение связывания 2A1 и B6H12 с CD47 человека
и макак-крабоедов (супо)

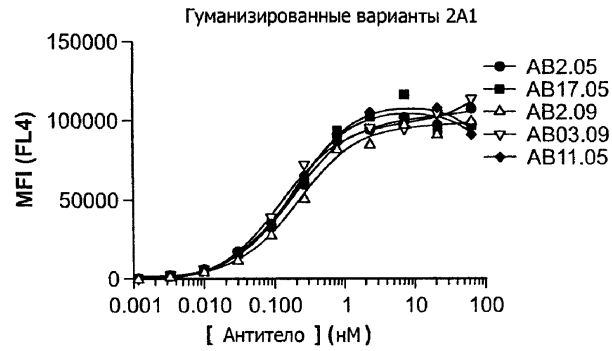


Фиг. 5

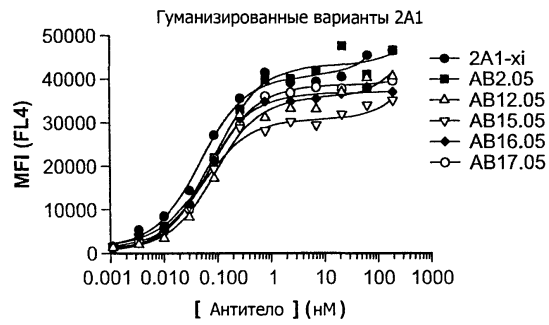


Фиг. 6

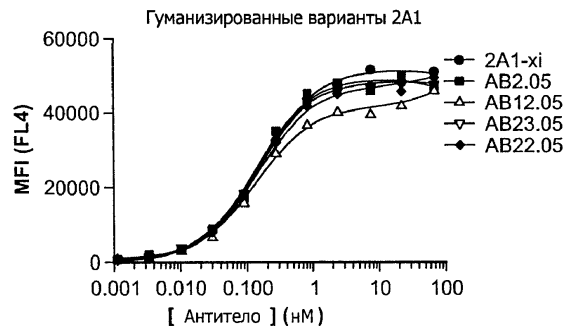




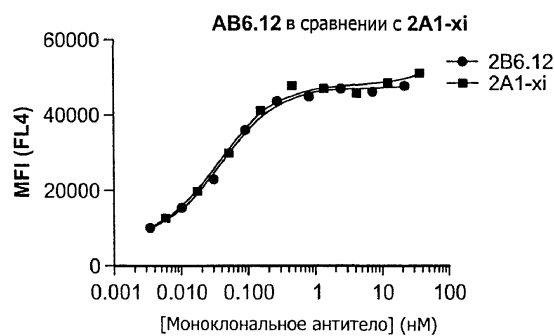
Фиг. 7E



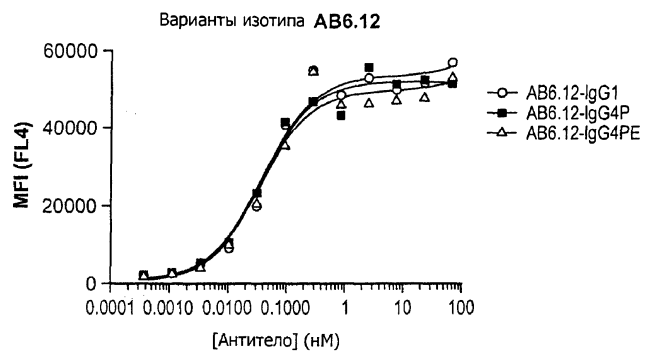
Фиг. 7F



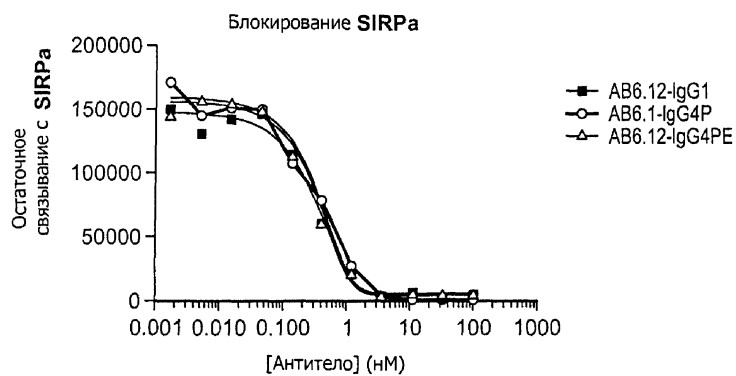
Фиг. 7G



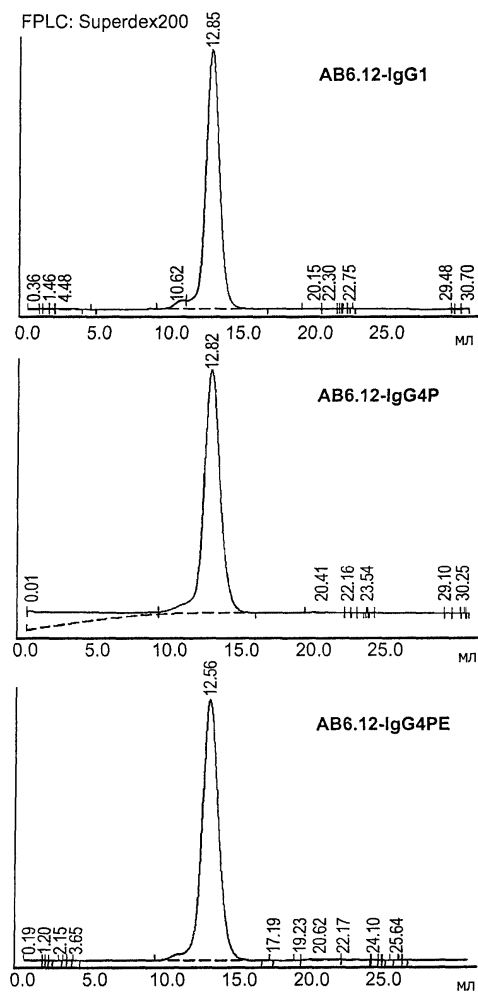
Фиг. 7H



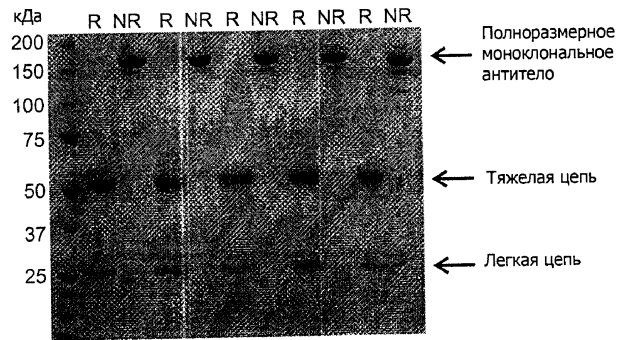
Фиг. 7I



Фиг. 7J

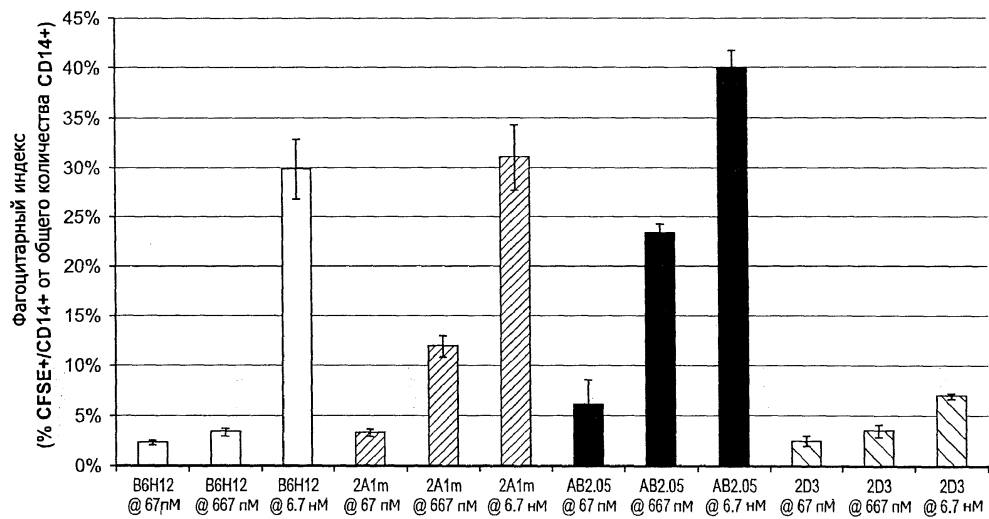


Фиг. 8A



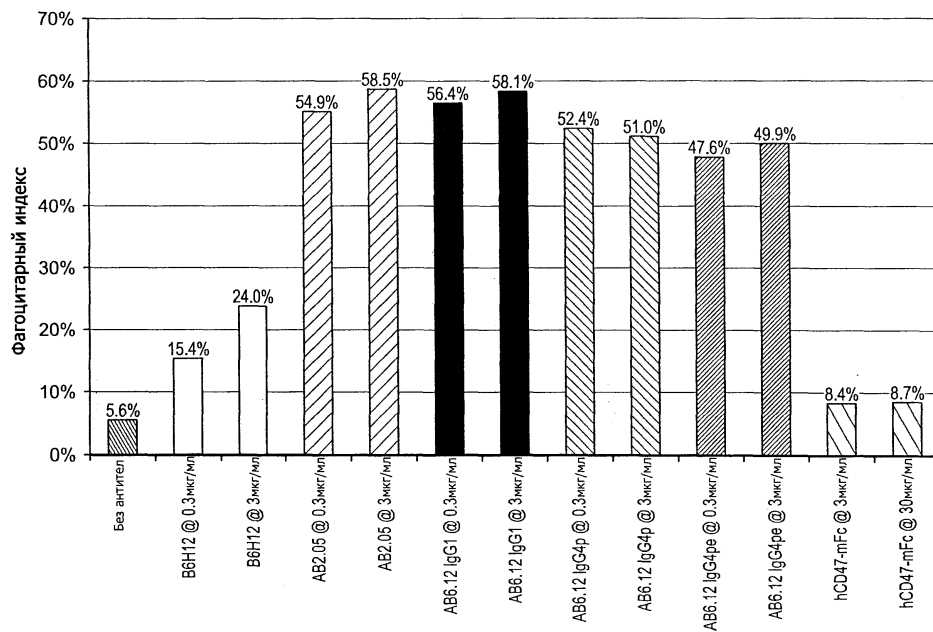
Фиг. 8В

Фагоцитоз CCRF-СЕМ преимущественно полученными из моноцитов макрофагами (MDM)

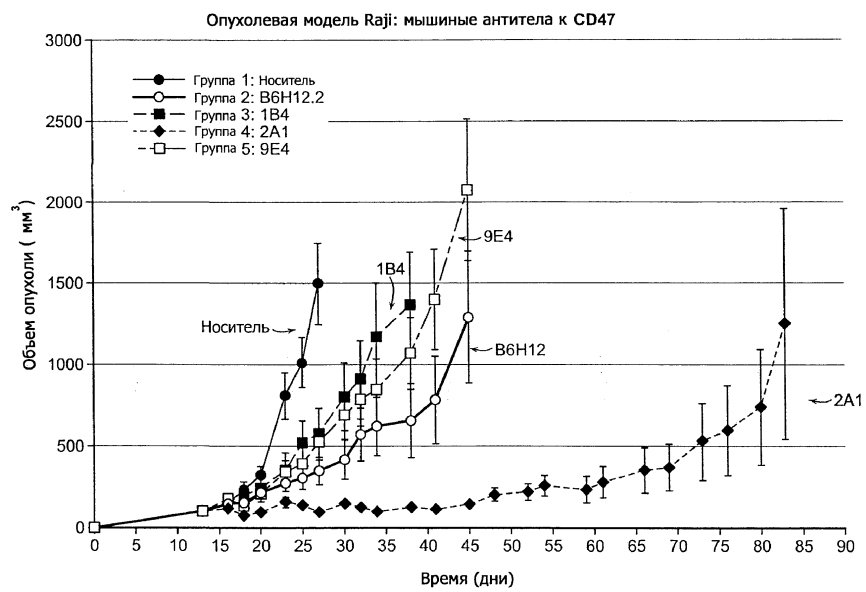


Фиг. 9А

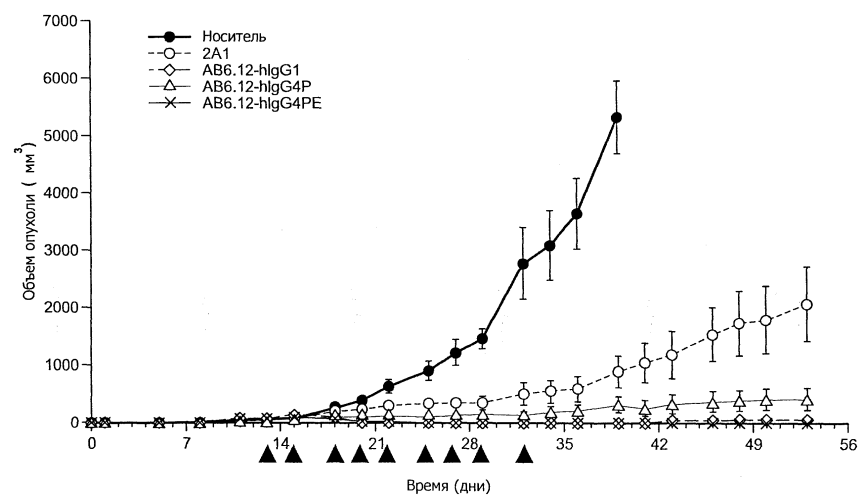
Фагоцитоз клеток линии CCRF-СЕМ полученными из человеческих моноцитов макрофагами (MDM)



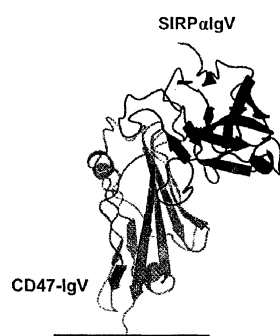
Фиг. 9В



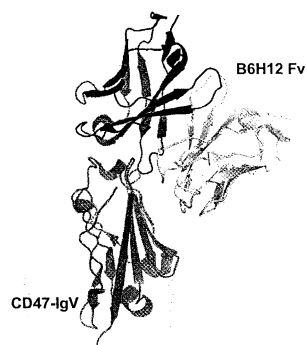
Фиг. 10А



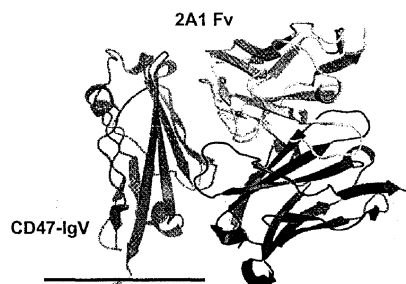
Фиг. 10В



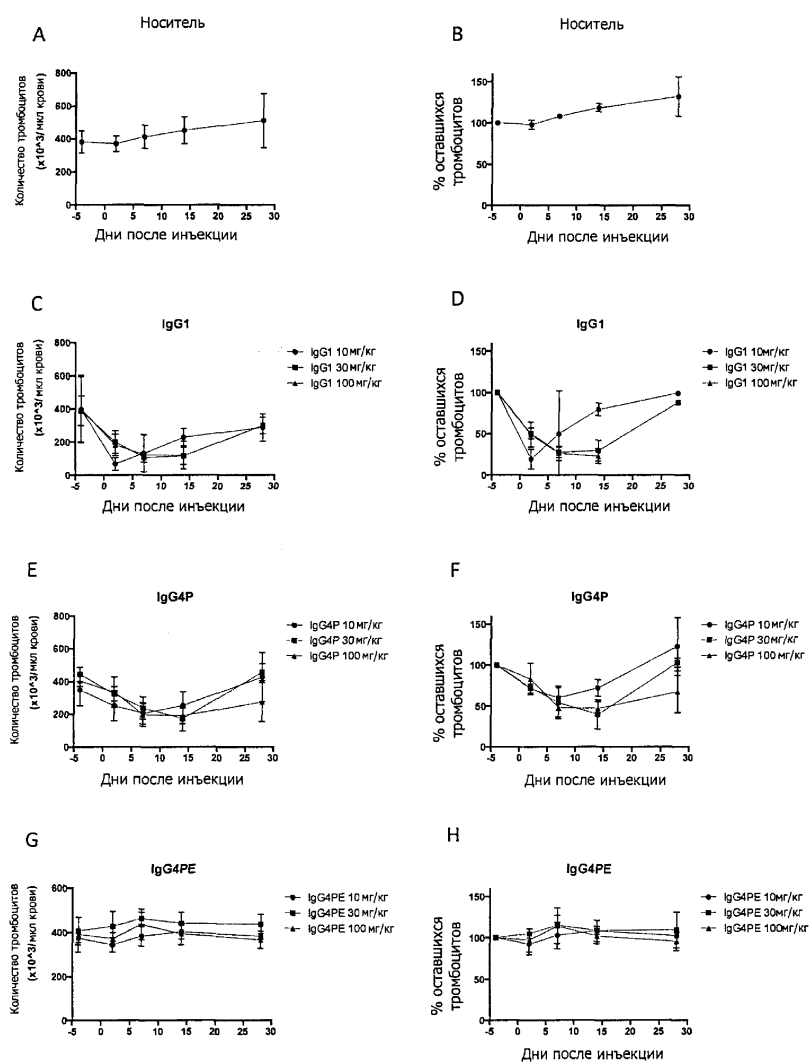
Фиг. 11А



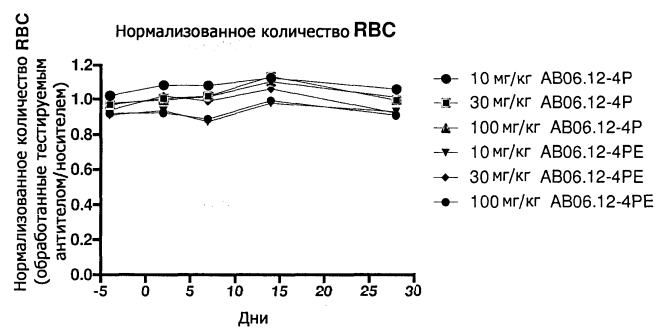
Фиг. 11В



Фиг. 11С



Фиг. 12



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2