

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 037654

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.27

(21) Номер заявки
201791485

(22) Дата подачи заявки
2015.12.28

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(54) АНТИ-CD47-АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/098,291

(32) 2014.12.30

(33) US

(43) 2018.02.28

(86) PCT/US2015/067642

(87) WO 2016/109415 2016.07.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЕЛДЖИН КОРПОРЕЙШН; САТО
ААРОН; СТАФФОРД РАЙАН; ЯНГ
ЦЗЮНЬХАО (US)

(72) Изобретатель:
Сато Аарон, Страффорд Райан, Янг
ЦзюньхАО (US)

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

(56) US-A1-20130224188

YIN et al. Aglycosylated antibodies and
antibody fragments produced in a scalable in vitro
transcription-translation system. 01 March 2012
(01.03.2012). MAbs Volume 4 Issue 2 pp 217-225.
page 218 col 1 para 3.

US-A1-20130195867

WO-A1-2011004847

US-A1-20090060924

(57) В изобретении предлагаются композиции, способы и применения, в которые вовлечены антитела, которые специфически связываются с CD47 человека. Также предлагаются применения и способы, такие как терапевтические способы, диагностические способы и способы получения таких антител.

B1

037654

037654
B1

Заявка притязает на приоритет на основании предварительной заявки на выдачу патента США № 62/098291, поданной 30 декабря 2014, описание которой включено в настоящую публикацию в виде ссылки в полном объеме.

Ссылка на список последовательностей, поданный в электронной форме

Заявка включает в себя в виде ссылки список последовательностей, поданный вместе с настоящей заявкой в виде текстового файла, озаглавленного "Sequence Listing 12827-563-228.txt", созданного 27 декабря 2015 и имеющего размер 87612 байт.

1. Область техники, к которой относится изобретение

В настоящем изобретении предлагаются антитела (анти-CD47-антитела), которые специфично связываются с CD47, и композиции, содержащие такие антитела, включая фармацевтические композиции, диагностические композиции, и наборы. Также предлагаются способы применения анти-CD74-антител для терапевтических и диагностических целей, и способы получения таких анти-CD47-антител, например, с использованием бесклеточных (CF) систем.

2. Уровень техники

CD47, также известный как интегрин-ассоциированный белок (IAP), антиген рака яичников ОА3, Rh-родственный антиген и MER6, является широко простирающимся трансмембранным рецептором, относящимся к надсемейству иммуноглобулинов. SIRP α (сигнальный регуляторный белок α), экспрессированный на макрофагах, взаимодействует с CD47, и такое взаимодействие негативно контролирует эффекторную функцию клеток, обеспечивающих естественный иммунитет, такую как фагоцитоз клеток-хозяев. Экспрессия и/или активность CD47 вовлечены в ряд заболеваний и расстройств. Соответственно, имеется потребность в терапевтических средствах, мишенью которых является CD47, а также в улучшенных способах получения таких терапевтических средств.

3. Сущность изобретения

В одном аспекте в настоящем изобретении предлагаются антитела (например, моноклональные антитела), включая их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с CD47 (например, CD47) человека, например с внеклеточным доменом (ECD) CD47. В конкретных аспектах такое анти-CD47-антитело блокирует связывание CD47 с SIRP α , стимулирует фагоцитоз, обладает пониженной или не обладает Fc-эффекторной функцией (например, связывание с Fc γ R, ADCC или CDC) и/или обладает слабой или не обладает активностью в агглютинации (например, гемагглютинации).

В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагается моноклональное анти-CD47-антитело, которое специфично связывается с CD47 человека, при этом анти-CD47-антитело является вариантом исходного антитела, и при этом анти-CD47-антитело, получаемое с использованием бесклеточной (БК) системы экспрессии, имеет более высокий титр экспрессии антитела или больший выход по сравнению с исходным антителом, получаемым в БК-системе экспрессии. В конкретном аспекте анти-CD47-антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, которые экспрессируются в БК-системе, являются агликозилизованными.

В одном аспекте в настоящем изобретении предлагается моноклональное анти-CD47-антитело, которое специфично связывается с CD47 человека (например, SEQ ID NO: 38 или 39), при этом анти-CD47-антитело при получении с использованием бесклеточной системы имеет более высокий титр экспрессии антител или больший выход по сравнению с исходным антителом, получаемым с использованием бесклеточной системы. В конкретных аспектах титр экспрессии анти-CD47-антитела или выход выше по меньшей мере в 1 раз, по меньшей мере в 2 раза или, по меньшей мере в 3 раза по сравнению с исходным антителом. В конкретных аспектах титр экспрессии анти-CD47-антитела или выход выше по меньшей мере на 25, 50, 75 или 100% по сравнению с исходным антителом. В конкретных аспектах такое анти-CD47-антитело является гуманизированным антителом. В конкретных аспектах бесклеточная система включает в себя использование бесклеточного экстракта S30. В конкретных аспектах такая бесклеточная система содержит прокариотическую дисульфидизомеразу DsbC. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело представляет собой IgG₁-антитело. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело представляет собой IgG₄-антитело. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело представляет собой IgG₁-антитело, содержащее аминокислотную замену S228P согласно индексу нумерации EU. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело представляет собой IgG₄-антитело, содержащее аминокислотные замены S228P и L235E согласно индексу нумерации EU.

В конкретных аспектах такое исходное антитело для анти-CD47-антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах такое исходное антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В конкретных аспектах такое исходное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3 или 4.

В конкретных аспектах анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области (CDR) 1, 2, и 3 антитела 2A1; и (ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 антите-

ла 2А1.

В конкретных аспектах анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области (CDR) 1, 2 и 3, содержащие аминокислотные последовательности GFNIKDYYLH (SEQ ID NO: 14), WIDPDQGDTE (SEQ ID NO: 15) и NAAYGSSSYPMDY (SEQ ID NO: 16), соответственно; и (ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности KASQDIHRYLS (SEQ ID NO: 17), RANRLVS (SEQ ID NO: 18, и LQYDEFPYT (SEQ ID NO: 19), соответственно.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается анти-CD47-антитело, содержащее одну или несколько аминокислотных модификаций (например, аминокислотных замен) относительно исходного антитела. В конкретных аспектах такая одна или несколько аминокислотных замен находятся в каркасной области вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи. В конкретных аспектах такое анти-CD47-антитело содержит 13 или 14 аминокислотных модификаций (например, аминокислотных замен) в каркасной области вариабельной области тяжелой цепи. В конкретных аспектах такое анти-CD47-антитело содержит от 1 до 15 аминокислотных модификаций (например, аминокислотных замен) в каркасной области вариабельной области тяжелой цепи. В конкретных аспектах такие аминокислотные модификации представляют собой консервативные аминокислотные замены.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается моноклональное анти-CD47-антитело, которое специфично связывается с CD47 (например, CD47 человека, таким как последовательности SEQ ID NO: 38 или 39) и содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность:

$X_1QX_2QLVQSGAEVKKX_3GX_4SVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQX_5LEWMGWIDPDQGDTE$
 $YAQKX_6QX_7RVTX_8TX_9DX_{10}SX_{11}STAYMELX_{12}SLRSX_{13}DTAX_{14}YYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV$ (SEQ ID NO: 20), где аминокислота в положении X_1 является любой аминокислотой или в положении X_1 аминокислота отсутствует, и где аминокислота в каждом из положений X_2 - X_{14} является любой аминокислотой. В некоторых аспектах X_1 представляет собой M или в положении X_1 аминокислота отсутствует, X_2 представляет собой аминокислоту с гидрофобными боковыми цепями, такую как M или V, X_3 представляет собой T или P, X_4 представляет собой S или A, X_5 представляет собой аминокислоту, имеющую алифатические боковые цепи, такую как A или G, X_6 представляет собой F или L, X_7 представляет собой D или G, X_8 представляет собой аминокислоту с гидрофобными боковыми цепями, такую как I или M, X_9 представляет собой R или T, X_{10} представляет собой R или T, X_{11} представляет собой M или T, X_{12} представляет собой S или R, X_{13} представляет собой отрицательно заряженную аминокислоту, такую как E или D, и X_{14} представляет собой аминокислоту с гидрофобными боковыми цепями, такую как M или V. В конкретных аспектах V_H анти-CD47-антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. В некоторых аспектах V_H анти-CD47-антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В конкретных аспектах анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. В конкретных аспектах анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых аспектах анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В конкретных аспектах анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В конкретных аспектах анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых аспектах анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В конкретных аспектах анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В конкретных аспектах анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 13 без аминокислоты M на N-конце.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается моноклональное анти-CD47-антитело, которое специфично связывается с CD47 (например, CD47 человека, таким как последовательности SEQ ID NO: 38 или 39), при этом анти-CD47-антитело после введения не вызывает или не стимулирует значимое истощение эритроцитов, анемию или истощение эритроцитов и анемию. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело после введения не вызывает или не стимулирует значимое истощение тромбоцитов. В конкретных аспектах такое анти-CD47-антитело не вызывает или не стимулирует значимой агглютинации клеток после введения. В конкретных аспектах такое анти-CD47-антитело не вызывает или не стимулирует значимой гемагглютинации эритроцитов после введения. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело ингибит (например, ингибит, по меньшей мере, примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%) взаимодействие CD47 с сигнальным регуляторным белком α

(SIRP α). В конкретных аспектах такое анти-CD47-антитело стимулирует фагоцитоз, такой как опосредованный макрофагами фагоцитоз CD47-экспрессирующей клетки. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, не вызывает или не стимулирует значимого уровня эффекторной функции. В некоторых аспектах анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, при экспрессии с использованием бесклеточной системы проявляет более низкую (например, более низкую, по меньшей мере, примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%) аффинность связывания, или не связывается с Fc γ R, по сравнению с тем, когда оно экспрессируется с использованием клеток CHO. В конкретных аспектах такая более низкая аффинность связывания по меньшей мере на 1 log ниже или по меньшей мере на 2 log ниже. В некоторых аспектах Fc γ R представляет собой Fc γ RI, Fc γ RIIA R131, Fc γ RIIA H131, Fc γ RIIB или Fc γ RIIIA V158.

В конкретных аспектах анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, является агликозилированным или гликозилированным в меньшей степени (например, по меньшей мере, примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% меньше) при экспрессии с использованием бесклеточной системы, по сравнению с экспрессией в клетках CHO.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается моноклональное анти-CD47-антитело, которое специфично связывается с CD47 (например, CD47 человека, таким как последовательность SEQ ID NO: 38 или 39), при этом анти-CD47-антитело (i) стимулирует фагоцитоз, такой как опосредованный макрофагами фагоцитоз CD47-экспрессирующей клетки; (ii) не вызывает или не стимулирует значимого уровня гемагглютинации эритроцитов после введения; (iii) не вызывает или не стимулирует значимого уровня ADCC или CDC; и/или (iv) проявляет более низкую (например, ниже, по меньшей мере, примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%) аффинность связывания, или не связывается с Fc γ R по сравнению с антителом, экспрессируемым с использованием клеток CHO, или по сравнению с исходным антителом.

В некоторых аспектах анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, представляет собой биспецифичное антитело. В конкретных аспектах анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, конъюгировано с определенным средством. В некоторых аспектах средство представляет собой метку или токсин.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество анти-CD47-антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, или его антигенсвязывающего фрагмента. В конкретных аспектах фармацевтическая композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую область VH-цепи, область VL-цепи или обе области: область VL-цепи и область VH-цепи анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации. В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь, легкую цепь или и тяжелую цепь и легкую цепь анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации. В конкретных аспектах такой полинуклеотид содержит любую из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 26-32, кодирующую тяжелую цепь. В конкретных аспектах такой полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 33, кодирующую легкую цепь.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается популяция полинуклеотидов, включающая в себя (i) первый полинуклеотид, содержащий нуклеотидные последовательности, кодирующие VH или тяжелую цепь анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, и (ii) второй полипептид, содержащий нуклеотидные последовательности, кодирующие VL или легкую цепь анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации. В некоторых аспектах такой первый полинуклеотид оперативно связан с первым промотором, а такой второй полинуклеотид оперативно связан со вторым промотором.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается вектор, содержащий один или несколько полинуклеотидов, описанных в настоящей публикации.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается популяция векторов, включающая в себя (i) первый вектор, содержащий нуклеотидные последовательности, кодирующие VH или тяжелую цепь анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, и (ii) второй вектор, содержащий нуклеотидные последовательности, кодирующие VL или легкую цепь анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается композиция для бесклеточной экспрессии белка, содержащая бесклеточный экстракт и один или несколько полинуклеотидов или векторов, описанных в настоящей публикации. В конкретных аспектах композиция дополнительно содержит бесклеточный экстракт S30. В конкретных аспектах композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, дополнительно содержит прокариотическую дисульфидизомеразу DsbC.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается способ лечения злокачественной опухоли, при этом способ включает в себя введение анти-CD47-антитела, описанного в настоящей пуб-

ликации, субъекту, нуждающемуся в таком введении, в количестве, достаточном для лечения злокачественной опухоли у субъекта.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается способ облегчения симптома злокачественной опухоли, при этом способ включает в себя введение анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, субъекту, нуждающемуся в таком введении, в количестве, достаточном для облегчения одного или нескольких симптомов злокачественной опухоли у субъекта.

В конкретных аспектах такой способ, предлагаемый в настоящем изобретении, дополнительно включает в себя проведение облучения или химиотерапии.

В конкретных аспектах такой способ, предлагаемый в настоящем изобретении, дополнительно включает в себя введение другого противоопухолевого средства.

В конкретных аспектах способов, предлагаемых в настоящем изобретении, злокачественная опухоль представляет собой гематологическую злокачественную опухоль. В конкретном аспекте злокачественная опухоль представляет собой солидную злокачественную опухоль. В некоторых аспектах злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому, неходжкинскую лимфому, острый миелоидный лейкоз (AML), рак молочной железы, рак мочевого пузыря, немелкоклеточный рак/карциному легкого, гепатоклеточную карциному (HCC), саркому или рак головы и шеи.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается изолированная клетка, содержащая один или несколько полинуклеотидов или векторов, описанных в настоящей публикации.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается изолированная клетка, содержащая популяцию полинуклеотидов или векторов, описанных в настоящей публикации.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается изолированная клетка, продуцирующая анти-CD47-антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящей публикации.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается популяция клеток-хозяев, включающая в себя (i) первую клетку-хозяина, содержащую полинуклеотид, содержащий нуклеотидные последовательности, кодирующие VH или тяжелую цепь анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, и (ii) вторую клетку-хозяина, содержащую полинуклеотид, содержащий нуклеотидные последовательности, кодирующие VL или легкую цепь анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается способ получения анти-CD47-антитела, включающий в себя экспрессию анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, с использованием композиции для бесклеточной экспрессии белка, описанной в настоящей публикации. В некоторых аспектах такой способ дополнительно включает в себя очистку анти-CD47-антитела.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается способ получения анти-CD47-антитела, включающий в себя экспрессию анти-CD47-антитела с использованием клетки, описанной в настоящей публикации. В некоторых аспектах такой способ дополнительно включает в себя очистку анти-CD47-антитела.

4. Краткое описание фигур

На фиг. 1А изображена авторадиограмма анти-CD47-антител, экспрессированных с использованием бесклеточной (БК) системы. Образцы 1-10 соответствовали БК-экспрессированным анти-CD47-IgG1 (1), IgG1-5m (2), IgG1-13m (3), IgG1-13mZ (4), IgG4P (5), IgG4P-5m (6), IgG4P-13m (7), IgG4PE (8), IgG4PE-5m (9) и IgG4PE-13m (10) антителам, соответственно.

На фиг. 1В изображен график, показывающий титры анти-CD47-антител (мг/л), полученных в БК-системе экспрессии. Образцы 1-10 соответствовали БК-экспрессированным анти-CD47 IgG1 (1), IgG1-5m (2), IgG1-13m (3), IgG1-13mZ (4), IgG4P (5), IgG4P-5m (6), IgG4P-13m (7), IgG4PE (8), IgG4PE-5m (9) и IgG4PE-13m (10) антителам, соответственно.

На фиг. 2А-2F изображены отдельные сенсограммы, полученные в анализе Biacore анти-CD47 IgG1-5m (2A), IgG1-13m (2B), IgG1-13mZ (2C), IgG4P-5m (2D), IgG4PE-5m (2E) антител и контрольного антитела (2F).

На фиг. 3А-3С изображены графики, на которых откладывали значения удельной теплопемкости (кал/моль/°C) против температуры (°C), полученные в анализе термостабильности с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) для анти-CD47 IgG1-13mZ (3А), IgG1-13m (3В) и IgG1-5m (3С) антител.

На фиг. 4 изображен график, на котором против времени (часы) откладывали значения концентрации анти-CD47-антител в плазме (мкг/мл), полученные в фармакокинетических исследованиях с использованием анти-CD47 IgG4-PE-антитела, полученного в клетках CHO, и анти-CD47 IgG1- и IgG1-5m-антител, полученных в БК-системе экспрессии.

На фиг. 5 изображен график, на котором объем опухолей (mm^3) откладывали против дней после инокуляции опухолевых клеток RPMI8226 в исследованиях ксенотрансплантатов мышиных опухолей *in vivo* с использованием анти-CD47 IgG1-5m-антител, полученных в БК-системе экспрессии, в дозах 1 мг/кг, 0,3 мг/кг и 0,1 мг/кг (qw3).

5. Подробное описание

В одном аспекте в настоящем изобретении предлагаются антитела (например, моноклональные ан-

титела) и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с CD47 (например, CD47 человека). В конкретных аспектах такое анти-CD47-антитело блокирует связывание CD47 с SIRP α , стимулирует фагоцитоз, имеет пониженную или не обладает Fc-эффекторной функцией (например, связывание с Fc γ R, ADCC или CDC) и/или и/или обладает слабой или не обладает активностью в агглютинации (например, гемагглютинации).

В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагается моноклональное анти-CD47-антитело, которое специфично связывается с CD47 человека, при этом анти-CD47-антитело является вариантом исходного антитела, и при этом анти-CD47-антитело при получении с использованием бесклеточной (БК) системы экспрессии имеет более высокий титр экспрессируемых антител или выход по сравнению с исходным антителом, экспрессируемым в БК-системе. В конкретном аспекте анти-CD47-антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, которые экспрессируются в БК-системе, являются агликозилированными.

В используемом в настоящем описании смысле термины "CD47" или "интегрин-ассоциированный белок", или "IAP", или "антиген рака яичников", или "OA3", или "Rh-родственный антиген" или "MER6" могут быть использованы взаимозаменяющими и относятся к широко простирающемуся трансмембраннымому рецептору, относящемуся к надсемейству иммуноглобулинов. Аминокислотная последовательность иллюстративного CD47 человека приведена ниже (GenBank, № доступа Q08722.1 (GI:1171879), включенный в настоящее описание в виде ссылки). Сигнальная последовательность (аминокислоты 1-18) подчеркнута.

```

1 MWPLVAALLL GSACCGSAQL LFNKTKSVEF TFCNDTVVIP EKVTNMEAQN
TTEVYVWKWF

61 KGRDIYTFDG ALNKSTVPTD FSSAKIEVSQ LLKGDASLKM DKSDAVSHTG
NYTCEVTELT

121 REGETIIIELK YRVVSWFSPN ENILIVIFPI FAILLFWGQF GIKTLKYRSG
GMDEKTIALL

181 VAGLVITVIV IVGAILFVPG EYSLKNATGL GLIVTSTGIL ILLHYYVFST
AIGLTSFVIA

241 ILVIQVIAYI LAVVGLSLCI AACIPMHGPL LISGLSILAL AQLLGLVYMK
FVASNQKTIQ

```

301 PPRKAVEEPL NAFKESKGMM NDE (SEQ ID NO: 38)

Для ясности, аминокислотная последовательность приведенного в качестве примера CD47 человека, за исключением сигнальной последовательности приведена ниже.

```

1 QLLFNKTKSV EFTFCNDTVV IPBKVTNMEA QNTTEVYVWK KFKGRDIYTF
DGALNKSTVP

61 TDFSSAKIEV SQLKGDSL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE LTREGETIIE
LKRYRVVSWFS

121 PNENILIVIF PIFAILFWG QFGIKTLKYR SGGMDEKTIA LLVAGLVITV
IVIVGAILFV

181 PGEYSLKNAT GLGLIVTSTG ILILLHYYVF STAIGLTSFV IAILVIQVIA
YILAVVGLSL

241 CIAACIPMHG PLLISGLSIL ALAQLLGLVY MKFVASNQKT IQPPRKAVEE
PLNAFKESKG

```

301 MMNDE (SEQ ID NO: 39)

Термины красная кровяная клетка (клетки) и эритроцит(ы) являются синонимами и используются в настоящем описании взаимозаменяющими.

Термин агглютинация относится к слипанию клеток, тогда как термин гемагглютинация относится к слипанию конкретной подгруппы клеток, т.е. красных кровяных клеток. Таким образом, гемагглютинация является типом агглютинации.

5.1. Антитела

В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагаются антитела, которые специфично связываются с CD47 (например, CD47 человека). В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагаются анти-CD47-антитела, содержащие модификации в одном или нескольких аминокислотных остатках (например, 5-13 аминокислотных замен в каркасной области вариабельной области тяжелой цепи),

которые неожиданно обеспечивают возможность улучшенной продукции в бесклеточной (БК) системе экспрессии по сравнению с исходным антителом без модификаций. В некоторых аспектах такие анти-CD47-антитела ингибируют взаимодействие SIRP α с CD47, являются агликазилизованными, стимулируют фагоцитоз, либо *in vivo*, либо *in vitro* или в обоих условиях, обладают противоопухолевой активностью (например, без стимуляции агглютинации, такой как гемагглютинация), и/или обладают низкой или не обладают Fc-эффекторной функцией (например, связыванием с Fc γ R, ADCC или CDC).

В некоторых вариантах антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящей публикации, могут содержать последовательности, которые в природе не существуют в репертуаре анти-тел зародышевой линии животного или млекопитающего (например, человека) *in vivo*.

В используемом в настоящем описании смысле, и если специально не указано иное, термины "при мерно" или "приблизительно" означают в пределах плюс или минус 10% от данного значения или диапазона. В тех случаях, когда требуется целое число, термины означают в пределах плюс или минус 10% от данного значения или диапазона, округленное либо вверх, либо вниз до ближайшего целого числа.

В используемом в настоящем описании смысле термины "антитело" и "иммуноглобулин" и "Ig" являются терминами, используемыми в данной области, и могут быть использованы в настоящем описании взаимозаменяющими, и относятся к молекуле с антигенсвязывающим участком, который специфично связывает антиген.

Антитела могут включать, например, моноклональные антитела, полученные путем рекомбинации антитела, моноспецифичные антитела, полиспецифичные антитела (включая биспецифичные антитела), человеческие антитела, гуманизированные антитела, антитела грызунов (например, антитела мыши или крысы), химерные антитела, синтетические антитела и тетрамерные антитела, содержащие две молекулы тяжелой цепи и две молекулы легкой цепи. В конкретных вариантах антитела могут включать без ограничения мономер легкой цепи антитела, мономер тяжелой цепи антитела, димер легкой цепи антитела, димер тяжелой цепи антитела, пару легкая цепь антитела-тяжелая цепь антитела, интраантитела, гетеро-конъюгированные антитела, однодоменные антитела и моновалентные антитела. В конкретном варианте антитела могут включать антигенсвязывающие фрагменты или связывающие эпитоп фрагменты, такие как без ограничения одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (sFCv) (например, включая моноспецифичные, биспецифичные и т.д.), верблюдизированные антитела, аффиантитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты и связанные дисульфидными связями Fv (sdFv). В некоторых вариантах антитела, описанные в настоящей публикации, относятся к популяциям поликлональных антител.

Антитела могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любого класса (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgG₂) или любого подкласса (например, IgG_{2a} или IgG_{2b}) молекулы иммуноглобулина. В некоторых вариантах антитела, описанные в настоящей публикации, представляют собой IgG-антитела или их класс (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄ человека) или подкласс. В некоторых вариантах антитела, описанные в настоящей публикации, представляют собой IgG₁-антитела (например, IgG₁ человека) или их подкласс. В некоторых вариантах IgG₁-антитела, описанные в настоящей публикации, содержат одну или несколько аминокислотных замен и/или делеций в константной области. В некоторых вариантах антитела, описанные в настоящей публикации, представляют собой IgG₄-антитела (например, IgG₄ человека) или их подкласс. В некоторых вариантах IgG₄-антитела, описанные в настоящей публикации, содержат одну или несколько аминокислотных замен и/или делеций в константной области.

В используемом в настоящем описании смысле "антigen" представляет собой остаток или молекулу, которая содержит эпитоп, с которым антитело может специфично связываться. Как таковой, антиген также специфично связывается антителом.

В используемом в настоящем описании смысле "эпитоп" является термином, используемым в данной области, и относится к локализованной области антигена, с которой антитело может специфично связываться. Эпитоп может быть линейным эпитопом или конформационным, нелинейным или прерывистым эпитопом. В случае полипептидного антигена, например, эпитоп может представлять собой следующие друг за другом непрерывно аминокислоты полипептида ("линейный" эпитоп), или эпитоп может содержать аминокислоты из двух или более не следующих друг за другом областей полипептида ("конформационный", "нелинейный" или "прерывистый" эпитоп). Специалисту в данной области будет понятно, что, в общем, линейный эпитоп может зависеть или может не зависеть от вторичной, третичной или четвертичной структуры.

В используемом в настоящем описании смысле термины "иммunoспецифично связывает", "иммunoспецифично распознает", "специфично связывает" и "специфично распознает" являются аналогичными терминами в контексте антител и относятся к молекулам, которые связываются с антигеном/эпитопом, как такое, связывание понятно специалисту в данной области. Например, молекула (например, антитело), которая специфично связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, обычно с более низкой аффинностью, которую определяют, например, в иммуноанализах, анализах на основе резонанса поверхностного плазмона, например, BiacoreTM, платформа KinExA (Sapidyne Instruments, Boise, ID) или в других анализах, известных в данной области. В конкретном варианте моле-

кулы, которые специфично связываются с антигеном, связываются с антигеном с K_a , которая, по меньшей мере, на 2 log, 2,5 log, 3 log, 4 log или больше, чем K_a в том случае, когда молекулы связываются с другим антигеном. В другом конкретном варианте молекулы, которые специфично связываются с антигеном, перекрестно не взаимодействуют с другими белками. В другом конкретном варианте молекулы, которые специфично связываются с антигеном, перекрестно не взаимодействуют с другими не-CD47-белками.

В используемом в настоящем описании смысле термин "моноклональное антитело" является хорошо известным в данной области термином, который относится к антителу, полученному из популяции гомогенных или по существу гомогенных антител. Термин "моноклональное" не ограничен каким либо конкретным способом получения антитела. В общем, популяция моноклональных антител может быть создана клетками, популяцией клеток или клеточной линией. В конкретных вариантах "моноклональное антитело" в используемом в настоящем описании смысле представляет собой антитело, продуцированной одной клеткой или линией клеток, при этом антитело иммуноспецифично связывается с эпитопом CD47, который определен, например, в ELISA или другом анализе связывания антигена или анализе конкурентного связывания, известном в данной области или описанном в примерах, предлагаемых в настоящем изобретении. В конкретных вариантах моноклональное антитело может быть химерным антителом или гуманизированным антителом. В некоторых вариантах моноклональное антитело является моновалентным антителом или поливалентным (например, бивалентным) антителом.

В используемом в настоящем описании смысле термин "неприродная аминокислота" относится к аминокислоте, которая не является протеиногенной аминокислотой или ее модифицированным по-стстрансляционно вариантом. В частности, термин относится к аминокислоте, которая не является одной из 20 обычных аминокислот или пирролизином или селеноцистеином или их модифицированными по-стстрансляционно вариантами.

В используемом в настоящем описании смысле термин "поликлональные антитела" относится к популяции антител, которая включает в себя множество разных антител, которые иммуноспецифично связываются с одним и тем же и/или с разными эпитопами в антигене или антигенах.

В используемом в настоящем описании смысле термины "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к части антитела, обычно части легкой или тяжелой цепи антитела, обычно примерно от 110 до 120 аминоконцевым аминокислотам в зрелой тяжелой цепи и примерно от 90 до 2100 аминоконцевым аминокислотам в зрелой легкой цепи. Вариабельные области содержат определяющие комплементарность области (CDR), фланкированные каркасными областями (FR). Обычно пространственная ориентация CDR и FR представлена следующим образом, в направлении от N-конца к C-концу: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Не имея намерения быть связанными с каким-либо конкретным механизмом или теорией, полагают, что CDR легкой и тяжелой цепей, главным образом, ответственны за взаимодействие антитела с антигеном и за специфичность антитела по отношению к эпитопу. В конкретном варианте нумерация положений аминокислот в антителах, описанных в настоящей публикации, соответствует индексу EU, как описано Kabat с соавторами (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242. В некоторых вариантах вариабельная область представляет собой вариабельную область человека. В некоторых вариантах вариабельная область содержит CDR грызунов (например, мыши или крысы) и каркасные области (FR) человека. В конкретных вариантах вариабельная область является вариабельной областью примата (например, человека или примата, отличного от человека). В некоторых вариантах вариабельная область содержит CDR грызунов (например, мыши или крысы) и каркасные области (FR) примата (например, человека или примата, отличного от человека). В качестве не ограничивающего примера вариабельную область, описанную в настоящей публикации, получают в результате сборки двух или более фрагментов последовательностей человека в составную человеческую последовательность.

В некоторых аспектах CDR антитела могут быть определены согласно (i) системе нумерации Kabat (Kabat с соавторами (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391; и Kabat с соавторами (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242); или (ii) схеме нумерации Chothia, на которую в настоящем описании будут сделаны ссылки в виде "CDR Chothia" (смотри, например, Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol., 196: 901-917; Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273: 927-948; Chothia et al., 1992, J. Mol. Biol., 227:799-817; Tramontano A et al., 1990, J. Mol. Biol. 215(1): 17 5-82; и патент США № 7709226); или (iii) системе нумерации ImMunoGeneTics (IMGT), например, как описано в Lefranc, M.-P., 1999, The Immunologist, 7: 132-136 и Lefranc, M.-P. et al., 1999, Nucleic Acids Res., 27: 209-212 ("CDR IMGT"); или (iv) MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 262: 732-745. Смотри также, например, публикации Martin, A., "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains", в Antibody Engineering. Rontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001).

Что касается системы нумерации Kabat, то CDR в молекуле тяжелой цепи антитела обычно присутствуют в положениях аминокислот 31-35, которые необязательно могут содержать одну или две дополнительных аминокислоты после 35 (называемых согласно системе нумерации Kabat 35A и 35B) (CDR1), в положениях аминокислот 50-65 (CDR2), и положениях аминокислот 95-102 (CDR3). При использова-

нии системы нумерации Kabat, CDR в молекуле легкой цепи антитела обычно присутствуют в положениях аминокислот 24-34 (CDR1), положениях аминокислот 50-56 (CDR2) и положениях аминокислот 89-97 (CDR3). Как хорошо известно специалистам в данной области, при использовании системы нумерации Kabat фактическая линейная аминокислотная последовательность вариабельного домена антитела может содержать меньше или может содержать дополнительные аминокислоты вследствие укорочения или удлинения FR и/или CDR, и при этом номер аминокислоты по системе Kabat необязательно является таким же, как линейный номер аминокислоты.

Антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любого класса (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂) или любого подкласса (например, IgG_{2a} или IgG_{2b} или их смесь) молекулы иммуноглобулина. В некоторых вариантах антитела, описанные в настоящей публикации, представляют собой IgG-антитела (например, IgG человека) или их класс (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄ человека) или подкласс.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается антитело, содержащее легкую цепь и тяжелую цепь антитела, например, отдельную легкую цепь и тяжелую цепь. Что касается легкой цепи, то в конкретном варианте легкая цепь антитела, описанного в настоящей публикации, является легкой цепью каппа (κ). В другом конкретном варианте легкая цепь антитела, описанного в настоящей публикации, является легкой цепью лямбда (λ). В другом варианте легкая цепь представляет собой смешанную последовательность, например, вариабельная легкая цепь содержит последовательность легкой цепи каппа, а константная область легкой цепи содержит последовательность легкой цепи лямбда, или наоборот. В некоторых вариантах легкая цепь антитела, описанного в настоящей публикации, является легкой цепью каппа человека или легкой цепью лямбда человека. Не ограничивающие примеры последовательностей константных областей человека описаны в данной области, например, смотри патент США № 5693780 и Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242.

В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагается антитело, например, моноклональное антитело, которое специфично связывается с CD47 человека, при этом такое анти-CD47-антитело является вариантом исходного анти-CD47-антитела, при этом анти-CD47-антитело в случае получения с использованием бесклеточной (БК) системы экспрессии имеет более высокий титр экспрессируемых антител или выход по сравнению с тем случаем, когда исходное анти-CD47-антитело экспрессировано в БК-системе, и при этом анти-CD47-антитело содержит одну или несколько аминокислотных модификаций, например, 1-15 аминокислотных модификаций по сравнению с исходным анти-CD47-антителом. В конкретном аспекте одна или несколько аминокислотных модификаций, например, 1-15 аминокислотных модификаций находятся в тяжелой цепи или VH (например, SEQ ID NO: 1). В конкретном аспекте одна или несколько аминокислотных модификаций, например, 1-15 аминокислотных модификаций находятся в каркасной области VH (например, SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, которое является вариантом исходного анти-CD47-антитела, содержит CDR (например, CDR Kabat) исходного анти-CD47-антитела.

В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагается антитело, например моноклональное антитело, которое специфично связывается с CD47 человека, при этом такое анти-CD47-антитело является вариантом исходного анти-CD47-антитела, при этом анти-CD47-антитело в случае получения с использованием бесклеточной (БК) системы экспрессии имеет более высокий титр экспрессируемых антител или выход по сравнению со случаем, когда исходное анти-CD47-антитело экспрессируется в БК-системе, и при этом анти-CD47-антитело содержит одну или несколько аминокислотных модификаций, например, 1-15 аминокислотных модификаций, по сравнению с исходным анти-CD47-антителом. В конкретном аспекте одна или несколько аминокислотных модификаций, например, 5 или 14 аминокислотных модификаций, находятся в тяжелой цепи или VH (например, SEQ ID NO: 1). В конкретном аспекте одна или несколько аминокислотных модификаций, например, 5, 10, 13 или 14 аминокислотных модификаций, находятся в каркасной области VH (например, SEQ ID NO: 1). В конкретном аспекте одна или несколько аминокислотных модификаций, например, 5, 13 или 14 аминокислотных модификаций, находятся в каркасной области VH (например, SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах в настоящем изобретении предлагается анти-CD47-антитело, которое является вариантом исходного анти-CD47-антитела, содержащим CDR (например, CDR Kabat) исходного анти-CD47-антитела. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело является антителом изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело является антителом изотипа IgG1. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело является антителом аллотипа Z изотипа IgG1. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело является антителом изотипа IgG4, таким как IgG4P или IgG4PE.

В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагается антитело, например, моноклональное антитело, которое специфично связывается с CD47 человека, при этом такое анти-CD47-антитело является вариантом исходного анти-CD47-антитела, при этом анти-CD47-антитело в случае получения с использованием бесклеточной (БК) системы экспрессии, имеет более высокий титр экспрессируемых антител или выход по сравнению со случаем, когда исходное анти-CD47-антитело экспрессируется в БК-

системе. В конкретных вариантах исходным анти-CD47-антителом является антитело AB6.12 (смотри, например, публикацию заявки на выдачу патента США № US 2014/0140989 A1, которая включена в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме). Аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) антитела AB6.12 приведены ниже, где CDR Kabat подчеркнуты. В некоторых аспектах анти-CD47-антитела, предлагаемое в настоящем изобретении, является вариантом исходного антитела AB6.12 и содержит CDR (например, CDR Kabat) исходного антитела AB6.12, например SEQ ID NO: 14-19. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело является антителом изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело является антителом изотипа IgG1. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело является антителом аллотипа Z изотипа IgG1. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело является антителом изотипа IgG4, таким как IgG4P или IgG4PE.

Вариабельная область тяжелой цепи (VH) анти-CD47-антитела AB6.12 (CDR Kabat 1-3 подчеркнуты, SEQ ID NO: 14-16):

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDY_YLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDQGDTE
YAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPM_{DY}WGQGTTVTV (SEQ ID NO: 1)

Вариабельная область легкой цепи (VL) анти-CD47-антитела AB6.12 (CDR Kabat 1-3 подчеркнуты, SEQ ID NO: 17-19):

NIQMTQSPSMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSG
SGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC_LQYDEF_PYTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 12)

В конкретном варианте анти-CD47? описанное в настоящей публикации, содержит одну или несколько аминокислотных модификаций (например, 1-15 аминокислотных модификаций), например в каркасной области VH исходного антитела, например, исходного антитела, выбранного из анти-CD47-антител, описанных в публикации заявки на выдачу патента США № US 2014/0140989 A1, которая включена в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме, например, анти-CD47-антител, описанных в таблице 1 в публикации заявки на выдачу патента США № US 2014/0140989 A1 (например, анти-CD47-антител 2A1, AB2.03, AB2.04, AB2.05, AB2.06, AB2.07, AB2.08, AB2.09, AB2.13, AB3.09, AB6.12, AB6.13, AB6.14, AB6.17, AB10.13, AB10.14, AB11.05, AB12.05, AB15.05, AB16.05, AB17.05, AB22.05, AB23.05, AB24.05 и AB25.05).

В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагается антитело, например, моноклональное антитело, которое специфично связывается с CD47 человека, при этом такое анти-CD47-антитело является вариантом исходного анти-CD47-антитела, при этом анти-CD47-антитело в случае получения с использованием бесклеточной (БК) системы экспрессии имеет более высокий титр экспрессируемых анти-тел или выход по сравнению со случаем, когда исходное анти-CD47-антитело экспрессируется в БК-системе, и при этом анти-CD47-антитело содержит VH, содержащую следующую последовательность от N-конца к C-концу:

X₁QX₂QLVQSGAEVKKX₃GX₄SVKVSCKASGFNIKDY_YLHWVRQAPGQX₅LEWMGWIDPDQGDTEY
AQKX₆QX₇RVTX₈TX₉DX₁₀SX₁₁STAYMELX₁₂S_LRSX₁₃DTAX₁₄YYCNAAYGSSSYPM_{DY}WGQGTT
VTV (SEQ ID NO: 20)

где подчеркнутые аминокислотные остатки X₁-X₁₄ расположены в порядке от N-конца к C-концу, где X₁ представляет собой M или в положении X₁ аминокислота отсутствует, X₂ представляет собой аминокислоту с гидрофобными боковыми цепями, такую как M или V, X₃ представляет собой T или P, X₄ представляет собой S или A, X₅ представляет собой кислоту, имеющую алифатические боковые цепи, такую как A или G, X₆ представляет собой F или L, X₇ представляет собой D или G, X₈ представляет собой аминокислоту с гидрофобными боковыми цепями, такую как I или M, X₉ представляет собой R или T, X₁₀ представляет собой R или T, X₁₁ представляет собой M или T, X₁₂ представляет собой S или R, X₁₃ представляет собой отрицательно заряженную аминокислоту, такую как E или D, и X₁₄ представляет собой аминокислоту с гидрофобными боковыми цепями, такую как M или V.

В конкретных аспектах анти-CD47-антитела, описанное в настоящей публикации, содержит VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 20, где аминокислота в положении X₁ является любой аминокислотой, такой как M, X₂ не является M, X₃ не является T, X₄ не является S, X₅ не является A, X₆ не является F, X₇ не является D, X₈ не является I, X₉ не является R, X₁₀ не является R, X₁₁ не является M, X₁₂ не является S, X₁₃ не является E, и/или X₁₄ не является M. В конкретных аспектах любые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 из X₁-X₁₄ не являются указанными аминокислотами. В конкретных аспектах, аминокислотная последовательность VH не является аминокислотной последовательностью VH антитела AB6.12, например, аминокислотная последовательность VH не является последовательностью SEQ ID NO: 1.

В конкретных аспектах анти-CD47-антитела, описанное в настоящей публикации, содержит VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 20, где аминокислота в положении X₇ не является G, X₉ не

является A и/или X₁₁ не является S. В конкретных аспектах любые 1, 2 или 3 из X₇, X₉ и X₁₁ не являются указанными аминокислотами. В конкретных аспектах когда аминокислота в положении X₇ является G, X₈ представляет собой M и/или X₁₀ представляет собой T, X₉ не является A и/или X₁₁ не является S.

В конкретных аспектах анти-CD47-антитело, описанное в настоящей публикации, содержит VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 20, где аминокислота в положении X₇ не является G, X₈ не является M, X₉ не является E, X₁₀ не является T и/или X₁₁ не является T. В конкретных аспектах любые 1, 2, 3 или 4 из X₇-X₁₁ не являются указанными аминокислотами. В конкретных аспектах, когда аминокислота в положении X₇ является G, X₈ представляет собой M, X₁₀ представляет собой T, X₉ не является E и X₁₁ представляет собой T.

В конкретном аспекте анти-CD47-антитело, описанное в настоящей публикации, содержит VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 20, при этом VH не содержит аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, описанных в публикации заявки на выдачу патента США № US2014/0140989 A1, которая включена в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме. В конкретном аспекте анти-CD47-антитело, описанное в настоящей публикации, содержит VH, содержащую консенсусную последовательность SEQ ID NO: 20, при этом VH не содержит каркасных областей аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, описанных в публикации заявки на выдачу патента США № US2014/0140989 A1, которая включена в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме.

В конкретных аспектах X₁ представляет собой M, X₂ представляет собой V, X₃ представляет собой P, X₄ представляет собой A, X₅ представляет собой G, X₆ представляет собой L, X₇ представляет собой G, X₈ представляет собой M, X₉ представляет собой T, X₁₀ представляет собой T, X₁₁ представляет собой T, X₁₂ представляет собой R, X₁₃ представляет собой D и/или X₁₄ представляет собой V. В конкретных вариантах любые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 из X₁-X₁₄ означают указанные аминокислоты.

В конкретных аспектах X₁ представляет собой M, X₂ представляет собой M, X₃ представляет собой P, X₄ представляет собой S, X₅ представляет собой A, X₆ представляет собой F, X₇ представляет собой G, X₈ представляет собой I, X₉ представляет собой R, X₁₀ представляет собой R, X₁₁ представляет собой T, X₁₂ представляет собой R, X₁₃ представляет собой E и/или X₁₄ представляет собой V. В конкретных вариантах любые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 из X₁-X₁₄ являются указанными аминокислотами.

В конкретном аспекте анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, не является антителом AB6.12. В конкретном аспекте анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, не содержит VH (например, SEQ ID NO: 1) и/или VL (например, SEQ ID NO: 12) антитела AB6.12.

В конкретном аспекте анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит одну из следующих аминокислотных последовательностей VH, приведенных в табл. 1.

Таблица 1. Аминокислотная последовательность VH

| SEQ ID NO: | Описание | Аминокислотная последовательность VH |
|------------|--------------|--|
| 20 | Консенсусная | X ₁ QX ₂ QLVQSGAEVKKX ₃ GX ₄ SVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQX ₅ LEWMGWIDPDQGDTEYAQKX ₆ QX ₇ RVTX ₈ TX ₉ DX ₁₀ SX ₁₁ STAYMELX ₁₂ SLRSX ₁₃ DTAX ₁₄ YYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV |
| 21 | 13m | MQVQLVQSGAEVKKPG A SVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQGLEWMGWIDPDQGDTEYAQKLQGRVTMTTD T ST T STAYMELRS L RS D DTAVYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV |
| 22 | 5m | MQMQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDQGDTEYAQKLQGRVTMTTD T ST T STAYMELRS L RS D DTAVYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV |

В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагается антитело, например, моноклональное антитело, которое специфично связывается с CD47 человека, при этом такое анти-CD47-антитело является вариантом исходного анти-CD47-антитела, при этом анти-CD47-антитело в случае получения с использованием бесклеточной (БК) системы экспрессии имеет более высокий титр экспрессируемых антител или выход по сравнению со случае, когда исходное анти-CD47-антитело экспрессируется в БК-системе, и при этом анти-CD47-антитело содержит VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 21. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело представляет собой антитело изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело является антителом изотипа IgG1. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело является антителом аллотипа Z изотипа IgG1. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело является антителом изотипа IgG4, таким как IgG4P или IgG4PE.

В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагается антитело, например, моноклональное антитело, которое специфично связывается с CD47 человека, при этом такое анти-CD47-антитело является вариантом исходного анти-CD47-антитела, при этом анти-CD47-антитело в случае получения с использованием бесклеточной (БК) системы экспрессии, имеет более высокий титр экспрессируемых антител или выход по сравнению со случаем, когда исходное анти-CD47-антитело экспрессируется в БК-системе, и при этом анти-CD47-антитело содержит VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело является антителом изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело является антителом изотипа IgG1. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело является антителом аллотипа Z изотипа IgG1. В некоторых аспектах такое анти-CD47-антитело является антителом изотипа IgG4, таким как IgG4P или IgG4PE.

В конкретном аспекте анти-CD47-антитело (IgG1-13m), предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь IgG1, содержащую аминокислотную последовательность, которая указана ниже:

MQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYLYHWRQAPGQGLEWMGWIDPDQGDT
EYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCNAAYGSSSYPMWDQGTTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (SEQ ID NO: 5).

В конкретном аспекте анти-CD47-антитело (IgG1-13mZ), предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь аллотипа IgG1-Z, содержащую аминокислотную последовательность, которая указана ниже:

MQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYLYHWRQAPGQGLEWMGWIDPDQGDT
EYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCNAAYGSSSYPMWDQGTTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (SEQ ID NO: 6).

В конкретном аспекте анти-CD47-антитело (IgG1-5m), предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь IgG1, содержащую аминокислотную последовательность, которая указана ниже:

MQMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDYLYHWRQAPGQALEWMGWIDPDQGDT
EYAQKFQGRVTITRDRSTSTAYMELRSLRSEDTAVYYCNAAYGSSSYPMWDQGTTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (SEQ ID NO: 7).

В конкретном аспекте анти-CD47-антитело (IgG4P-13m), предлагаемое в настоящем изобретении, содержит антитело IgG4P, содержащее аминокислотную последовательность, которая указана ниже:

MQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKYLYHWVRQAPGQGLEWMGWIDPDQGDT
 EYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLSRSDDTAVYYCNAAYGSSSYPMWDYWGQGTTVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLS
 SVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSLGK (SEQ ID NO: 8).

В конкретном аспекте анти-CD47-антитело (IgG4P-5m), предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь IgG4P, содержащую аминокислотную последовательность, которая указана ниже:

MQMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKYLYHWVRQAPGQALEWMGWIDPDQGDT
 EYAQKFQGRVTITRDRSTSTAYMELRSLSRSEDTAVYYCNAAYGSSSYPMWDYWGQGTTVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLS
 SVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSLGK (SEQ ID NO: 9).

В конкретном аспекте анти-CD47-антитело (IgG4PE-13m), предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь IgG4PE, содержащую аминокислотную последовательность, которая указана ниже:

MQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKYLYHWVRQAPGQGLEWMGWIDPDQGDT
 EYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLSRSEDTAVYYCNAAYGSSSYPMWDYWGQGTTVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLS
 SVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFEGGSPVFLFPPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSLGK (SEQ ID NO: 10).

В конкретном аспекте анти-CD47-антитело (IgG4PE-5m), предлагаемое в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь IgG4PE, содержащую аминокислотную последовательность, которая указана ниже:

MQMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKYLYHWVRQAPGQALEWMGWIDPDQGDT
 EYAQKFQGRVTITRDRSTSTAYMELRSLSRSEDTAVYYCNAAYGSSSYPMWDYWGQGTTVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLS
 SVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFEGGSPVFLFPPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSLGK (SEQ ID NO: 11).

В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагается антитело, например, моноклональное антитело, которое специфично связывается с CD47 человека, при этом такое анти-CD47-антитело является вариантом исходного анти-CD47-антитела, при этом анти-CD47-антитело, в случае получения с использованием бесклеточной (БК) системы экспрессии, имеет более высокий титр экспрессируемых антител или выход по сравнению со случаем, когда исходное анти-CD47-антитело экспрессируется в БК-системе, и при этом анти-CD47-антитело содержит легкую цепь, содержащую константную область легкой цепи каппа или лямбда (например, константную область легкой цепи каппа или лямбда человека), например SEQ ID NO: 13.

В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагается антитело, например, моноклональное антитело, которое специфично связывается с CD47 человека, при этом такое анти-CD47-антитело является вариантом исходного анти-CD47-антитела, при этом анти-CD47-антитело, в случае получения с использованием бесклеточной (БК) системы экспрессии, имеет более высокий титр экспрессируемых антител или выход по сравнению со случаем, когда исходное анти-CD47-антитело экспрессируется в БК-системе, и при этом анти-CD47-антитело содержит (i) VH, описанную в настоящей публикации (например, SEQ ID NO: 20, 21 или 22) или тяжелую цепь, описанную в настоящей публикации (например, любую из SEQ ID NO: 5-11), и (ii) легкую цепь, содержащую константную область легкой цепи каппа или лямбда (например, константную область легкой цепи каппа или лямбда человека), например, SEQ ID NO: 13, которая указана ниже (легкая цепь анти-CD47-антитела (Igκ)), или SEQ ID NO: 13 без аминокислоты M на N-конце:

MNIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGV
 PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADY
 EHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 13)

В конкретном варианте анти-CD47, описанное в настоящей публикации, не является анти-CD47-антителом, описанным в публикации заявки на выдачу патента США № US 2014/0140989 A1, которая включена в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме, например, любым из анти-CD47-антител, приведенных в табл. 1 в указанной публикации (например, анти-CD47-антитело 2A1, AB2.03, AB2.04, AB2.05, AB2.06, AB2.07, AB2.08, AB2.09, AB2.13, AB3.09, AB6.12, AB6.13, AB6.14, AB6.17, AB10.13, AB10.14, AB11.05, AB12.05, AB15.05, AB16.05, AB17.05, AB22.05, AB23.05, AB24.05 и AB25.05) или каким-либо антителом, содержащим любую из последовательностей SEQ ID NO: 5-30, приведенных в указанной публикации.

В некоторых вариантах анти-CD47-антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, или его анти-генсвязывающий фрагмент относится к изотипу IgG. В некоторых вариантах константная область антитела является областью изотипа IgG1 человека, имеющей аминокислотную последовательность:

| ASTKGPSVFP | LAPSSKSTSG | GTAALGCLVK | DYFPEPVTVS | WNSGALTSGV |
|-----------------|------------------------|------------------------|------------|----------------------|
| HTFPALQSS | GLYSLSSVVT | VPSSSLGTQT | YICNVNHKPS | NTKVDKKVEP |
| KSCDKTHTCP | PCPAPE L GG | PSVFLFPPKP | KDTLMISRTP | EVTCVVVDVS |
| HEDPEVKFNW | YVDGVEVHNA | KTKPREEQY N | STYRVVSVLT | VLHQDWLNGK |
| EYKCKVSNKA | LPAPIEKTI | KAKGQP RE Q | VYTLPPSRDE | LTKNQVSLTC |
| LVKGFYPSDI | AVEWESNGQP | ENNYKTTPPV | LSDGSSFFLY | SKLTVDKSRWQQGNVFSCSV |
| MHEALHNHYT | QKSLSLSPGK | | | |
| (SEQ ID NO: 34) | | | | |

В некоторых вариантах константная область IgG1 человека модифицирована в положении аминокислоты Asn297 (обведено прямоугольником, нумерация Kabat), чтобы предотвратить гликозилирование антитела, например Asn297Ala (N297A). В некоторых вариантах константная область антитела модифицирована в положении аминокислоты Leu235 (нумерация Kabat), чтобы изменить взаимодействия с Fc-рецепторами, например Leu235Glu (L235E) или Leu235Ala (L235A). В некоторых вариантах константная область антитела модифицирована в положении аминокислоты Leu234 (нумерация Kabat), чтобы изменить взаимодействия с Fc-рецепторами, например, Leu234Ala (L234A). В некоторых вариантах константная область антитела изменена в обоих положениях аминокислот 234 и 235, например Leu234Ala и Leu235Ala (L234A/L235A) (индекс EU, Kabat с соавторами, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest).

В некоторых вариантах в настоящем изобретении предлагается константная область анти-CD47-антитела изотипа IgG2 человека, имеющая аминокислотную последовательность:

| ASTKGPSVFP | LAPCSRSTSE | STAALGCLVK | DYFPEPVTVS | WNSGALTSGV |
|--|------------|------------------------|------------|------------|
| HTFPALQSS | GLYSLSSVVT | VPSSNFGTQT | YTCNVDHKPS | NTKVDKTVER |
| KCCVECPCP | APPVAGPSVF | LFPPKPKDTL | MISRTPEVTC | VVVDVSHEDP |
| EVQFNWYVDG | VEVHNAKTKP | REEQFN S TR | VVSVLTVVHQ | DWLNGKEYKC |
| KVSNKGLPAP | IEKTISKTKG | QPREPQVYTL | PPSREEMTKN | QVSLTCLVKG |
| FYPSDISVEW | ESNGQPENNY | KTTPPMLDSD | GSFFLYSKLT | VDKSRWQQGN |
| VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 35) | | | | |

В некоторых вариантах константная область IgG2 человека модифицирована в положении аминокислоты Asn297 (заключено в прямоугольник, нумерация Kabat), чтобы предотвратить гликозилирование антитела, например, Asn297Ala (N297A).

В некоторых вариантах в настоящем изобретении предлагается константная область анти-CD47-антитела изотипа IgG3 человека, имеющая аминокислотную последовательность:

| ASTKGPSVFP | LAPCSRSTSG | GTAALGCLVK | DYFPEPVTVS | WNSGALTSGV |
|--|------------|-------------------------|------------|------------|
| HTFPAVLQSS | GLYSLSSVVT | VPSSSLGTQT | YTCNVNHKPS | NTKVDKRVEL |
| KTPLGDTTHT | CPRCPEPKSC | DTPPPCCRCP | EPKSCDTPPP | CPRCPEPKSC |
| DTPPPCCRCP | APELLGGPSV | FLFPPKPKDT | LMISRTPEVT | CVVVDVSHED |
| PEVQFKWYVD | GVEVHNAKTK | PREEQY N STF | RVVSVLTVLH | QDWLNGKEYK |
| CKVSNKALPA | PIEKTISKTK | GQPREPQVYT | LPPSREEMTK | NQVSLTCLVK |
| GFYPSDIAVE | WESSGQPENN | YNTTPPMLDS | DGSFFLYSKL | TVDKSRWQQG |
| NIFSCSVMHE ALHN R FTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 36) | | | | |

В некоторых вариантах константная область IgG3 человека модифицирована в положении аминокислоты Asn297 (заключено в прямоугольник, нумерация Kabat), чтобы предотвратить гликозилирование антитела, например, Asn297Ala (N297A). В некоторых вариантах константная область IgG3 человека модифицирована в положении аминокислоты 435, чтобы продлить время полужизни, например, Arg435His (R435H) (индекс EU, Kabat с соавторами, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest).

В некоторых вариантах в настоящем изобретении предлагается константная область анти-CD47-антитела изотипа IgG4 человека, имеющая аминокислотную последовательность:

| ASTKGPSVFP | LAPCSRSTSE | STAALGCLVK | DYFPEPVTVS | WNSGALTSGV |
|---|-------------------------|-------------------------|------------|------------|
| HTFPAVLQSS | GLYSLSSVVT | VPSSSLGTKT | YTCNVDHKPS | NTKVDKRVES |
| KYGPPCP S CP | APEF L GGPSV | FLFPPKPKDT | LMISRTPEVT | CVVVDVSQED |
| PEVQFNWYVD | GVEVHNAKTK | PREEQF N STY | RVVSVLTVLH | QDWLNGKEYK |
| CKVSNKGLPS | SIEKTISKAK | GQPREPQVYT | LPPSQEEMTK | NQVSLTCLVK |
| GFYPSDIAVE | WESNGQPENN | YKTTPPVLDS | DGSFFLYSRL | TVDKSRWQEG |
| NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 37) | | | | |

В некоторых вариантах константная область IgG4 человека модифицирована в шарнирной области, чтобы предотвратить или уменьшить обмен нитями, например, Ser228Pro (S228P). В других вариантах константная область IgG4 человека модифицирована в положении аминокислоты 235, чтобы изменить взаимодействия с Fc-рецепторами, например, Leu235Glu (L235E). В некоторых вариантах константная область IgG4 человека модифицирована в шарнире и в положении аминокислоты 235, например, Ser228Pro и Leu235Glu (S228P/L235E). В некоторых вариантах константная область IgG4 человека модифицирована в положении аминокислоты Asn297 (нумерация Kabat), чтобы предотвратить гликозилирование антитела, например, Asn297Ala (N297A). В некоторых вариантах осуществления изобретения константная область IgG4 человека модифицирована в положениях аминокислот Ser228, Leu235 и Asn297 (например, S228P/L235E/N297A) (индекс EU, Kabat с соавторами, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest). В других вариантах осуществления изобретения антитело является антителом подкласса IgG4 человека и не имеет гликозилирования. В таких вариантах гликозилирование может быть исключено в результате мутации в положении 297 (нумерация Kabat), например N297A. В других вариантах гликозилирование может быть исключено при продуцировании антитела в клетке-хозяине, которая не обладает способностью к посттрансляционному гликозилированию, например, в системе, полученной на основе бактерий или дрожжей, или в модифицированной системе экспрессии в клетках млекопитающих.

В некоторых вариантах константная область IgG человека модифицирована, чтобы изменить зависимую от антител клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или зависимую от комплемента цитотоксичность (CDC), например, имеет 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): 4005-4010, Shields et al., 2001 JBC, 276(9): 6591-6604; Stavenhagen et al., 2007 Cancer Res, 67(18): 8882-8890; Stavenhagen et al., 2008 Advan. Enzyme Regul., 48: 152-164; Alegre et al, 1992 J. Immunol., 148: 3461-3468; приведенные в обзоре Kaneko and Niwa, 2011 Biodrugs, 25(1):1-11.

В некоторых вариантах константная область IgG человека модифицирована, чтобы индуцировать гетеродимеризацию. Например, при наличии аминокислотной модификации в домене CH3 в положении аминокислоты Thr366, которая может заменена более объемной аминокислотой, например, Try (T366W), он способен предпочтительно спариваться со вторым доменом CH3, имеющим аминокислотные модификации на менее объемные аминокислоты в положениях Thr366, Leu368 и Try407, например, Ser, Ala и Val, соответственно (T366S/L368A/Y407V). Гетеродимеризация посредством модификаций CH3 может быть дополнительно стабилизирована введением дисульфидной связи, например, в результате замены

Ser354 на Cys (S354C) и Y349 на Cys (Y349C) на противоположных доменах CH3 (обзор в Carter, 2001 Journal of Immunological Methods, 248: 7-15).

В других аспектах гликозилирование антитела отсутствует, но антитело не модифицировано в положении аминокислоты Asn297 (нумерация Kabat). В таких вариантах гликозилирование может быть, например, исключено при продуцировании антитела в клетке-хозяине, у которой отсутствует способность к посттрансляционному гликозилированию, например, в системе, полученной на основе бактерий или дрожжей, или в модифицированной системе экспрессии в клетках млекопитающих. В некоторых аспектах такая система может представлять собой БК-систему экспрессии.

В некоторых вариантах анти-CD47-антитело, описанное в настоящей публикации, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотные последовательности, имеющие определенный процент идентичности исходному антителу.

Определение идентичности в процентах между двумя последовательностями (например, аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновой кислоты) может быть осуществлено с использованием математического алгоритма. Не ограничивающим примером математического алгоритма, применяемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм, описанный в Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 2264-2268, модифицированный, как описано в Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873-5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST, Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403. Поиск нуклеотидов BLAST может быть осуществлен с использованием установок параметров в программе NBLAST, например, оценка=100, длина слова=12, чтобы получить нуклеотидные последовательности, гомологичные молекулам нуклеиновых кислот, описанным в настоящей публикации. Поиски белков BLAST могут быть осуществлены с использованием установок параметров в программе XBLAST, например, оценка 50, длина слова=3, чтобы получить аминокислотные последовательности, гомологичные молекуле белка, описанной в настоящей публикации. Чтобы получить выравнивания с пробелами в целях сравнения, можно использовать Gapped BLAST, который описан в Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. Альтернативно, можно использовать PSI BLAST, чтобы осуществить итеративный поиск, который выявляет отдаленные взаимосвязи между молекулами (там же). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI Blast, можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (смотри, например, National Center for Biotechnology Information (NCBI) на веб-сайте в интернете, ncbi.nlm.nih.gov). Другим предпочтительным не ограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers и Miller, 1988, CABIOS 4: 11-17. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета компьютерных программ для выравнивания последовательностей GCG. В случае применения программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу взвешенных остатков PAM120, штраф за длину пробела 12 и штраф за пробел 4.

Идентичность в процентах между двумя последовательностями может быть определена с использованием методик, сходным с методиками, описанными выше, с разрешением или без разрешения пробелов. При вычислении идентичности в процентах обычно посчитывают только точные совпадения.

В некоторых вариантах антитело, описанное в настоящей публикации, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12, при этом антитело специфично связывается с CD47. В некоторых вариантах антитело, описанное в настоящей публикации, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12, при этом антитело специфично связывается с CD47, и при этом антитело содержит CDR (например, CDR 1-3 VL), которые идентичны CDR (например, CDR 1-3 VL) последовательности SEQ ID NO: 12 (например, SEQ ID NO: 17-19).

В некоторых вариантах антитело, описанное в настоящей публикации, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, при этом антитело специфично связывается с CD47. В некоторых вариантах антитело, описанное в настоящей публикации, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, при этом антитело специфично связывается с CD47, и при этом антитело содержит CDR (например, CDR 1-3 VL), которые идентичны CDR (например, CDR 1-3 VL) последовательности SEQ ID NO: 13 (например, SEQ ID NO: 17-19).

В некоторых вариантах антитело, описанное в настоящей публикации, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей

мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, при этом антитело специфично связывается с CD47, и при этом анти-CD47-антитело, в случае получения с использованием бесклеточной системы экспрессии, имеет более высокий титр экспрессируемых антител или выход по сравнению со случаем, когда исходное антитело продуцируется в БК-системе экспрессии. В некоторых вариантах антитело, описанное в настоящей публикации, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, при этом антитело специфично связывается с CD47, и при этом антитело содержит CDR (например, CDR 1-3 VL), которые идентичны CDR (например, CDR 1-3 VL) последовательности SEQ ID NO: 1 (например, SEQ ID NO: 14-16).

В некоторых вариантах антитело, описанное в настоящей публикации, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, при этом антитело специфично связывается с CD47 и при этом анти-CD47-антитело в случае получения с использованием бесклеточной системы экспрессии имеет более высокий титр экспрессируемых антител или выход по сравнению со случаем, когда исходное антитело продуцируется в БК-системе экспрессии. В некоторых вариантах антитело, описанное в настоящей публикации, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, при этом антитело специфично связывается с CD47, и при этом антитело содержит CDR (например, CDR 1-3 VL), которые идентичны CDR (например, CDR 1-3 VL) последовательности SEQ ID NO: 2 (например, SEQ ID NO: 17-19).

В некоторых вариантах антитело, описанное в настоящей публикации, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, при этом антитело специфично связывается с CD47, и при этом анти-CD47-антитело, в случае получения с использованием бесклеточной системы экспрессии, имеет более высокий титр экспрессируемых антител или выход по сравнению со случаем, когда исходное антитело продуцируется в БК-системе экспрессии. В некоторых вариантах антитело, описанное в настоящей публикации или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, при этом антитело специфично связывается с CD47, и при этом антитело содержит CDR (например, CDR 1-3 VL), которые идентичны CDR (например, CDR 1-3 VL) последовательности SEQ ID NO: 3 (например, SEQ ID NO: 17-19).

В некоторых вариантах антитело, описанное в настоящей публикации, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, при этом антитело специфично связывается с CD47 и при этом анти-CD47-антитело, в случае получения с использованием бесклеточной системы экспрессии, имеет более высокий титр экспрессируемых антител или выход по сравнению со случаем, когда исходное антитело продуцируется в БК-системе экспрессии. В некоторых вариантах антитело, описанное в настоящей публикации, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, при этом антитело специфично связывается с CD47, и при этом антитело содержит CDR (например, CDR 1-3 VL), которые идентичны CDR (например, CDR 1-3 VL) последовательности SEQ ID NO: 4 (например, SEQ ID NO: 17-19).

В некоторых аспектах анти-CD47-антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, имеют одну или несколько требуемых характеристик, таких как, в качестве не ограничивающего примера, блокирование взаимодействия между CD47 и его лигандом SIRP α и/или стимуляция (например, индукция или усиление) фагоцитоза без стимуляции (например, индукции или усиления) гемагглютинации эритроцитов, а также противоопухолевая активность. Например, анти-CD47-антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, блокируют по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% взаимодействия между CD47 и SIRP α , по сравнению с уровнем взаимодействия между CD47 и SIRP α в отсутствие анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации.

В конкретных аспектах анти-CD47-антитела, описанные в настоящей публикации, стимулируют

(например, индуцируют или усиливают) фагоцитоз клеток, например, CD47-экспрессирующих клеток (например, клеток CCRF-CEM), например, макрофагами. В одном аспекте уровень фагоцитоза в присутствии анти-CD47-антител, описанных в настоящей публикации, возрастает 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%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 200%, по сравнению с уровнем фагоцитоза в присутствии анти-CD47-антител, описанных в настоящей публикации.

В конкретных аспектах анти-CD47-антитела, описанные в настоящей публикации, не стимулируют (например, не индуцируют или не повышают), или не вызывают значимого уровня агглютинации клеток, например, анти-CD47-антитела, описанные в настоящей публикации, не стимулируют (например, не индуцируют или не повышают) или не вызывают значимого уровня гемагглютинации эритроцитов. В одном аспекте уровень агглютинации в присутствии анти-CD47-антител, описанных в настоящей публикации, снижается 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 анти-CD47 антител, которые как известно, индуцируют агглютинацию, таких как мышьюное антитело MCA911 против CD47 человека (BRIC126). В некоторых аспектах анти-CD47-антитела, описанные в настоящей публикации, не стимулируют (например, не индуцируют или не повышают) или не вызывают значимого уровня агглютинации, если уровень агглютинации в присутствии анти-CD47-антител, описанных в настоящей публикации, снижен 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 анти-CD47-антител, которые, как известно, индуцируют агглютинацию, таких как мышьюное антитело MCA911 против CD47 человека (BRIC126).

Анти-CD47-антитела, описанные в настоящей публикации, также включают моноклональные анти-тела, которые специфично связывают CD47, при этом антитело не стимулирует (например, не индуцирует или не повышает) или не вызывает значимого уровня агглютинации, например, гемагглютинации красных кровяных клеток ("гемагглютинации RBC").

В некоторых аспектах уровень истощения RBC определяют посредством измерения количества RBC у субъекта после введения средства для лечения, например, анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации. В некоторых вариантах анти-CD47-антитела, описанные в настоящей публикации, не стимулируют (например, не индуцируют или не повышают) или не вызывают значимый уровень истощения RBC, если количество RBC у субъекта после введения анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, находится в пределах нормы для здорового субъекта. Например, количество RBC в норме у здорового мужчины составляет примерно от 4,7 до примерно 6,1 миллионов клеток на микролитр образца крови. Например, количество RBC в норме у здоровой женщин составляет от 4,2 до примерно 5,4 миллионов клеток на микролитр образца крови. В некоторых аспектах анти-CD47-антитела, описанные в настоящей публикации, не стимулируют (например, не индуцируют или не повышают) или не вызывают значимого уровня истощения RBC, если количество RBC у субъекта после введения (например, через 5 мин, 10 мин, 30 мин, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 12 часов, 24 часа, 2 дня, 4 дня, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца или больше) анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, составляет по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 или 99,5% от количества RBC перед введением. В конкретных аспектах анти-CD47-антитела, описанные в настоящей публикации, не стимулируют (например, не индуцируют или не повышают) или не вызывают значимого уровня истощения RBC, если количество RBC у субъекта после введения (через 5 мин, 10 мин, 30 мин, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 12 часов, 24 часа, 2 дня, 4 дня, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца или больше) анти-CD47 антитела, описанного в настоящей публикации, составляет по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 или 99,5% от количества RBC у субъекта после введения плацебо (например, наполнителя). Количество RBC определяют стандартными для данной области способами.

В конкретных аспектах анти-CD47-антитела, описанные в настоящей публикации, не стимулируют (например, не индуцируют или не повышают) или не вызывают значимого уровня истощения тромбоцитов. Например, введение анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, приводит к процентному содержанию оставшихся тромбоцитов по меньшей мере 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%.

Также анти-CD47-антитела, описанные в настоящей публикации, включают без ограничения анти-тела, которые не связываются или обладают низкой аффинностью связывания с Fc γ -рецептором (Fc γ R). Например, константная область анти-CD47-антитела, например, в случае получения с использованием БК-системы экспрессии, имеет более низкую аффинность связывания с Fc γ , чем константная область анти-CD47-антитела, например, в случае получения с использованием системы экспрессии в клетке-

хозяине (например, в клетках СНО).

Специалистам в данной области будет понятно, что можно количественно оценить, без излишнего экспериментирования, уровень агглютинации, например, уровень гемагглютинации RBC. Например, специалистам в данной области будет понятно, что уровень гемагглютинации устанавливают, измеряя площадь пятна RBC после осуществления анализа гемагглютинации в присутствии описанных анти-CD47-антител, как описано в примерах ниже. В некоторых случаях, площадь пятна RBC в присутствии анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, сравнивают с площадью пятна RBC в отсутствие анти-CD47-антитела, например, при наличии нулевой гемагглютинации. Таким образом, гемагглютинацию количественно оценивают относительно контрольного исходного уровня. Увеличенная площадь пятна RBC соответствует более высокому уровню гемагглютинации.

Альтернативно также можно использовать денситометрию пятна RBC, чтобы количественно оценить гемагглютинацию.

Специалистам в данной области будет понятно, что можно количественно оценить, без излишнего экспериментирования, уровень истощения RBC. Например, специалистам в данной области будет понятно, что уровень истощения RBC устанавливают, например, измеряя количество RBC (т.е., общее количество RBC в образце крови), например, с использованием счетчика клеток или гемацитометра. Специалистам в данной области будет понятно, что RBC из образца крови перед подсчетом необязательно могут быть выделены посредством фракционирования цельной крови с использованием, например, центрифугирования. В некоторых случаях количество RBC в присутствии анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, сравнивают с количеством RBC в отсутствие CD47-антитела, например, при наличии нулевого истощения RBC. Таким образом, уровень истощения RBC нормализуют относительно контрольного исходного уровня.

В конкретных аспектах анти-CD47-антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, проявляют ингибирующую активность, например, ингибируя экспрессию CD47 (например, ингибируя экспрессию CD47 на поверхности клеток), его активность и/или передачу сигнала, или препятствуя взаимодействию между CD47 и SIRP α . В некоторых аспектах анти-CD47 антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, полностью или частично снижают или иным образом модулируют экспрессию или активность CD47 при связывании или ином взаимодействии с CD47, например, с CD47 человека. Снижение или модулирование биологической функции CD47 является полным, значимым или частичным при взаимодействии между антителами и полипептидом и/или пептидом CD47 человека. Считают, что анти-CD47-антитела, описанные в настоящей публикации, полностью ингибируют экспрессию или активность CD47, когда уровень экспрессии или активности CD47 в присутствии антитела снижается по меньшей мере на 95%, например, на 96, 97, 98, 99 или 100% по сравнению с уровнем экспрессии или активности CD47 в отсутствие взаимодействия, например, связывания с антителом, описанным в настоящей публикации. В конкретном аспекте считают, что анти-CD47-антитела значимо ингибируют экспрессию или активность CD47, когда уровень экспрессии или активности CD47 в присутствии CD47-антитела снижается по меньшей мере на 50%, например, на 55, 60, 75, 80, 85 или 90% по сравнению с уровнем экспрессии или активности CD47 в отсутствие связывания с CD47-антителом, описанным в настоящей публикации. В некоторых аспектах считают, что анти-CD47-антитела частично ингибируют экспрессию или активность CD47, когда уровень экспрессии или активности CD47 в присутствии антитела снижается менее чем на 95%, например, на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 85 или 90% по сравнению с уровнем экспрессии или активности CD47 в отсутствие взаимодействия, например, связывания с антителом, описанным в настоящей публикации.

В конкретных аспектах анти-CD47-антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат один или несколько неприродных аминокислотных остатков в сайт-специфичных положениях. Смотри, например, публикацию заявки на выдачу патента США № US 2014/0046030 A1, которая включена в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме. В конкретных аспектах неприродные аминокислотные остатки в сайт-специфичных положениях создают преимущество в отношении выхода продукции антител, растворимости, аффинности связывания и/или активности. Не ограничивающие примеры неприродных аминокислот были описаны, смотри, например, публикацию заявки на выдачу патента США № US 2014/0066598 A1.

В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагаются анти-CD47-антитела, конъюгированные с конъюгируемым остатком или средством, таким как метка или токсин. Конъюгируемым остатком может быть любой конъюгируемый остаток, который, как полагает специалист в данной области, является полезным. Например, конъюгируемым остатком может быть полимер, такой как полиэтиленгликоль, который может улучшать стабильность антитела *in vitro* или *in vivo*. Конъюгируемый остаток может обладать терапевтической активностью, при этом получают конъюгат антитело-лекарственное средство. Конъюгируемым остатком может быть молекулярной нагрузкой, которая является опасной для клеток-мишеней. Конъюгируемым остатком может быть метка, применимая для выявления или диагностики. В некоторых аспектах конъюгируемый остаток непосредственно связан с антителом ковалентной связью. В некоторых аспектах конъюгируемый остаток связан с антителом через линкер. В конкретных аспектах конъюгируемый остаток или линкер связан через одну из неприродных аминокислот анти-

CD47-антитела. Примеры конъюгируемых остатков и линкеров были описаны, например, смотри публикацию заявки на выдачу патента США № US2014/0046030 A1, которая включена в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме.

5.2. Получение антител

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящей публикации, которые иммunoспецифично связываются с CD47 (например, ECD CD47 человека) могут быть получены любым способом, известным в данной области, например, путем химического синтеза или с использованием основанных на рекомбинации способов экспрессии (например, в БК-системах экспрессии).

В таких способах можно использовать обычные методики молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантной ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и родственных областей в данной области. Такие методики описаны, например, в публикациях, цитированных в настоящем описании, и полно освещенные в литературе. Смотри, например, Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные обновления); Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные обновления) Gait (ed.) (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Birren et al. (eds.) (1999) Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

В конкретных аспектах анти-CD47-антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, могут быть получены с использованием БК-системы экспрессии, например, БК-системы экспрессии, которая известна в данной области, и описана, например, в примерах ниже. Например, БК-системы экспрессии могут содержать бесклеточные экстракты, такие как бесклеточные экстракты S30 с DsB и 20 аминокислотами (например, природными или неприродными), и необязательно, одно или несколько веществ: йодацетамид, глутамат магния, глутамат аммония, глутамат калия, пируват натрия, AMP, GMP, UMP и CMP, оксалат натрия, пуресцин, спермидин, фосфат калия, T7 RNAP и окисленный (GSSG) глутатион. Плазмиды для тяжелой цепи и плазмиды для легкой цепи добавляют непосредственно в композицию БК-экстракта для продукции полипептидов и очистки.

В некоторых аспектах БК-система экспрессии представляет собой систему транскрипции и трансляции *in vitro*, которая описана в публикации Yin et al., mAbs, 2012, 4: 217-225, включенной в виде ссылки в полном объеме. В некоторых аспектах для бесклеточной системы используют бесклеточный экстракт из эукариотической клетки или из прокариотической клетки. В некоторых аспектах прокариотической клеткой является *E. coli*.

В конкретных вариантах для БК-системы экспрессии можно использовать систему, которая описана в публикации заявки на выдачу патента США № US 2014/0315245, которая включена в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме. Например, БК-система экспрессии может содержать бактериальный экстракт, содержащий систему окислительного фосфорилирования и компоненты, необходимые для бесклеточного синтеза белка, и в некоторых вариантах может дополнительно содержать экзогенный белок шаперон, например, протеиндисульфидизомеразу (PDI) или пептид-пролил-цик-транс-изомеразу. В конкретных вариантах PDI является членом семейства Dsb (образование дисульфидной связи) *E. coli*, например, DsbA или DsbC. В некоторых вариантах, БК-система экспрессии содержит клеточный экстракт *E. coli* штамма SBDG028, SBDG031 или SBDG044, которые описаны в публикации заявки на выдачу патента США № US 2014/0315245, который может быть получен, как описано в Zawada et al., Biotechnology and Bioengineering (2011) vol. 108, No. 7.

В конкретных аспектах анти-CD47-антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат аминокислотные модификации, которые позволяют продуцировать антитело с использованием БК-систем экспрессии лучше, чем исходных антител. В конкретном аспекте анти-CD47-антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, которые получены с использованием БК-систем экспрессии, являются агликозилированными.

Моноклональные антитела, например, могут быть получены с использованием широкого множества способов, известных в данной области, включая применение способов на основе гибридомы, рекомбинантов и фагового дисплея или их сочетания. Например, моноклональные антитела могут быть получены с использованием способов на основе гибридом, включая способы, известные в данной области и описанные, например, в Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981). Термин "моноклональное антитело" в используемом в настоящем описании смысле не ограничен антителами, полученными с использованием методики на основе гибридом. Например, моноклональные антитела могут быть получены с использованием рекомбинации из клеток-хозяев, сконструированных так, чтобы они экспрессировали антитело, описанное в настоящей публикации (например, анти-CD47-антитело, содержащее CDR из любого из антител Ab235-Ab255) или его фрагмент, например, легкую цепь и/или тяжелую цепь такого антитела.

Кроме того, антитела, описанные в настоящей публикации, или их антигенсвязывающие фрагменты также могут быть созданы с использованием различных способов фагового дисплея, известных в данной области. В способах фагового дисплея функциональные домены антитела представлены на поверхности фаговых частиц, которые несут кодирующие их полинуклеотидные последовательности. Примеры способов фагового дисплея, которые можно использовать для получения антител, описанных в настоящей публикации, включают способы, описанные в Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184: 177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24: 952-958; Persic et al., 1997, Gene 187: 9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology 57: 191-280; заявке РСТ № РСТ/GB91/01 134; международных публикациях № WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401 и WO97/13844; и в патентах США № 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108.

Антитела, описанные в настоящей публикации, могут, например, включать химерные антитела. Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные части антитела получены из разных молекул иммуноглобулина. Например, химерное антитело может содержать вариабельную область моноклонального антитела мыши или крысы, слитую с константной областью антитела человека. Способы получения химерных антител известны в данной области. Смотри, например, Morrison, 1985, Science 229: 1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al. , 1989, J. Immunol. Methods 125: 191-202; и патенты США № 5807715, 4816567, 4816397, 6331415.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты

Полученные с использованием таких способов, которые описаны в настоящей публикации, можно выделить, используя стандартные, хорошо известные способы. Например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут быть соответствующим образом отделены, например, от культуральной среды, асцитной жидкости, сыворотки, клеточного лизата, веществ в реакционной смеси для синтеза или тому подобного обычными способами очистки иммуноглобулинов, такими как, например, хроматография на белок А-сефарозе, гидроксилапатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография. В используемом в настоящем описании смысле "изолированное" или "очищенное" антитело представляет собой по существу не содержащее клеточного материала или других белков из клеточного или тканевого источника, из которого получают антитело, или по существу не содержащее химических предшественников или других химических веществ в случае химического синтеза, или компонентов БК-системы экспрессии, используемой для получения антител.

Антитела, описанные в настоящей публикации, включают фрагменты антител, которые узнают специфичные антигены CD47, и могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области. Например, Fab- и F(ab')₂-фрагменты, описанные в настоящей публикации, могут быть получены протеолитическим расщеплением молекул иммуноглобулина с использованием таких ферментов, как папаин (чтобы получить Fab-фрагменты) или пепсин (чтобы получить F(ab')₂-фрагменты). Fab-фрагмент соответствует одному из двух плеч молекулы антитела и содержит полную легкую цепь, спаренную с VH и доменами CH1 тяжелой цепи. F(ab')₂-фрагмент содержит два антигенсвязывающих плеча молекулы антитела, связанных дисульфидными связями в шарнирной области. Альтернативно, фрагменты антител, описанные в настоящей публикации, могут быть получены обычным образом хорошо известными способами экспрессии рекомбинантов. Смотри, например, публикацию РСТ № WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, BioTechniques 12(6): 864-869; Sawai et al., 1995, AJRI 34: 26-34; и Better et al., 1988, Science 240: 1041-1043.

Антитела, описанные в настоящей публикации, могут, например, включать гуманизированные антитела, например, деиммунизированные или составные антитела человека.

Гуманизированное антитело может содержать последовательности константной области человека. В некоторых вариантах гуманизированное антитело может быть выбрано из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE и любой изотип, включая IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. В некоторых вариантах гуманизированное антитело может содержать константные последовательности легкой цепи каппа или лямбда.

Гуманизированные антитела могут быть получены с использованием множества способов, известных в данной области, включая без ограничения CDR-прививки (европейский патент № EP 239400; международная публикация № WO 91/09967; и патенты США № 5225539, 5530101 и 5585089), винирование или изменение поверхности (европейские патенты № EP 592106 и EP 519596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7(6): 805-814; и Roguska et al., 1994, PNAS 91: 969-973), перетасовку цепей (патент США № 5565332) и способы, описанные, например, в патенте США № 6407213, патенте США № 5766886, WO 9317105, Tan et al. , J. Immunol. 169: 1119 25 (2002), Caldas et al., Protein Eng. 13(5): 353-60 (2000), Morea et al., Methods 20(3): 267 79 (2000), Baca et al., J. Biol. Chem. 272(16): 10678-84 (1997), Roguska et al., Protein Eng. 9(10): 895 904 (1996), Couto et al., Cancer Res. 55 (23 Supp): 5973s- 5977s (1995), Couto et al., Cancer Res. 55(8): 1717-22 (1995), Sandhu JS, Gene 150(2): 409-10 (1994) и Pedersen et al., J. Mol. Biol. 235(3): 959-73 (1994). Смотри также публикацию патента США № US 2005/0042664 A1 (Feb. 24, 2005), при том каждая из публикаций включена в настоящее

описание в виде ссылки в полном объеме.

Антитела, описанные в настоящей публикации, могут быть, например, полиспецифичными, например, биспецифичными антителами. Способы получения полиспецифичных (например, биспецифичных антител) описаны, смотри, например, патенты США № 7951917, 7183076, 8227577, 5837242, 5989830, 5869620, 6132992 и 8586713.

Однодоменные антитела, например, антитела, не имеющие легких цепей, могут быть получены способами, хорошо известными в данной области. Смотри Riechmann et al., 1999, J. Immunol. 231: 25-38; Nuttall et al., 2000, Curr. Pharm. Biotechnol. 1(3): 253-263; Muylderman, 2001, J. Biotechnol. 74(4) : 277302; патент США № 6005079; и международные публикации № WO 94/04678, WO 94/25591 и WO 01/44301.

Антитела человека могут быть получены с использованием любого способа, известного в данной области. Например, можно использовать хорошо известных трансгенных мышей, которые неспособны экспрессировать функциональные эндогенные мышиные иммуноглобулины, но которые могут экспрессировать гены иммуноглобулинов человека. Альтернативно, можно использовать, например, способы фагового дисплея, описанные выше. Кроме того, в некоторых вариантах антитела человека могут быть получены, например, с использованием гибридом мыши-человека. Например, лимфоциты периферической крови человека, трансформированные вирусом Эпштейн-Барр (EBV), могут быть слиты с клетками миеломы мыши, чтобы получить гибридомы мыши-человека, секретирующие моноклональные антитела человека, и такие гибридомы мыши-человека могут быть подвергнуты скринингу, чтобы определить гибридомы, которые секрецируют моноклональные антитела человека, которые иммunoспецифично связываются с антигеном-мишенью (например, ECD CD47 человека). Такие способы известны и описаны в данной области, смотри, например, Shinmoto et al., Cytotechnology, 2004, 46: 19-23; Naganawa et al., Human Antibodies, 2005, 14: 27-31.

Вариабельные домены антител с требуемыми специфичностями связывания (участками связывания антитело-антigen) могут быть слиты с последовательностями константных доменов иммуноглобулинов. Предпочтительно слияние с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим по меньшей мере, часть шарнира, области CH2 и CH3. Предпочтительно наличие первой константной области тяжелой цепи (CH1), содержащей участок, необходимый для связывания легкой цепи, присутствующий по меньшей мере, в одном из слияний. ДНК, кодирующие слияние с тяжелой цепью иммуноглобулина, и при необходимости, легкой цепью иммуноглобулина, встраивают в отдельные экспрессирующие векторы, и векторами совместно трансформируют подходящий организм хозяина. Подробности создания биспецифичных антител смотри, например, в Suresh et al. , Methods in Enzymology, 121: 210 (1986).

Согласно другому способу, описанному в WO 96/27011, область контакта между парой молекул антител может быть сконструирована так, чтобы максимизировать процентное содержание гетеродимеров, которые извлекают из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительная область контакта содержит, по меньшей мере, часть области CH3 константного домена антитела. В таком способе, одну или несколько небольших боковых цепей аминокислот из области контакта первой молекулы антитела заменяют более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). Компенсирующие "впадины" идентичного или меньшего размера, чем крупная боковая цепь(цепи) создают на области контакта второй молекулы антитела. Заменяя крупные боковые цепи аминокислот меньшими по размеру боковыми цепями (например, аланином или треонином). Таким образом обеспечивается механизм увеличения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Биспецифичные антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифичные $F(ab')_2$ -антитела). Способы создания биспецифичных антител из фрагментов антител описаны в литературе. Например, биспецифичные антитела могут быть получены с использованием химического связывания. Brennan с соавторами (Science 229: 81 (1985)) описывают способ, в котором интактные антитела протеолитически расщепляют, чтобы создать фрагменты $F(ab')_2$. Такие фрагменты восстанавливают в присутствии средства, образующего комплексы с дитиолом, арсенита натрия, чтобы стабилизировать локальные дитиолы и предотвратить образование межмолекулярных дисульфидов. Затем созданные Fab' -фрагменты превращают в производные тионитробензоата (TNB). Затем один из Fab' -TNB-производных снова превращают в Fab' -тиол восстановлением с использованием меркаптоэтиламина и смешивают с эквимолярным количеством другого Fab' -TNB-производного, чтобы образовать биспецифичное антитело. Полученные биспецифичные антитела могут быть использованы в качестве средств для селективной иммобилизации ферментов.

5.2.1. Полинуклеотиды, клетки и векторы

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предлагаются полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, описанное в настоящей публикации, или его фрагмент (например, вариабельную область легкой цепи и/или вариабельную область тяжелой цепи), которая иммunoспецифично связывается с антигеном CD47, и векторы, например, векторы, содержащие такие полинуклеотиды, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, E. coli и клетках млекопитающих). В некоторых аспектах в настоящем изобретении предлагаются клетки (например, клетки-хозяева). Также в настоящем изобретении предлагаются способы получения антитела и антиген-

связывающих фрагментов, описанных в настоящей публикации.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предлагаются полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или тяжелую цепь антитела, описанного в настоящей публикации. В некоторых вариантах в настоящем изобретении предлагаются полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь и тяжелую цепь антитела, описанного в настоящей публикации. Полинуклеотиды могут содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь, содержащую FR и CDR VL антител, описанных в настоящей публикации. Полинуклеотиды могут содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь, содержащую FR и CDR VH антител, описанных в настоящей публикации. В конкретных вариантах полинуклеотид, описанный в настоящей публикации, кодирует область цепи VL SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 13 без аминокислоты M на N-конце. В конкретных вариантах полинуклеотид, описанный в настоящей публикации, кодирует область цепи VH с любой из последовательностей SEQ ID NO: 5-11, 20-22. В конкретных вариантах полинуклеотид, описанный в настоящей публикации, кодирует легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В конкретных вариантах полинуклеотид, описанный в настоящей публикации, кодирует тяжелую цепь, содержащую любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 5-11.

В конкретных вариантах полинуклеотид, описанный в настоящей публикации, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в табл. 2, кодирующую легкую цепь или тяжелую цепь анти-CD47-антитела, предлагаемого в настоящем изобретении.

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности VH и VL анти-CD47-антитела

| SEQ ID NO: | Нуклеотидные последовательности |
|------------|--|
| 26 | <p>Анти-CD47 IgG1-13m HC:</p> <p>ATGCAAGTCCAATTGGTCCAGAGCGGTGCGGAAGTCAAGAAACCGGGTGCAAGCG TCAAAGTTCTGTGCAAGGCGAGCGGTTCAATATCAAAGACTATTATCTGCACTG GGTCGTAGGCTCCGGCCAAGGCCTGGAGTGGATGGGTTGGATCGATCCGGAC CAGGGCGACACGGAGTACGCTCAGAAGCTGCAGGGTCGTGTTACCATGACCACCG ACACCAAGCAGCAGCACCGGTACATGGAACCTGCGCTCTCGCTCGGATGATA CGCGGTGTACTATTGCAACGCCCGTACGGTAGCAGCAGCTATCCGATGGATTAT TGGGGTCAAGGCACTACGGTAGCTGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCGTCCG TGTTTCCGCTGGGCCAAGCTCCAAGAGCACCAGCGGTGGCACGGCCGACTGGG TTGTCTGGAAAAGATTACTTTCTGAGCCGGTGACCGTGAGCTGAAATTAGGT GCACTGACGTCCGGCGTTCACACGTTCCGGCAGTTCTGCAGAGCTCCGGTTGT ACAGCCTGTCTAGCGTCGTGACGGTGCCGAGCAGCAGCCTGGTACCCAAACCTA CATTGCAACGTTAACATAAGCCGAGCAATACCAAAGTTGACAAGAAAGTCGAA CCTAAGAGCTGTGATAAGACGCATACCTGTCCGCCGTGCCCGAACCGGAACGT TGGCGGTCCGAGCGTGTTCCTGTTCCGCGAAGCCGAAAGATAACCTGATGAT</p> |

| | |
|----|---|
| | <p>TAGCCGCACCCCTGAGGTGACGTGCGTGGTTGAGGACGTTAGCCATGAGGATCCA GAGGTCAAATTCAATTGGTATGTCGATGGTGGAGGTTACAATGCCAAGACCA AACCGCGTGAAGAACAGTACAATAGCACCTACCGCGTGGTGAGCGTGCAGCGT CCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGTAAAGTCAGCAACAAG GCGCTGCCAGCACCAGATTGAAAAGACCATTCTAAAGCGAAAGGTAGCCCGCTG AGCCGCAAGTCTATACCCCTGCCGCCGTCGCGATGAGCTGACTAAAACCAGGT TAGCCTGACGTGCCTGGTAAAGGTTCTACCCGAGCGACATCGCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGTCAACCCGAGAATAACTACAAAACCACCCACCAGTCTGGACT CCGATGGCAGCTTCTTCTGTACTCTAAACTGACCGTTGACAAAAGCCGTTGGCA ACAGGGCAACGTCTTAGCTGCAGCGTGTGACATGAGGCTCTGCACAACCACACTAC ACCCAAAATCCCTGAGCCTGAGCCCGGGTAAGTAA</p> |
| 27 | <p>Анти-CD47 IgG1-13mZ HC:</p> <p>ATGCAAGTCCAATTGGTCCAGAGCGGTGCGGAAGTCAAGAAACCGGGTGCAAGCG TCAAAGTTTCGTGCAAGGCAGCGGTTCAATATCAAAGACTATTATCTGCACTG GGTCGTAGGCTCCGGCCAAGGCCTGGAGTGGATGGATGGATCGATCCGGAC CAGGGCGACACGGAGTACGCTCAGAAGCTGCAGGGTCGTGTTACCATGACCACCG ACACCAGCACGAGCACCGCGTACATGGAACCTGCCTCTCGTGGATGATAC CGCGGTGTAATTGCAACGCCGCGTACGGTAGCAGCAGCTATCCGATGGATTAT TGGGGTCAAGGCACTACGGTAGCTCAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCGTCG TGTTCGCTGGCGCCAAGCTCCAAGAGCACCGAGCGTGGCACGGCGCACTGGG TTGTCTGGTAAAGATTACTTCCTGAGCCGGTGACCGTGAGCTGGAATTAGGT GCACTGACGTCCGGCGTACACGTTCCGGAGCTCTGAGAGCTCCGGTTGT ACAGCCTGTCTAGCGTCGTGACGGTGCGAGCAGCAGCTGGTACCCAAACCTA CATTGCAACGTTAACCTAACGCCAGCAATACCAAGGGTGACAAAAAAAGTTGAA CCGAAATCTGTGATAAAACTCATACCTGTCCGCCGTGCCGGCGCTGAGCTGT TGGGTGGTCCGTCGGTCTTCTGTTCCGCCGAAGGCCAGACACCCTGATGAT TAGCCGCACCCCGGAAGTTACGTGCGTCGTGGATGTCAGCCACGAGGACCG GAGGTTAAGTCAATTGGTATGTCGATGGCGTGGAGGTTACAACCGGAAACCA AGCCGCGTGGAGAACAAATACAATAGCACGTATCGCGTAGTGAGCGTGCACCGT GCTGCACCAAGATTGGCTGAATGGTAAAGAACAGTACAAGTGCAAAGTGAGCAACAAG GCATTGCCGGCACCGATCGAAAAGACGATCAGCAAAGCGAAAGGCCAACCGCGT AACCGCAGGTCTATACCCCTGCCGCCGAGCCGTGAAGAAATGACGAAAAACCAAGT TAGCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGTTTACCCGAGCGACATCGCCGTGAGTGG GAGTCTAACGGCCAGCCGGAAAACAATTACAAAACCACGCCAGTCCTGGACA GCGACGGTAGCTTCTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTCGATAAAAGCCGTTGGCA</p> |

| | |
|----|--|
| | GCAGGGTAATGTGTTAGCTGCAGCGTTATGCATGAGGCCTGCACAATCACTAT ACCCAGAAATCCTGTCCCTGTCCCCGGTAAGTAA |
| 28 | Анти-CD47 IgG1-5m HC: ATGCAAATGCAATTGGTACAAAGCGGTGCGGAAGTAAAGAAACCGGGTCTCGG TAAAGGTTAGCTGTAAAGCTCTGGCTTCATATCAAGGATTACTATCTGCACTG GGTGCCTCAGGCGCCAGGTCAAGCCTTGGATGGATGGCTGGATTGACCCGGAT CAAGGTGACACCGAATATGCCAAAAGTTCAAGGCTGTGACCATCACCGTG ACCGTAGCACCTCCACCGCATATATGGAGCTGCGTAGCCTGCGCAGCGAAGATAC TGCCTGTATTACTGCAATGCGCCTATGGTAGCAGCTCTATCCGATGGATTAC TGGGCCAGGGTACACGGTAGCGGTTAGCAGCGAAGCACCAAGGGCCCGAGCG TTTCCCTCTGGCGCCGAGCAGCAAAGCACTAGCGGCGTACGGCAGCCCTGG TTGTCTGGTAAAGATTACTTCCGAACCGTTACCGTGTCTGGAACTCTGGC GCGCTGACCAGCGGTGTTCACACGTTCCGGCGTTCTGCAGAGCAGCGTCTGT ATTCTTGAGCTCCGTCGTCACCGTCCGTCTAGCTCGTGGCACGACAGCTA CATCTGCAATGTTAACATAAGCCGAGCAATACCAAAGTTGACAAGAAAGTCGA CTTAAGAGCTGTGATAAGACGCATACCTGTCCGCCGTGCCGGCACCGGAACTGT TGGCGGTCCGAGCGTGTCTGTTCCGCCAAGCGAAAGATAACCTGATGAT TAGCCGCACCCCTGAGGTGACGTGCGTGGTGTGGACGTTAGCCATGAGGATCCA GAGGTCAAATTCAATTGGTATGTCGATGGTGTGAGGTTACAATGCCAAGACCA AACCGCGTGAAGAACAGTACAATAGCACCTACCGCGTGGTGACGCTGACGGT CCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGTAAAGTCAGCAACAAG GCGCTGCCAGCACCGATTGAAAAGACCATTCTAAAGCGAAAGGTCAGCCGCGTG AGCCGCAAGTCTACCCCTGCCGCCGCGATGAGCTGACTAAAAACCAGGT TAGCCTGACGTGCCTGGTAAAGGTTCTACCGAGCGACATCGCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGTCAACCGGAGATAACTACAAAACCACCCACCGGTCTGGACT CCGATGGCAGCTTCTTCTGTACTCTAAACTGACCGTTGACAAAAGCCGTTGGCA ACAGGGCAACGTCTTAGCTGAGCGTATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACCCAAAAATCCCTGAGCCTGAGCCCGGGTAAGTAA |
| 29 | Анти-CD47 IgG4-13m HC: ATGCAAGTCCAATTGGTCCAGAGCGGTGCGGAAGTCAAGAAACCGGGTCAAGCG TCAAAGTTCTGTGCAAGGCAGCGGTTCAATATCAAAGACTATTATCTGCACTG GGTCGTCAAGGCTCCGGCCAAGGCCTGGAGTGGATGGTGGATCGATCCGGAC CAGGGCGACACGGAGTAGCCTCAGAAGCTGCAGGGCTGTGTTACCATGACCACCG ACACCAGCACGAGCACCGCGTACATGGAACTGCGCTCTGCCTCGGATGATAC CGCGGTGTACTATTGCAACGCCCGTACGGTAGCAGCAGCTATCCGATGGATTAT |

| | |
|----|--|
| | <p>TGGGGTCAAGGCAC TACGGTACTGTCAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCGTCTG TGTTCCGTTGGCACCGTGCAGCGTAGCACTAGCGAATCCACTGCAGCGCTGG TTGCCTGGTTAAGGACTATTCGGAGCCGGTTACCGTGTCTGGAACTCTGGC GCCCTGACCAGCGGTGTTACACGTTCCAGCCGTCCTGCAGAGCAGCGGTCTGT ACAGCCTGAGCTCGGTGGTGACCGTTCCAGCAGCTCTGGTACCAAAACCTA TACCTGTAATGTCGATCACAAACCGTCTAACACGAAGGTGATAAACGTGTTGAA AGCAAGTACGGTCCGCCCTGTCCGCCGTGCCGGCACCGGAGTTCTGGCGGTC CGTCCGTATTCCCTGTTCCGCCGAAACGAAAGATACTTGATGATTAGCCGTAC GCCAGAGGTACGTGCGTCGTGGTGACGTTAGCCAAGAGGATCCGGAAGTCAA</p> |
| 30 | <p>Анти-CD47 IgG4P-5m HC:</p> <p>ATGCAAATGCAATTGGTACAAAGCGGTGCGGAAGTAAAGAAACCGGGTCGTGG TAAAGGTTAGCTGTAAGCTCTGGCTCAATATCAAGGATTACTATCTGCACTG GGTGCGTCAGGCGCCAGGTCAAGGCCCTGGAATGGATGGCTGGATTGACCCGGAT CAAGGTGACACCGAATATGCCAAAAGTTCAAGGTGCTGTGACCATCACCCGTG ACCGTAGCACCTCCACCGCATATGGAGCTGCGTAGCCTGCGCAGCGAAGATAC TGCAGGTGATTACTGCAATGCGGCCTATGGTAGCAGCTCTATCGATGGATTAC TGGGGCCAGGGTACCAAGGTGACGGTTAGCAGCGCAAGCACCAAGGGCCCGTCTG TTGTTCCGTTGGCACCGTGCAGCGTAGCACTAGCGAATCCACTGCAGCGCTGG TTGCCTGGTTAAGGACTATTCGGAGCCGGTTACCGTGTCTGGAACTCTGGC GCCCTGACCAGCGGTGTTACACGTTCCAGCCGTCCTGCAGAGCAGCGGTCTGT ACAGCCTGAGCTCGGTGGTGACCGTTCCAGCAGCTCTGGTACCAAAACCTA TACCTGTAATGTCGATCACAAACCGTCTAACACGAAGGTGATAAACGTGTTGAA AGCAAGTACGGTCCGCCCTGTCCGCCGTGCCGGCACCGGAGTTCTGGCGGTC CGTCCGTATTCCCTGTTCCGCCGAAACGAAAGATACTTGATGATTAGCCGTAC GCCAGAGGTACGTGCGTCGTGGTGACGTTAGCCAAGAGGATCCGGAAGTCAA</p> |

| | |
|----|---|
| | TTCAACTGGTACGTGGACGGTGTGAGGTGCACAATGCCAAACCAAGCCGCGTG AAGAACAGTTAACAGCACTTACCGCGTCGTTAGCGTCCTGACCGTGCACCA AGATTGGCTGAATGGTAAAGAGTACAAGTGAAGGTTAGCAATAAGGGTCTGCCG AGCAGCATCGAGAAAACCATTAGCAAGGCAGAAGGTCAACCGCGAGGCCACAGG TCTACACGCTGCCGCCAGCCAAGAAGAAATGACCAAAATCAGGTTAGCCTGAC TTGTCTGGTGAAGGCTCTACCGAGCGATATTGCAGTTGAATGGGAGAGCAAC GGCCAGCCTGAGAACAACTATAAGACGACCCGCCAGTGCTGGACAGCGATGGCA GCTTCTTTGTATTCTCGTCTGACCGTGGACAAGTCCCCTGGCAAGAGGGCAA TGTGTTAGCTGTTCTGTCATGCACGAAGCGCTGCATAACCATTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGTCGCTGGCAAATAA |
| 31 | Анти-CD47 IgG4PE-13m HC: ATGCAAGTCCAATTGGTCCAGAGCGGTGCGGAAGTCAAGAAACCGGGTCAAGCG TCAAAGTTCTGTCAAGGCAGCGGTTCAATATCAAAGACTATTATCTGCACTG GGTCGTCAAGGCTCCGGCCAAGGCCTGGAGTGGATGGATGGATCGATCCGGAC CAGGGCGACACGGAGTACGCTCAGAAGCTGCAGGGTCGTGTTACCATGACCACCG ACACCCAGCAGCAGCACCGCGTACATGGAACTGCGCTCTCGTGGATGATAC CGCGGTGTACTATTGCAACGCCCGTACGGTAGCAGCAGCTATCCGATGGATTAT TGGGGTCAAGGCACTACGGTAGCTGTCAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCGCTG TGTTCCGTTGGCACCGTGCAGCGTAGCACTAGCGAATCCACTGCAGCGCTGG TTGCCTGGTTAAGGACTATTCCCGAGCCGGTACCGTGTGCTGGAACTCTGGC GCCCTGACCAGCGGTGTTCACACGTTCCAGCCGTCCTGCAGAGCAGCGGTCTG ACAGCCTGAGCTCGGTGGTACCGTCCGAGCAGCTCTGGTACCAAAACCTA TACCTGTAATGTCGATCACAAACCGTCTAACACGAAGGTCGATAAACGTGTTGAA AGCAAGTACGGTCCGCCCTGTCCCGCGTGCACCGGAGTTGAGGGCGGTC CGTCCGTATTCCTGTTCCCGCCAAACGAAAGATACTTGATGATTAGCCGTAC GCCAGAGGTACCGTGCCTGCGTGGTGGACGTTAGCCAAGAGGATCCGGAAGTCAA TTCAACTGGTACGTGGACGGTGTGAGGTGCACAATGCCAAACCAAGCCGCGTG AAGAACAGTTAACAGCACTTACCGCGTCGTTAGCGTCCTGACCGTGCACCA AGATTGGCTGAATGGTAAAGAGTACAAGTGAAGGTTAGCAATAAGGGTCTGCCG AGCAGCATCGAGAAAACCATTAGCAAGGCAGAAGGTCAACCGCGAGGCCACAGG TCTACACGCTGCCGCCAGCCAAGAAGAAATGACCAAAATCAGGTTAGCCTGAC TTGTCTGGTGAAGGCTCTACCGAGCGATATTGCAGTTGAATGGGAGAGCAAC GGCCAGCCTGAGAACAACTATAAGACGACCCGCCAGTGCTGGACAGCGATGGCA GCTTCTTTGTATTCTCGTCTGACCGTGGACAAGTCCCCTGGCAAGAGGGCAA TGTGTTAGCTGTTCTGTCATGCACGAAGCGCTGCATAACCATTACACCCAGAAG |

| | |
|----|--|
| | TCCCTGAGCCTGTCGCTGGCAAATAA |
| 32 | <p>Анти-CD47 IgG4PE-5m HC:</p> <p>ATGCAAATGCAATTGGTACAAAGCGGTGCGGAAGTAAAGAAACCGGGTCGTCGG TAAAGGTTAGCTGTAAAGCTCTGGCTTCATATCAAGGATTACTATCTGCACTG GGTCGTCAGGCGCCAGGTCAAGGCCTTGAATGGATGGCTGGATTGACCCGGAT CAAGGTGACACCGAATATGCCAAAAGTTCAGGGTCGTGTGACCATCACCGTG ACCGTAGCACCTCCACCGCATATGGAGCTGCGTAGCCTGCGCAGCGAAGATA TGCAGGTGATTACTGCAATGCGCCTATGGTAGCAGCTCCTATCCGATGGATTAC TGGGCCAGGGTACCAACGGTAGCAGCGCAAGCACCAAGGGCCGCTG TGTTCGCTGGCACCGTGCAGCGTAGCAGCAATCCACTGCAGCGCTGG TTGCCTGGTTAAGGACTATTCCCGAGCCGGTTACCGTGTCTGGAACTCTGGC GCCCTGACCAGCGGTGTTCACACGTTCCAGCCGTCTGCAGAGCAGCGCTGT ACAGCCTGAGCTCGGTGGTAGCGTCCGAGCAGCTCTGGTACCAAAACCTA TACCTGTAATGTCGATCACAAACCGTCTAACACGAAGGTGATAAACGTGTTGAA AGCAAGTACGGTCCGCCTGTCCGCCGTGCCGGCACCGGAGTTGAGGGCGTC CGTCCGTATTCCTGTTCCCGCAAACCGAAAGATACTTGATGATTAGCCGTAC GCCAGAGGTACGTGCGTGTGGACGGTAGCAGGATCGGAAGTCCAA TTCAACTGGTACGTGGACGGTAGCAGGTCACAATGCCAAAACCAAGCCGCGTG AAGAACAGTTAACAGCACTTACCGCGTCGTTAGCGTCTGACCGTGTGCACCA AGATTGGCTGAATGGTAAAGAGTACAAGTGCAAGGTTAGCAATAAGGGTCTGCCG AGCAGCATCGAGAAAACCATTAGCAAGGCAGGTCACCGCGAGGCCACAGG TCTACACGCTGCCGCCAGCCAAGAAGAAATGACCAAAATCAGGTAGCCTGAC TTGTCTGGTAAAGGCTCTACCGAGCGATATTGAGCTGAATGGGAGAGCAAC GGCCAGCCTGAGAACAACTATAAGACGACCCGCCAGTGTGGACAGCGATGGCA GCTTCTTTGTATTCTCGTCTGACCGTGGACAAGTCCGTTGGCAAGAGGGCAA TGTGTTCAGCTGTCTGTCATGCACGAAGCGCTGCATAACCATTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGTCGCTGGCAAATAA</p> |
| 33 | <p>Анти-CD47 IgK:</p> <p>ATGAACATCCAAATGACTCAATCCCCATCCGCAATGTCCGCATCCGTAGGTGACC GCGTGACCATCACGTGCAAGGCAGCCAGGATATTCATCGTTATCTGAGCTGGTT TCAACAGAAACCGGGCAAGGTTCTAACGCATCTGATTACCGCGCAACCGCTTG GTAGCGGTGTTCCGAGCGTTAGCGGCAGCGGTTCTGGCACCGAGTTCACCC TGACGATCTCCAGCCTGCAACCGGAAGATTGCGACGTACTACTGCCTGAGTA TGACGAGTTCCCGTATAACTTGGTGGTACGAAGGTGGAAATCAAACGTACT GTGGCCGCTCCGAGCGTTTCATTTCGCGCTGGATGAGCAATTGAAATCTG</p> |
| | <p>GTACCGCGAGCGTCGTTGTCTGCTGAACAATTCTACCGCGTGAGGCTAAGGT GCAATGGAAGGTCGATAACCGCGTCAGAGCGGTAATAGCCAGGAAAGCGTCACC GAACAGGATAGCAAAGACAGCACCTACTCTTGAGCAGCACCTGACCGTGA AGGCCGACTATGAGAAACACAAAGTTACGCATGTGAGGTACGCACCGAGGCCT GAGCAGCCGGTGACCAAAGCTCAATCGTGGCGAATGCTAA</p> |

В некоторых вариантах в настоящем изобретении предлагается полинуклеотид, оперативно связанный с промотором для экспрессии такой полинуклеотидной последовательности в клетке-хозяине. В некоторых вариантах промотор получен из генома клеток млекопитающих (например, промотор металло-

тионеина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса, промотор 7,5К вируса вакцинии). В конкретном варианте экспрессия нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела, описанные в настоящей публикации, регулируется конститутивным промотором, индуцируемым промотором или тканеспецифичным промотором.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагается полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, содержащее легкую цепь и тяжелую цепь, например, отдельную легкую цепь и тяжелую цепь. Что касается легкой цепи, то в конкретном варианте полинуклеотид, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь каппа. В другом конкретном варианте полинуклеотид, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь лямбда. В другом конкретном варианте полинуклеотид, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, описанное в настоящей публикации, содержащее легкую цепь каппа человека или легкую цепь лямбда человека. Например, последовательность константных областей человека могут представлять собой последовательности, описанные в патенте США № 5693780.

В конкретном варианте полинуклеотид, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, описанное в настоящей публикации, которое иммунноспецифично связывается с полипептидом CD47, при этом антитело содержит тяжелую цепь, при этом константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи гамма (γ) человека, например, константной области тяжелой цепи гамма (γ) 1 человека, константной области тяжелой цепи гамма (γ) 2 человека, константной области тяжелой цепи гамма (γ) 3 человека или константной области тяжелой цепи гамма (γ) 4 человека.

5.2.2. Клетки и векторы

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предлагаются клетки (например, клетки-хозяева), экспрессирующие (например, рекомбинантно) антитела, описанный в настоящей публикации (или их антигенсвязывающие фрагменты), которые специфично связываются с CD47 и родственными полинуклеотидами, и экспрессирующие векторы, например, полинуклеотиды и экспрессирующие векторы, подходящие для применения в БК-системах экспрессии. В настоящем изобретении предлагаются векторы (например, экспрессирующие векторы), содержащие полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие анти-CD47 антитела или фрагмент, для экспрессии рекомбинантов в БК-системах экспрессии. В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагаются способы получения анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, включающие в себя экспрессию такого антитела с использованием БК-системы экспрессии, например, в условиях, приводящих к повышенному титру экспрессии или выходу антител.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предлагаются векторы (например, экспрессирующие векторы), содержащие полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие анти-CD47 антитела или фрагмент, для экспрессии рекомбинантов в клетках-хозяевах, например, в клетках млекопитающих. Также в настоящем изобретении предлагаются клетки-хозяева, содержащие такие векторы, для рекомбинантной экспрессии анти-CD47-антител, описанных в настоящей публикации (например, антитела человека или гуманизированного антитела). В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагаются способы получения антитела, описанного в настоящей публикации, включающий в себя экспрессию такого антитела с использованием клеток-хозяев.

Рекомбинантная экспрессия антитела, описанного в настоящей публикации (например, полноразмерного антитела, тяжелой и/или легкой цепи антитела или одноцепочечного антитела, описанного в настоящей публикации), которое специфично связывается с CD47, заключается в конструировании экспрессирующего вектора, содержащего полинуклеотид, который кодирует антитело. После получения полинуклеотида, кодирующего молекулу антитела, тяжелую и/или легкую цепь антитела или его фрагмент (например, вариабельные домены тяжелой и/или легкой цепи), описанных в настоящей публикации, может быть получен вектор для продукции молекулы антитела с использованием методики рекомбинантной ДНК способами, хорошо известными в данной области. Таким образом, способы получения белка посредством экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь) описаны в настоящей публикации. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области, можно применять для конструирования экспрессирующих векторов, содержащих последовательности, кодирующие антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь), и соответствующие сигналы регуляции транскрипции и трансляции. Такие способы включают, например, методики рекомбинантной ДНК *in vitro*, способы синтеза и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Также предлагаются реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, описанного в настоящей публикации, тяжелую или легкую цепь антитела, вариабельный домен тяжелой или легкой цепи антитела или его фрагмента, или CDR тяжелой или легкой цепи, оперативно связанную с промотором. Такие векторы могут, например, содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую

шую константную область молекулы антитела (смотри, например, международные публикации № WO 86/05807 и WO 89/01036; и патент США № 5122464), и вариабельные домены антитела могут быть клонированы в таком векторе для экспрессии полной тяжелой, полной легкой цепи, или обеих полных тяжелой и легкой цепей.

Экспрессирующий вектор может быть перенесен в клетку (например, в клетку-хозяина) обычными способами, и затем полученные клетки можно культивировать обычными способами, чтобы получить антитело, описанное в настоящей публикации или его фрагмент. Таким образом, в настоящем изобретении предлагаются клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело, описанное в настоящей публикации, или его фрагменты, или его тяжелую или легкую цепь или их фрагмент, или одноцепочечное антитело, описанное в настоящей публикации, оперативно связанный с промотором для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. В некоторых вариантах для экспрессии двухцепочечных антител, векторы, кодирующие и тяжелую и легкую цепи, отдельно, могут быть коэкспрессированы в клетке-хозяине для экспрессии полной молекулы иммуноглобулина, как подробно описано ниже. В некоторых вариантах клетка-хозяин содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий и тяжелую цепь и легкую цепь антитела, описанного в настоящей публикации или его фрагмента. В конкретных вариантах клетка-хозяин содержит два разных вектора, первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или вариабельную область тяжелой цепи антитела, описанного в настоящей публикации, или его фрагмента, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или вариабельную область легкой цепи антитела, описанного в настоящей публикации, или его фрагмента. В других вариантах первая клетка-хозяин содержит первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или вариабельную область тяжелой цепи антитела, описанного в настоящей публикации, или его фрагмента, а вторая клетка-хозяин содержит второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или вариабельную область легкой цепи антитела, описанного в настоящей публикации. В конкретных вариантах тяжелая цепь/вариабельная область тяжелой цепи, экспрессированная первой клеткой, ассоциирует с легкой цепью/вариабельной областью легкой цепи второй клетки с образованием анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах в настоящем изобретении предлагаются популяция клеток-хозяев, содержащая такую первую клетку-хозяина и такую вторую клетку-хозяина.

В конкретном варианте в настоящем изобретении предлагаются популяция векторов, содержащая первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/вариабельную область легкой цепи анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/вариабельную область тяжелой цепи анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации.

Множество систем хозяин-экспрессирующий вектор можно применять для экспрессии молекулы антитела, описанного в настоящей публикации (смотри, например, патент США № 5807715). Такие системы хозяин-экспрессирующий вектор представляют собой носители, с помощью которых могут быть получены и затем очищены представляющие интерес кодирующие последовательности, а также представляют собой клетки, которые при трансформации или трансфекции соответствующими кодирующими нуклеотидными последовательностями, могут экспрессировать молекулу антитела, описанного в настоящей публикации, *in situ*. Такие системы включают без ограничения микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные экспрессирующими векторами на основе рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими последовательности, кодирующие антитело; дрожжи (например, *Saccharomyces Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессирующими векторами, содержащими последовательности, кодирующие антитело; системы на основе клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, бакуловирусом), содержащими последовательности, кодирующие антитело; системы на основе растительных клеток (например, зеленых водорослей, таких как *Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, вирус мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом мозаики табака, TMV) или трансформированных рекомбинантными плазмидными экспрессирующими векторами (например, Ti-плазмидой), содержащими последовательности, кодирующие антитело; или системы клеток млекопитающих (например, клетки COS, CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, Hs78Bst, HeLa и NIH 3T3), несущих рекомбинантные экспрессирующие конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотионеина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденоовириуса; промотор 7,5K вируса вакцинии). В конкретном варианте клетками для экспрессии антител, описанных в настоящей публикации, или его антигенсвязывающего фрагмента являются клетки CHO, например клетки CHO из CHO GS SystemTM (Lonza). В конкретном варианте экспрессирующим вектором млекопитающих является pOptiVECTTM или pcDNA3.3. В конкретном варианте бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих), предназначенные специально для экспрессии целых молекул рекомбинантных антител, применяют для экспрессии рекомбинантной молекулы антитела. Например, клетки млекопитающих

тающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с таким вектором, как вектор, содержащий основной промоторный элемент немедленного раннего гена цитомегаловируса человека, является эффективной системой экспрессии для получения антител (Foecking et al., 1986, Gene 45: 101; и Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8: 2). В некоторых вариантах антитела, описанные в настоящей публикации, продуцируется клетками CHO или клетками NS0. В конкретном варианте экспрессия нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела, описанные в настоящей публикации, которые иммunoспецифично связываются с CD47, регулируется конститутивным промотором, индуцируемым промотором или тканеспецифичным промотором.

В бактериальных системах количество экспрессирующих векторов может быть соответствующим образом выбрано, в зависимости от применения, предполагаемого для экспрессируемой молекулы антитела. Например, когда необходимо получить большое количество такого антитела для создания фармацевтических композиций молекулы антитела, могут требоваться векторы, которые обеспечивают экспрессию высоких уровней продуктов в виде слитых белков, которые легко можно очистить. Такие векторы включают, без ограничения, экспрессирующий вектор *E. coli* pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO 12: 1791), в котором последовательность, кодирующая антитело, может быть лигирована отдельно в вектор в рамке с областью, кодирующей lac Z, так чтобы продуцировать слитый белок; pIN-векторы (Inouye and Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109; Van Heeke and Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509); и тому подобные. Например, также можно использовать векторы pGEX для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-S-трансферазой (GST). В общем, такие слитые белки являются растворимыми и могут быть легко очищены из лизированных клеток посредством адсорбции и связывания с агарозными шариками, покрытыми глутатионом, с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Сконструированы векторы pGEX, включающие в себя сайты расщепления протеазами тромбином или фактором Ха для того, чтобы клонированный продукт генамишиени можно было освобождать от остатка GST.

В системе насекомых, в качестве вектора можно использовать, например, вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV), чтобы экспрессировать чужеродные гены. Вирус растет в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодирующая антитело последовательность может быть отдельно клонирована в несущественных областях (например, в гене полиэдрона) вируса и помещена под контроль промотора AcNPV (например, промотор полиэдрона).

В клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать ряд основанных на вирусах систем экспрессии. В тех случаях, когда в качестве экспрессирующего вектора используют адено-вирус, представляющая интерес последовательность, кодирующая антитело, может быть лигирована в комплекс регуляции транскрипции/трансляции, например, поздний промотор и состоящую из трех частей лидерную последовательность. Затем такой химерный ген может быть встроен в адено-вирусный геном посредством рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Инсерция в несущественную область вирусного генома (например, область E1 или E3) будет приводить к образованию рекомбинантного вируса, который является жизнеспособным и способным к экспрессии молекулы антитела в инфицированном хозяине (например, смотри Logan and Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 355-359). Также могут требоваться специфичные сигналы инициации для эффективной трансляции встроенных последовательностей, кодирующих антитело. Такие сигналы включают кодон инициации ATG и близлежащие последовательности. Кроме того, кодон инициации должен быть в фазе с рамкой считывания требуемой кодирующей последовательности, чтобы гарантировать трансляцию полной вставки. Такие экзогенные сигналы регуляции трансляции и кодоны инициации могут быть разного происхождения, как природного, так и синтетического. Эффективность экспрессии может быть повышена включением соответствующих элементов энхансеров транскрипции, терминатора транскрипции и т.д. (смотри, например, Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153: 51-544).

Кроме того, может быть выбран штамм клеток-хозяев, который модулирует экспрессию встроенных последовательностей или модифицирует и процессирует генный продукт особым требуемым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессирование (например, расщепление) белковых продуктов может быть важным для функционирования белка. Разные клетки-хозяева обладают характеристиками и специфичными механизмами для посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Подходящие клеточные линии или системы хозяев могут быть выбраны так, чтобы обеспечить правильную модификацию и процессинг экспрессируемого чужеродного белка. С указанной целью можно использовать эукариотические клетки-хозяева, которые имеют клеточный аппарат для правильного процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают без ограничения клетки CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O и T47D, NS0 (линия клеток миеломы мышей, которая эндогенно не продуцирует никаких цепей иммуноглобулинов), CRL7OZO и HsS78Bst. В некоторых вариантах анти-CD47-антитела, описанные в настоящей публикации (например, антитело, содержащее CDR любого из антител Ab235-Ab255) продуцируют в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO.

Для долговременной, обеспечивающей высокий выход продукции рекомбинантных белков, могут

быть созданы стабильно экспрессирующие клетки. Например, могут быть сконструированы клеточные линии, которые стабильно экспрессируют анти-CD47-антитело, описанное в настоящей публикации, или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных вариантах клетка, предлагаемая в настоящем изобретении, стабильно экспрессирует легкую цепь/вариабельный домен легкой цепи и тяжелую цепь/вариабельный домен тяжелой цепи, которые ассоциируют с образованием антитела, описанного в настоящей публикации, или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых аспектах вместо применения экспрессирующих векторов, которые содержат вирусные начала репликации, клетки-хозяева могут быть трансформированы ДНК, контролируемой соответствующими элементами, регулирующими экспрессию (например, промотором, энхансерными последовательностями, терминаторами транскрипции, участками полиаденилирования и т.д.) и селектируемым маркером. После введения чужеродной ДНК/полинуклеотида сконструированным клеткам можно обеспечить возможность рости в течение 1-2 суток в обогащенной среде, и затем переводят на селективную среду. Селектируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает резистентность к селекции и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в свои хромосомы и рости с образованием очагов, которые в свою очередь могут быть клонированы и размножены до клеточных линий. Такой способ преимущественно может быть использован для конструирования клеточных линий, которые экспрессируют анти-CD47-антитело, описанное в настоящей публикации, или его фрагмент. Такие сконструированные клеточные линии могут, в частности, применяться при скрининге и оценке композиций, которые прямо или опосредованно взаимодействуют с молекулой антитела.

Можно использовать ряд систем селекции, включая без ограничения гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler et al., 1977, Cell 11: 223), гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska and Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 202) и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy et al., 1980, Cell 22: 8-17) в клетках tk-, hprt- или aprt-, соответственно. Также, можно использовать резистентность к антиметаболитам в качестве основы для селекции следующих генов: dhfr, который придает резистентность к метотрексату (Wigler et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77: 357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, который придает резистентность к миофеноловой кислоте (Mulligan and Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, который придает резистентность к аминогликозиду G-418 (Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan, 1993, Science 260: 926-932; и Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5): 155-2 15); и hygro, который придает резистентность к гигромицину (Santerre et al., 1984, Gene 30: 147). Способы, общеизвестные в области технологии рекомбинантной ДНК, могут быть обычным образом использованы, чтобы осуществить селекцию требуемого рекомбинантного клона, и такие способы описаны, например, в Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); и в главе 12 и 13 в публикации Dracopoli et al. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150: 1, и такие публикации включены в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме.

Уровни экспрессии молекул антител могут быть повышенены за счет амплификации вектора (обзор смотрите в Bebbington and Hentschel, Use of Vectors based on Gene Amplification for Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)). В том случае, когда маркер в векторной системе экспрессии антитела может быть амплифицирован, повышение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клеток-хозяев, будет повышать количество копий маркерного гена. Так как амплифицируемая область ассоциирована с геном антитела, продукция антитела также будет возрастать (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3: 257).

Клетка-хозяин может быть котрансфицирована двумя или более экспрессирующими векторами, описанными в настоящей публикации, первым вектором, кодирующим полипептид, полученный из тяжелой цепи, и вторым вектором, кодирующим полипептид, полученный из легкой цепи. Два вектора могут содержать идентичные селектируемые маркеры, которые способны в равной мере экспрессировать полипептиды тяжелой и легкой цепей. Клетки-хозяева могут быть котрансфицированы разными количествами двух или более экспрессирующих векторов. Например, клетки-хозяева могут быть трансфицированы с использованием любого из следующих соотношений первого экспрессирующего вектора и второго экспрессирующего вектора: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 или 1:50.

Альтернативно, можно использовать один вектор, который кодирует и способен экспрессировать полипептиды и тяжелой и легкой цепей. В таких ситуациях легкая цепь должна быть помещена перед тяжелой цепью, чтобы избежать избытка токсичной свободной тяжелой цепи (Proudfoot, 1986, Nature 322: 52; и Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2197-2199). Кодирующие последовательности тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК. Экспрессирующий вектор может быть одноцисторонним или полицисторонним. Полицисторонная конструкция нуклеиновой кислоты может кодировать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше, или в диапазоне 2-5, 5-10 или 10-20 генов/нуклеотидных последовательностей. Например, бицисторонная конструкция нуклеиновой кислоты может содержать в следующем порядке: промотор, первый ген (например, тяжелой цепи антитела, описанного в настоящей

публикации), и второй ген (например, легкой цепи антитела, описанного в настоящей публикации). В таком экспрессирующем векторе транскрипция обоих генов может управляться промотором, тогда как трансляция мРНК с первого гена может осуществляться механизмом зависимого от кэпа сканирования, а трансляция мРНК второго гена может осуществляться независимым от кэпа механизмом, например, посредством IRES.

После получения молекулы антитела, описанного в настоящей публикации, посредством экспрессии рекомбинантов, она может быть очищена любым способом, известным в данной области для очистки молекулы иммуноглобулина, например, хроматографией (например, ионообменной, аффинной, в частности, на основе аффинности к конкретному антигену после белка A, и хроматографией по размеру на колонках), центрифугированием, на основе дифференциальной растворимости или любым другим стандартным способом очистки белков. Кроме того, антитела, описанные в настоящей публикации, могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в настоящей публикации, или иными, известными в данной области, чтобы облегчить очистку.

В конкретных вариантах антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящей публикации, выделяют или очищают. Обычно изолированное антитело представляет собой антитело, которое по существу не содержит других антител с другими антигенными специфичностями, отличными от специфичностей выделяемого антитела. Например, в конкретном варианте препарат антитела, описанного в настоящей публикации, по существу не содержит клеточного материала и/или химических предшественников. Выражение "по существу не содержит клеточного материала" включает препараты антитела, в которых антитело отделено от клеточных компонентов клеток, из которых его выделяют или в которых оно рекомбинантно экспрессировано. Таким образом, антитело, которое по существу не содержит клеточного материала, включает препараты антитела, содержащие менее чем примерно 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 или 0,1% (сухой массы) гетерологичного белка (также называемого в настоящем описании "белок-контаминант") и/или вариантов антитела, например, разных посттрансляционно модифицированных форм антитела или других разных вариантов антитела (например, фрагментов антитела). В том случае, когда антитело продуцируется рекомбинантно, оно также обычно по существу не содержит культуральной среды, т.е. культуральная среда составляет менее чем примерно 20, 10, 2, 1, 0,5 или 0,1% от объема препарата белка. В том случае, когда антитело получают в результате химического синтеза, оно обычно по существу не содержит химических предшественников или других химических веществ, т.е., отделено от химических предшественников или других химических веществ, которые вовлечены в синтез белка. Соответственно, такие препараты антитела содержат менее чем примерно 30, 20, 10 или 5% (сухой массы) химических предшественников или соединений, отличных от представляющего интерес антитела. В конкретном варианте антитела, описанные в настоящей публикации, выделяют или очищают.

5.3. Фармацевтические композиции и наборы

В настоящем изобретении предлагаются композиции, фармацевтические композиции и наборы, содержащие одно или несколько антител (например, анти-CD47-антител), описанных в настоящей публикации, или их антигенсвязывающих фрагментов или их коньюгатов. В конкретных аспектах композиции (например, фармацевтические композиции), описанные в настоящей публикации, могут быть предназначены для применений *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. Не ограничивающие примеры применений включают применения для модулирования (например, ингибиции или индукции/усиления) активности CD47 и применения для сдерживания или лечения расстройства, например, злокачественной опухоли. В конкретных вариантах в настоящем изобретении предлагается фармацевтическая композиция, содержащая антитело (например, гуманизированное антитело), описанное в настоящей публикации (или его антигенсвязывающий фрагмент) и фармацевтически приемлемый носитель или эксципient.

В используемом в настоящем описании смысле термин "фармацевтически приемлемый" представляет собой одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или указанный в списке в Фармакопее США, Европейской фармакопее или других общеизвестных фармакопеях для применения на животных и более конкретно на человеке.

Препараты, содержащие одно или несколько антител, предлагаемых в настоящем изобретении, или их антигенсвязывающие фрагменты, могут быть получены для хранения смешиванием антитела, имеющего требуемую степень очистки, с необязательными физиологически приемлемыми носителями, эксципientами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington: Science and Practice of Pharmacy, 21st ed. (2006) Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD). Такие препараты могут быть, например, в форме лиофилизованных препаратов или водных растворов.

Фармацевтические носители, подходящие для введения антител, предлагаемых в настоящем изобретении, включают любые такие носители, которые, как известно специалистам в данной области, подходят для конкретного способа введения. Приемлемые носители, эксципientы или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают буфер, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Препараты, которые необходимо применять для введения *in vivo*, могут быть стерильными. Стерилизацию можно легко осуществить, например, посредством фильтрации, например, через стерильные мембранные для фильтрации.

В конкретных аспектах фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат терапевтически эффективные количества одного или нескольких антител или антигенсвязывающих фрагментов, предлагаемых в настоящем изобретении, в фармацевтически приемлемом носителе. Такие фармацевтические композиции применимы для профилактики, лечения, сдерживания или облегчения состояния или расстройства, описанного в настоящей публикации, или одного или нескольких его симптомов.

Композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, могут содержать одно или несколько антител, предлагаемых в настоящем изобретении, или их антигенсвязывающих фрагментов. В одном варианте предлагаются композиции, в которых антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящей публикации, приготовлены в виде подходящих фармацевтических препаратов, таких как растворы, суспензии, порошки, препараты длительного высвобождения или эликсиры в стерильных растворах или суспензиях для парентерального введения, или в виде препарата, представляющего собой трансдермальный пластырь, и в виде ингаляторов сухого порошка.

В одном варианте композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, готовят для введения одной дозы. Чтобы приготовить композицию, взвешенную часть соединения растворяют, суспензируют, диспергируют или иным образом смешивают с выбранным носителем в эффективной концентрации, такой чтобы подвергаемое лечению состояние было ослаблено, предотвращено, или был ослаблен один или несколько симптомов.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предлагается антителу внесенное в фармацевтически приемлемый носитель в эффективном количестве, достаточном для оказания терапевтически полезного эффекта в отсутствие или с минимальными или незначительными нежелательными побочными эффектами для пациента, подвергаемого лечению.

Концентрации анти-CD47-антитела в фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, будут зависеть, например, от физико-химических свойств антитела, схемы дозирования и вводимого количества, а также других факторов.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящей публикации, предлагаются для введения человеку или животным (например, млекопитающим) в стандартных лекарственных формах, таких как стерильные парентеральные (например, внутривенные) растворы или суспензии, содержащие подходящие количества соединений или их фармацевтически приемлемых производных. Фармацевтические композиции также предлагаются для введения человеку и животным в стандартной лекарственной форме, такой как таблетки, капсулы, пилюли, порошки, гранулы и пероральные или назальные растворы или суспензии, и эмульсии "масло в воде", содержащие подходящие количества анти-CD47-антитела или его фармацевтически приемлемых производных. В одном варианте антитело готовят в виде препарата и вводят в стандартных формах, содержащих однократную дозу, или в формах для множественного дозирования. Стандартные лекарственные формы, содержащие однократную дозу, в используемом в настоящем описании смысле относятся к физически дискретным единицам, подходящим для человек или животных (например, млекопитающих), и отдельно упакованным. Каждая стандартная доза содержит предварительно определяемое количество анти-CD47-антитела, достаточное для получения требуемого терапевтического эффекта, вместе с требуемым фармацевтическим носителем, наполнителем или разбавителем. Примеры стандартных лекарственных форм включают ампулы и шприцы, и упакованные по отдельности таблетки или капсулы. Стандартные лекарственные формы могут быть введены частями или по несколько штук. Форма для множественного дозирования представляет собой множество идентичных стандартных лекарственных форм, упакованных в одну емкость для введения в виде отдельной стандартной дозы. Примеры форм для множественного дозирования включают флаконы, бутылочки с таблетками или капсулами или бутылочки. Таким образом, в конкретных аспектах форма для множественного дозирования представляет собой множество стандартных доз, которые не разделяют при упаковке.

В некоторых вариантах одно или несколько анти-CD47-антител, описанных в настоящей публикации, или их антигенсвязывающих фрагментов находятся в жидком фармацевтическом препарате. Жидкие вводимые фармацевтические композиции могут быть приготовлены, например, растворением. Диспергированием или образом смешиванием антитела и необязательных фармацевтических адьювантов в носителе, таком как, например, вода, физиологический раствор соли, водный раствор декстозы, глицерин, гликоли и тому подобное, с получением при этом раствор или суспензия. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, предназначенная для введения, также может содержать миорные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как увлажнители, эмульгаторы, солюбилизаторы и средства для pH-буферов и тому подобные.

Способы приготовления таких форм дозирования известны и будут понятны специалистам в данной области; например, смотри, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington: Science and Practice of Pharmacy, 21st ed. (2006) Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Парентеральное введение в одном варианте характеризуется как инъекция, либо подкожно, либо

внутримышечно, либо внутривенно, которая также предусмотрена в настоящем изобретении. Инъекционные средства могут быть получены в обычных формах, либо в виде жидких растворов, либо супензий, твердых форм, подходящих для приготовления раствора или супензии в жидкости перед инъекцией, или в виде эмульсий. Инъекционные средства, растворы и эмульсии также содержат один или несколько эксципиентов. Подходящими эксципиентами являются, например, вода, физиологический раствор соли, декстроза, глицерин или этанол. Другие пути введения могут включать энтеральное введение, интрацеребральное введение, назальное введение, внутриартериальное введение, внутрисердечное введение, внутрикостную инфузию, интракраниальное введение и внутрибрюшинное введение.

Препараторы для парентерального введения включают готовые стерильные растворы для инъекций, стерильные сухие растворимые продукты, такие как готовые лиофилизированные порошки для объединения с растворителем непосредственно перед применением, включая таблетки для подкожного применения, готовые стерильные супензии для инъекций, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые для объединения с наполнителем непосредственно перед применением, и стерильные эмульсии. Растворы могут быть либо водными, либо неводными.

В случае внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор соли или фосфатно-солевой буфер (PBS), и растворы, содержащие загустители и солюбилизаторы, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль и их смеси.

Фармацевтически приемлемые носители, используемые в парентеральных препаратах, включают водные наполнители, неводные наполнители, противомикробные средства, средства для изотоничности, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, супендирующие и диспергирующие средства, эмульгаторы, секвестрирующие или хелатирующие средства и другие фармацевтически приемлемые вещества.

Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль в качестве смешиемых с водой наполнителей; и гидроксид натрия, хлористоводородную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для корректировки pH.

В некоторых вариантах внутривенная или внутриартериальная инфузия стерильного водного раствора, содержащего анти-CD47-антитело или фрагмент, описанные в настоящей публикации, является эффективным способом введения.

Другой вариант представляет собой стерильный водный или масляный раствор или супензию, содержащие анти-CD47-антитело, описанное в настоящей публикации, инъецируемые при необходимости получения требуемого фармакологического эффекта.

В конкретных вариантах анти-CD47-антитело, описанное в настоящей публикации, может быть супензировано в тонкоизмельченной или другой подходящей форме. Форма получаемой в результате смеси зависит от ряда факторов, включая предполагаемый способ введения и растворимость соединения в выбранном носителе или наполнителе.

В других вариантах фармацевтические препараты представляют собой лиофилизированные порошки, которые могут быть перерастворены для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Они также могут быть перерастворены и приготовлены в виде твердых веществ или гелей.

Лиофилизированный порошок может быть приготовлен, например, растворением анти-CD47-антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, в подходящем растворителе. В некоторых вариантах лиофилизированный порошок является стерильным. Подходящие растворители могут содержать эксципиент, который повышает стабильность, или другой фармакологический компонент порошка или восстановленного раствора, приготовленного из порошка. Эксципиенты, которые можно применять, включают без ограничения декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другое подходящее средство. Подходящий растворитель также может содержать буфер, такой как цитрат, фосфат натрия или калия или другой такой буфер, известный специалистам в данной области, в одном варианте, примерно при нейтральном pH. Последующее стерильное фильтрование раствора, за которым следует лиофилизация в стандартных условиях, известных специалистам в данной области, позволяют получить препарат. В одном варианте получаемый в результате раствор будет распределен по флаконам для лиофилизации. Лиофилизированный порошок можно хранить в подходящих условиях, таких как при температуре примерно от 4°C до комнатной температуры.

Перерастворение такого лиофилизированного порошка водой для инъекции позволяет получать препарат, применимый для парентерального введения. Для перерастворения лиофилизированный порошок добавляют к стерильной воде или другому подходящему носителю.

В некоторых аспектах анти-CD47-антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, могут быть приготовлены для местного введения или местного нанесения, такого как местное нанесение на кожу и слизистые оболочки, например, в глаз, в форме гелей, кремов и лосьонов и для внесения в глаза или для интрацистернального или интраспинального применения. Местное введение предполагается для трансдермальной доставки, а также для введения в глаза или слизистые, или для ингаляционной терапии. Также можно вводить назальные растворы активного соединения отдельно или в сочетании с другими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Анти-CD47-антитела и другие композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, также могут быть приготовлены для целенаправленной доставки к конкретной ткани, орган или другую область тела

субъекта, подвергаемого лечению. Многие такие способы целенаправленной доставки хорошо известны специалистам в данной области. Все такие способы целенаправленной доставки предполагаются в настоящем изобретении для применения таких композиций. Не ограничивающие примеры способов целенаправленной доставки смотри, например, в патентах США № 6316652, 6274552, 6271359, 6253872, 6139865, 6131570, 6120751, 6071495, 6060082, 6048736, 6039975, 6004534, 5985307, 5972366, 5900252, 5840674, 5759542 и 5709874. В некоторых вариантах анти-CD47-антитела, описанные в настоящей публикации, целенаправленно доставляют (или вводят иным образом) в органы зрения, костный мозг, желудочно-кишечный тракт, легкие, головной мозг или суставы. В конкретных вариантах анти-CD47-антитела, описанное в настоящей публикации, способно пересекать гематоэнцефалический барьер.

В настоящем изобретении предлагается фармацевтическая упаковка или набор, содержащие одну или несколько емкостей, наполненный одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций, описанных в настоящей публикации, такими как одно или несколько анти-CD47-антител, предлагаемых в настоящем изобретении. Необязательно к такой емкости(емкостям) могут прилагаться уведомление в форме, утвержденной государственным ведомством, контролирующим производство, применение или продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, и в таком уведомлении отражено одобрение введения человеку ведомством по производству, применению и продаже.

Также в настоящем изобретении предлагаются наборы, содержащие одно или несколько антител или фрагментов антител, описанных в настоящей публикации. В одном варианте набор содержит антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящей публикации, в одной или нескольких емкостях. В конкретном варианте наборы, описанные в настоящей публикации, содержат, по существу, очищенный антиген CD47 в качестве контроля. В другом конкретном варианте наборы, описанные в настоящей публикации, дополнительно содержат контрольное антитело, которое не взаимодействует с антигеном CD47. В другом конкретном варианте наборы, описанные в настоящей публикации, содержат один или несколько элементов для выявления связывания модифицированного антитела с антигеном CD47 (например, антитело может быть конъюгировано с регистрируемым субстратом, таким как флуоресцирующее соединение, ферментативный субстрат, радиоактивное соединение или люминесцирующее соединение, или второе антитело, которое узнает первое антитело, может быть конъюгировано с регистрируемым субстратом). В конкретных вариантах набор, предлагаемый в настоящем изобретении, может содержать рекомбинантно полученный или химически синтезированный антиген CD47. Антиген CD47, находящийся в наборе, также может быть связан с твердой подложкой. В более конкретном варианте средства для выявления в описанном выше наборе включают твердую подложку, с которой связан антиген CD47. Такой набор также может содержать несвязанное меченое репортером антитело против Ig человека или антитело против Ig мыши/крысы. В таком варианте связывание антитела с антигеном CD47 может быть выявлено на основании связывания указанного меченоого репортером антитела.

5.4. Применения и способы

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагаются способы модулирования активности CD47 с использованием анти-CD47-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящей публикации.

В конкретных вариантах в настоящем изобретении предлагаются способы ингибирования (например, частичного ингибирования) активности CD47 с использованием анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации. В некоторых вариантах в настоящем изобретении предлагаются способы сдерживания или лечения состояния или расстройства, такого как злокачественная опухоль, с использованием анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации. В некоторых вариантах в настоящем изобретении предлагаются способы профилактики состояния или расстройства, такого как злокачественная опухоль, с использованием анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации.

В конкретных вариантах в настоящем изобретении предлагаются способы сдерживания, лечения, профилактики или предотвращения злокачественной опухоли, включающие в себя введение субъекту, нуждающемуся в таком воздействии терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящей публикации, которые специфично связываются с CD47 (например, CD47 человека). В некоторых вариантах в настоящем изобретении предлагается способ ослабления, подавления или уменьшения прогрессирования или тяжести одного или нескольких симптомов, ассоциированных со злокачественной опухолью.

В используемом в настоящем описании смысле "вводить" или "введение" относится к акту инъекции или одной физической доставки вещества (например, гуманизированного анти-CD47-антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, или его антигенсвязывающего фрагмента) субъекту или пациенту (например, человеку), такой как доставка в слизистую, местная, интранадермальная, парентеральная, внутривенная, подкожная, внутримышечная доставка и/или любой другой способ физической доставки, описанный в настоящей публикации или известный в данной области.

В используемом в настоящем описании смысле термины "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относятся к количеству терапевтического средства (например, антитела или фармацевтической композиции, предлагаемых в настоящем изобретении), которое является достаточным для снижения и/или ослабления тяжести и/или уменьшения продолжительности данного со-

стояния, расстройства или заболевания (например, злокачественной опухоли, метастазов или ангиогенеза) и/или связанного с ним симптома. Такие термины также охватывают количество, необходимо для снижения, замедления или ослабления дальнейшего развития или прогрессирования данного заболевания, снижения, замедления или ослабления рецидива, развития или появления данного заболевания для улучшения или усиления профилактического или терапевтического эффекта(ов) других терапевтических средств (например, других терапевтических средств, отличных от анти-CD47-антитела, предлагаемого в настоящем изобретении). В некоторых вариантах "эффективное количество" в используемом в настоящем описании смысле также относится к количеству антитела, описанного в настоящей публикации, для достижения конкретного результата.

В используемом в настоящем описании смысле термин "в сочетании" в контексте введения других терапевтических средств относится к применению более одного терапевтического средства. Использование термина "в сочетании" не ограничивает порядок, в котором вводят терапевтические средства.

Терапевтические средства можно вводить, например, друг за другом, последовательно, одновременно или в виде сопутствующего введения.

В используемом в настоящем описании смысле термины "сдержать", "сдерживать" и "сдерживание" относятся к полезным эффектам, которые субъект получает в результате терапии (например, профилактическим или терапевтическим средством), которая не приводит к излечению состояния, ассоциированного с CD47. В некоторых вариантах субъекту вводят одно или несколько терапевтических средств (например, профилактических или терапевтических средств, таких как антитело, описанное в настоящей публикации), чтобы "сдержать" состояние или расстройство, описанное в настоящей публикации, один или несколько его симптомов, для того чтобы предотвратить прогрессирование или ухудшение состояния или расстройства.

В используемом в настоящем описании смысле термины "препятствовать" или "препятствование" в контексте состояния или расстройства, предлагаемого в настоящем изобретении (например, аутоиммунного расстройства, иммунологического расстройства, злокачественной опухоли или воспаления), относятся к полному или частичному ингибираванию (например, менее чем 100, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 или 5%) или блокированию развития, рецидивов, появления или распространения состояния или расстройства, предлагаемого в настоящем изобретении (например, злокачественной опухоли, метастазов или ангиогенеза), и/или связанного с ним симптома в результате введения терапевтического средства или сочетания терапевтических средств, предлагаемых в настоящем изобретении (например, сочетания профилактических или терапевтических средств, таких как антитело, описанное в настоящей публикации).

В используемом в настоящем описании смысле термины "субъект" и "пациент" используют взаимозаменямо. В используемом в настоящем описании смысле субъектом является млекопитающее, такое как животное, отличное от примата (например, коровы, свиньи, лошади, кошки, собаки, козы, кролики, крысы, мыши и т.д.), или примат (например, обезьяна и человек), например, человек. В одном варианте субъектом является млекопитающее, например, человек, у которого диагностировано состояние или расстройство, описанное в настоящем изобретении (например, злокачественная опухоль, метастазы или ангиогенез). В другом варианте субъектом является млекопитающее, например, человек, для которого существует риск развития состояния или расстройства, описанного в настоящем изобретении (например, злокачественной опухоли, метастазов или ангиогенеза). В другом варианте субъектом является человек.

В некоторых вариантах CD47 амплифицируется в клетках субъекта, например, человека. Идентификация амплификации cd47 в образце от субъекта может быть выполнена в анализах, известных специалисту в данной области, таких как, например, количественная ПЦР с обратной транскрипцией, анализа с использованием иммуноблотов, фингерпринтинг ДНК, кариотипирование (например, с использованием многоцветной флуоресцентной гибридизации *in situ* (mFISH)), сравнительная геномная гибридизация и определение профиля экспрессии генов. В качестве не ограничивающего примера экспрессию белка в образцах опухолей можно охарактеризовать с использованием иммуногистохимических анализов, чтобы измерить количество белка CD47, присутствующего в образце.

Идентификация мутаций или делеций в образце от субъекта может быть осуществлена с использованием анализов, известных специалисту в данной области, таких как, например, экстракция ДНК, получение комплементарной ДНК и секвенирование кДНК. Последовательность кДНК, например, может быть использована для получения продукта трансляции способами, известными специалисту в данной области. Генетические делеции и аминокислотные замены могут быть идентифицированы, например, путем сравнения последовательности из образца, полученного от субъекта, с последовательностью дикого типа и/или консенсусной последовательностью.

В некоторых вариантах CD47 амплифицируют у субъекта, подвергаемого лечению способами, предлагаемыми в настоящем изобретении. Идентификацию амплификации CD47 в образце от субъекта осуществляют в анализах, известных специалисту в данной области, таких как, например, количественная ПЦР с обратной транскрипцией или анализы с использованием иммуноблотов. Идентификацию мутаций или делеций в образце от субъекта осуществляют в анализах, известных специалисту в данной области, таких как, например, экстракция ДНК, получение комплементарной ДНК и секвенирование кДНК. Последовательность кДНК, например, используют для получения продукта трансляции способами, из-

вестными специалисту в данной области. Генетические делеции и аминокислотные замены идентифицируют, например, сравнивая последовательность из образца от субъекта с последовательностью дикого типа и/или консенсусной последовательностью.

В используемом в настоящем описании смысле термины "терапии" и "терапия" могут относиться к любому протоколу(ам), способу(ам), композициям, препаратам и/или средству(средствам), которые можно использовать для профилактики, лечения, сдерживания или ослабления состояния или расстройства или его симптома (например, состояния или расстройства, предлагаемого в настоящем изобретении (например, злокачественной опухоли) или одного или нескольких симптомов, ассоциированных с состоянием или расстройством). В некоторых вариантах термины "терапии" и "терапия" относятся к терапии с использованием лекарственных средств, адьювантной терапии, лучевой терапии, хирургии, биологической терапии, поддерживающей терапии и/или другой терапии, полезной для лечения, сдерживания, профилактики или ослабления состояния или расстройства или одного или нескольких его симптомов (например, злокачественной опухоли или одного или нескольких симптомов, ассоциированных с состоянием или расстройством). В некоторых вариантах термин "терапия" относится к терапии с использованием другого средства, отличного от анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, или его фармацевтической композиции. В конкретных вариантах "дополнительная терапия" и "дополнительные терапии" относятся к другой терапии, отличной от лечения с использованием анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, или его фармацевтической композиции. В конкретном варианте терапия включает в себя применение анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, в качестве адьювантной терапии. Например, с использованием анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, в сочетании с лечением лекарственным средством, биологической терапией, хирургическим вмешательством и/или поддерживающей терапией.

В используемом в настоящем описании смысле "гематологическая злокачественная опухоль" относится к злокачественной опухоли крови и включает наряду с прочим лейкоз, лимфому и миелому. "Лейкоз" относится к злокачественной опухоли крови, в случае которой слишком много лимфоцитов, которые неэффективны в борьбе с инфекцией, таким образом вытесняющих другие составляющие части крови, такие как тромбоциты и эритроциты. Известно, что случаи лейкоза классифицируют как острые или хронические. Некоторые формы лейкоза включают в качестве не ограничивающего примера острый лимфоцитарный лейкоз (ALL); острый миелоидный лейкоз (AML); хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); хронический миелоидный лейкоз (CML); миелопролиферативное расстройство/неоплазму (MPDS); и миелодиспластический синдром. "Лимфома" может относиться наряду с прочим к ходжкинской лимфоме, как к вялотекущей, так и агрессивной неходжкинской лимфоме, лимфоме Беркитта и фолликулярной лимфоме (мелкоклеточной и крупноклеточной). Миелома может относиться к множественной миеломе (MM), гигантоклеточной миеломе, миеломе тяжелых цепей и миеломы легких цепей или миеломе Бенс-Джонса.

Не ограничивающие примеры состояния, которое можно лечить или подавлять с использованием анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, включают гематологическую злокачественную опухоль и/или солидные опухоли.

Заболевания или расстройства, связанные с аномальной экспрессией, активностью и/или передачей сигнала CD47, включают в качестве не ограничивающего примера гематологическую злокачественную опухоль и/или солидные опухоли. Гематологические злокачественные опухоли включают, например, лейкоз, лимфому и миелому. Некоторые формы лейкоза включают в качестве не ограничивающего примера острый лимфоцитарный лейкоз (ALL); острый миелоидный лейкоз (AML); хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); хронический миелоидный лейкоз (CML); миелопролиферативное расстройство/неоплазму (MPDS); и миелодиспластический синдром. Некоторые формы лимфомы включают в качестве не ограничивающего примера, ходжкинскую лимфому, как вялотекущую, так и агрессивную неходжкинскую лимфому, лимфому Беркитта и фолликулярную лимфому (мелкоклеточную и крупноклеточную). Некоторые формы миеломы включают в качестве не ограничивающего 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 легкого, опухоли поджелудочной железы, опухоли простаты, меланомные опухоли, опухоли прямой и ободочной кишки, опухоли легкого, опухоли головы и шеи, опухоли мочевого пузыря, опухоли пищевода, опухоли печени и опухоли почек.

Симптомы, ассоциированные со злокачественными опухолями и другими неопластическими расстройствами, включают, например, воспаление, лихорадку, общее недомогание, жар, боль, часто локализованную в области воспаления, потерю аппетита, потерю массы, отек, головную боль, усталость, сыпь, анемию, мышечную слабость, мышечное утомление и абдоминальные симптомы, такие как, например, абдоминальная боль, диарея или запор.

В конкретных аспектах в настоящем изобретении предлагаются анти-CD47-антитела, применимые для лечения, замедления прогрессирования, сдерживания, предотвращения рецидивов или ослабления симптома злокачественной опухоли (например, MM, NHL, AML, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, немелкоклеточного рака/карциномы легкого, гепатоклеточной карциномы (HCC), саркомы, и

рака головы и шеи). Например, CD47-антитела, описанные в настоящей публикации, применимы для лечения гематологических злокачественных новообразований и/или опухолей, например, гематологических злокачественных новообразований и/или опухолей. Например, CD47-антитела, описанные в настоящей публикации, применимы для лечения опухолей CD47+. В качестве не ограничивающего примера CD47-антитела, описанные в настоящей публикации, применимы для лечения неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелоидного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), рака молочной железы, рака яичника, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, меланомы, рака прямой и ободочной кишки, рака поджелудочной железы, рака легкого, лейомиомы, лейомиосаркомы, глиомы, глиобластомы и т.д.. Солидные опухоли включают, например, опухоли молочной железы, опухоли яичника, опухоли легкого (например, NSCLC), опухоли поджелудочной железы, опухоли простаты, опухоли меланомы, опухоли прямой и ободочной кишки, опухоли легкого, опухоли головы и шеи, опухоли мочевого пузыря, опухоли пищевода, опухоли печени (например, гепатоклеточную карциному), саркому и опухоли почек.

В конкретном варианте в настоящем изобретении предлагается способ лечения злокачественной опухоли (например, гематологического расстройства/злокачественной опухоли или солидной злокачественной опухоли) у субъекта, включающий в себя введение (например, введение одновременно или последовательно) субъекту, нуждающемуся в таком введении, (i) анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, или его антигенсвязывающего фрагмента, который специфично связывается с CD47, таким как CD47 человека, и (ii) другого противоопухолевого средства. В некоторых вариантах противоопухолевым средством является химиотерапевтическое средство (например, блокатор разборки микротрубочек, антиметаболит, ингибитор топоизомеразы и средство, поперечно сшивающее или повреждающее ДНК). В некоторых вариантах противоопухолевым средством является ингибитор тирозинкиназы (например, GLEEVEC® (мезилат иматиниба) или SUTENT® (SU11248 или сунитиниб)). Другие не ограничивающие примеры ингибиторов тирозинкиназы включают 706 и AMNI07 (нилотиниб). RAD001, PKC412, гефитиниб (IRESSA™), эрлотиниб (TARCEVA®), сорафениб (NEXAVAR®), пазопаниб (VOTRIENT™), акситиниб, босутиниб, цедираниб (RECENTIN®), SPRYCEL® (досатиниб), лапатиниб (TYKERB®), лестауртиниб, нератиниб, нилотиниб (TASIGNA®), семаксаниб, тоцераниб (PALLADIUM™), вандетаниб (ZACTIMA™) и ваталаниб.

В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагается способ лечения злокачественной опухоли (например, гематологического расстройства/злокачественной опухоли или солидной злокачественной опухоли) у субъекта, включающий в себя введение (например, введение одновременно или последовательно) субъекту, нуждающемуся в таком введении, (i) анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, или его антигенсвязывающего фрагмента, который специфично связывается с CD47, таким как CD47 человека, и (ii) лучевой терапии.

В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагается способ стимулирования (например, индукции или усиления) фагоцитоза, например, опосредованной макрофагами фагоцитарной гибели опухолевых клеток, включающий в себя осуществление контакта эффективного количества анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, которое специфично связывается с CD47 человека, с опухолевыми клетками. Также в настоящем изобретении предлагается способ стимулирования (например, индукции или усиления) фагоцитоза, например, опосредованной макрофагами фагоцитарной гибели опухолевых клеток, у субъекта, нуждающегося в таком стимулировании (например, у субъекта с опухолевыми клетками, такими как опухолевые клетки, экспрессирующие CD47), включающий в себя введение субъекту эффективного количества анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, которое специфично связывается с CD47 человека.

В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагается способ уменьшения объема опухоли, включающий в себя осуществление контакта эффективного количества анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, которое специфично связывается с CD47 человека, с опухолью. Также в настоящем изобретении предлагается способ уменьшения объема опухоли у субъекта, нуждающегося в таком уменьшении опухоли (например, у субъекта с опухолью, такой как опухоль, экспрессирующая CD47), включающий в себя введение субъекту эффективного количества анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, которое специфично связывается с CD47 человека.

В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагается способ ингибирования роста или пролиферации злокачественных клеток, включающий в себя осуществление контакта эффективного количества анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, которое специфично связывается с CD47 человека, со злокачественными клетками. Также в настоящем изобретении предлагается способ ингибирования роста или пролиферации злокачественных клеток у субъекта, нуждающегося в таком ингибировании (например, у субъекта со злокачественными клетками, такими как злокачественные клетки, экспрессирующие CD47), включающий в себя введение субъекту эффективного количества анти-CD47-антитела, описанного в настоящей публикации, которое специфично связывается с CD47 человека.

5.4.1 Диагностические применения

В одном аспекте анти-CD47-антитела, описанные в настоящей публикации, и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с ECD CD47 человека, можно применять для диагностических целей, чтобы выявить, диагностировать или контролировать состояние, описанное в настоящей публикации, (например, состояние, в которое вовлечен CD47 и/или аномальная передача сигнала CD47 и/или аномальная экспрессии CD47), такое как злокачественная опухоль (например, рак прямой и ободочной кишки, рак желудка, рак легкого или меланома). В конкретных вариантах анти-CD47-антитела, описанные в настоящей публикации, или их антигенсвязывающие фрагменты, применимые для диагностических целей, метят Способы, предлагаемые в настоящем изобретении для диагностических целей, чтобы выявить, диагностировать или контролировать состояние, описанное в настоящей публикации, могут представлять собой способы *in vitro*, способы *in situ* или способы *ex vivo*. Способы, предлагаемые в настоящем изобретении для диагностических целей, чтобы выявить, диагностировать или контролировать состояние, описанное в настоящей публикации, могут представлять собой способы *in vivo*.

В некоторых вариантах в настоящем изобретении предлагаются способы выявления состояния, описанного в настоящей публикации, такого как злокачественная опухоль, включающие в себя: (a) анализ экспрессии CD47 в образце от субъекта с использованием одного или нескольких антител, описанных в настоящей публикации, или их антигенсвязывающих фрагментов; и (b) сравнение уровня экспрессии CD47 с контрольным уровнем, например, с уровнями в образцах нормальных тканей (например, от пациента, не имеющего состояния, описанного в настоящей публикации, или от того же самого пациента до появления состояния), при этом повышение или снижение анализируемого уровня экспрессии CD47 по сравнению с контрольным уровнем экспрессии CD47 является показателем состояния, описанного в настоящей публикации.

В некоторых вариантах в настоящем изобретении предлагаются способы выявления злокачественной опухоли, экспрессирующей CD47 (например, сверхэкспрессирующей CD47), включающие в себя: (a) анализ экспрессии CD47 в образце от субъекта с использованием одного или нескольких антител, описанных в настоящей публикации, или их антигенсвязывающих фрагментов; и (b) сравнение уровня экспрессии CD47 с контрольным уровнем, например, уровнями в нормальных образцах (например, от пациента, не имеющего злокачественной опухоли, пациента, имеющего злокачественную опухоль, которая не сверхэкспрессирует CD47, или от того же самого пациента до появления злокачественной опухоли). В конкретных аспектах повышение или снижение анализируемого уровня экспрессии CD47 по сравнению с контрольным уровнем экспрессии CD47 является показателем злокачественной опухоли, экспрессирующей CD47.

В конкретном варианте в настоящем изобретении предлагается способ диагностики злокачественной опухоли, экспрессирующей CD47, у пациента, при этом способ включает в себя стадии:

(a) осуществления контакта биологического образца от пациента с одним или несколькими антителами, описанными в настоящей публикации, или их антигенсвязывающими фрагментами;

(b) выявления связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с CD47, чтобы определить уровень белка CD47 в биологическом образце от пациента; и

(c) сравнения уровня белка CD47 со стандартным уровнем белка CD47.

В конкретном варианте в настоящем изобретении предлагается способ контролирования уровня белка CD47 во время лечения CD47-экспрессирующей злокачественной опухоли у пациента, при этом способ включает в себя стадии:

(a) осуществления контакта биологического образца от пациента с одним или несколькими антителами, описанными в настоящей публикации, или их антигенсвязывающими фрагментами;

(b) выявления связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с CD47, чтобы определить уровень белка CD47 в биологическом образце от пациента; и

(c) сравнения уровня белка CD47 со стандартным уровнем белка CD47.

Любой образец (например, образец жидкости тела или ткани) от субъекта можно использовать в диагностических способах, предлагаемых в настоящем изобретении. Не ограничивающие примеры образцов, которые можно применять в диагностических способах, предлагаемых в настоящем изобретении, включают образец сыворотки, образец плазмы, образец ткани, образец мочи, образец опухоли и образец кала.

Антитела, описанные в настоящей публикации, можно применять для анализа уровней CD47 в биологическом образце с использованием классических иммуногистологических способов, которые описаны в настоящей публикации или известны специалистам в данной области (например, смотри Jalkanen et al., 1985, *J. Cell. Biol.* 101: 976-985; и Jalkanen et al., 1987, *J. Cell. Biol.* 105: 3087-3096). Другие основанные на антителах способы, применимые для выявления экспрессии генов белков, включают иммуноанализы, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и радиоиммуноанализ (РИА). Подходящие метки для анализа на основе антител известны в данной области и включают ферментные метки, такие как, глюкозооксидаза; радиоактивные изотопы, такие как йод (^{125}I , ^{131}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^{3}H), индий (^{113}In) и технеций (^{99}Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцирующие метки, такие как флуоресцеин и родамин, и биотин.

В одном варианте контролирование состояния, описанного в настоящей публикации (например, состояние, в которое вовлечен CD47 и/или аномальная передача сигнала CD47 и/или аномальная экспрессия CD47), такого как злокачественная опухоль, осуществляют, повторяя способ диагностики в течение определенного периода времени после начальной диагностики.

Присутствие меченых молекул можно выявить у субъекта с использованием способов, известных в данной области для сканирования *in vivo*. Специалисты смогут определить подходящий способ выявления конкретной метки. Способы и устройства, которые можно применять в диагностических способах согласно изобретению, включают без ограничения компьютерную томографию (КТ), сканирование всего организма, такое как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), магнитно-резонансная томография (МРТ) и сонография.

6. Примеры

В настоящем разделе (т.е. разделе 6) предлагаются примеры для иллюстрации, но не для ограничения.

6.1. Пример 1. Бесклеточная (БК) продукция антител.

Наблюдали неэффективную сборку тяжелых и легких цепей анти-CD47-антител АВ6.12 при коэкспрессии в бесклеточной (БК) системе. Один из способов улучшения такого процесса включает предварительное добавление подвергнутой фолдингу легкой цепи в реакционную смесь с тяжелой цепью. В другом способе модификация каркасной последовательности тяжелой цепи неожиданно приводила к более эффективной сборке и коэкспрессии тяжелой и легкой цепей анти-CD47-антител в БК-системе. Характеристика таких анти-CD47-антител с модификациями каркасных последовательностей тяжелой цепи описана более подробно ниже.

Продукция в небольшом масштабе.

Бесклеточные экстракти со сверхэкспрессией DsbC (2X DsbC) размораживали до комнатной температуры и инкубировали с 50 мКМ йодацетамида в течение 30 мин. Реакции в бесклеточной системе осуществляли при 30°C в течение периода времени до 10 ч в смесях, содержащих 30% (об./об.) обработанного йодацетатом экстракта, 8 мМ глутамата магния, 10 мМ глутамата аммония, 130 мМ глутамата калия, 35 мМ пирувата натрия, 1,2 мМ AMP, 0,86 мМ каждого из GMP, UMP и CMP, 2 мМ аминокислот в случае всех 19 аминокислот, за исключением тиозина, который добавляли до концентрации 0,5 мМ, 4 мМ оксалата натрия, 1 мМ путресцина, 1,5 мМ спермилина, 15 мМ фосфата калия, 100 нМ T7 RNAP и 2 мМ окисленного (GSSG) глутатиона. Концентрации плазмиды тяжелой цепи и плазмиды легкой цепи в реакционных смесях составляли 7,5 мкг/мл и 2,5 мкг/мл, соответственно. Чтобы пометить синтезируемый белок ¹⁴C, в реакционную смесь также добавляли 3,33% (об./об.) 1-[U-14C]-лейцина (300 мкюри/ммоль; GE Life Sciences, Piscataway, NJ). В данном эксперименте экспрессировали следующие тяжелые цепи (HC), спаренные с одной и той же легкой цепью (LC), SEQ ID NO: 13.

| № | | SEQ ID | Название |
|---------|--------|----------------------------|-----------------|
| образца | IgG | Описание HC | антилена |
| 1 | IgG1 | исходное | IgG1-исходное |
| 2 | IgG1 | 5 мутаций | IgG1-5m |
| 3 | IgG1 | 13 мутаций | IgG1-13m |
| 4 | IgG1 | 13 мутаций аллотип 6 | IgG1-13mZ |
| | | аллотип Z или 13+2 мутации | |
| 5 | IgG4P | исходное | IgG4P-исходное |
| 6 | IgG4P | 5 мутаций | IgG4P-5m |
| 7 | IgG4P | 13 мутаций | IgG4P-13m |
| 8 | IgG4PE | исходное | IgG4PE-исходное |
| 9 | IgG4PE | 5 мутаций | IgG4PE-5m |
| 10 | IgG4PE | 13 мутаций | IgG4PE-13m |

Примеры нуклеотидных последовательностей, кодирующих описанные выше последовательности тяжелых цепей приведены в SEQ ID NO: 23, 26, 27, 24, 28, 29, 25, 32 и 31, соответственно.

В случае не восстанавливающего SDS-ПААГ смешивали 4 мкл образца, 8 мкл дейонизованной воды (DI H₂O) и 4 мкл 4X буфера LDS (Invitrogen, Carlsbad, CA) перед загрузкой на гель. В случае восстанавливающего геля смешивали 4 мкл образца, 1 мкл 1 M DTT, 7 мкл DI H₂O и 4 мкл 4X буфера LDS (Invitrogen, Carlsbad, CA) и нагревали при 70°C в течение 5 мин. Образцы анализировали, используя 4~12% бис-трис-SDS-ПААГ-гели (Invitrogen, Carlsbad, CA) согласно рекомендациям производителя. Гели сушили и анализировали авторадиографически, используя Storm 840 Phospholmager примерно после 16-часовой экспозиции.

Авторадиография показана на фиг. 1А.

Данные показывают, что титры БК-экспрессии IgG1, IgG4P и IgG4PE значительно улучшались при конструировании 5 мутаций и 13 мутаций в последовательностях их НС. Титры приведены на фиг. 1В.

Продукция в увеличенном масштабе -IgG1-варианты.

Осуществляли БК-продукцию в увеличенном масштабе IgG1-вариантов антител, таких как IgG1-5m и IgG1-13mZ, и их очистку. Условия для увеличенного масштаба более подробно описаны в таблицах (например, таблицах 3-6) ниже. Оба варианта были получены по существу одним и тем же способом; наиболее значимое различие имело место в температуре реакции. IgG1-5m экспрессировали при 25°C, и IgG1-13mZ получали при 30°C. В случае IgG1-13mZ наблюдали сходные результаты при 25°C и 30°C, а в случае IgG1-5m наблюдали более высокий титр при 25°C по сравнению с 30°C. Небольшие различия в периодах времени реакций между двумя вариантами являются просто результатом составления удобного графика и вероятно не оказывает никакого значимого влияния на процесс. Для вариантов использовали разные экстракты, основываясь на доступности экстрактов, но не на основе конкретных требований к экстрактам. Предполагается, что любой экстракт со сверхэкспрессией DsbC будет работать сходным образом в отношении таких продуктов.

Экспрессия IgG1-13mZ (IgG1, каркас VH1-18, 13+2 мутаций) в увеличенном масштабе.

Бесклеточный экстракт S30 обрабатывали 50 мкМ йодацетамидом (IAM) в течение 30 мин при комнатной температуре. После такой обработки экстракт объединяли с реагентами, указанными в табл. 3, и переносили в биореактор (Dci-BioLafitte Evo Bioreactor, максимальный рабочий объем 10 л). Настройки биореактора устанавливали, как указано в таблице 4. После 6 часов протекания реакции в реакционную смесь дополнительно добавляли 5 мМ (конечная концентрация) окисленный глутатион. Окисленный глутатион готовили в виде 250 мМ маточного раствора с pH, который корректировали до уровня от 7 до 8 перед добавлением в реактор. Реакцию проводили в течение 15 часов, затем переносили для дальнейшей обработки.

Таблица 3. Компоненты бесклеточной реакционной смеси

| Реагент | Конечная концентрация в БК реакционной смеси |
|--|--|
| AMP | 1,2 мМ |
| GMP | 0,86 мМ |
| UMP | 0,86 мМ |
| CMP | 0,86 мМ |
| Фосфат натрия | 15 мМ |
| 19 аминокислот (за исключением тирозина) | 2 мМ каждого |
| Щавелевая кислота | 4 мМ |
| Путресцин | 1 мМ |
| Спермидин | 1,5 мМ |
| Глутамат аммония | 10 мМ |
| Глутамат калия | 130 мМ |
| Глутамат магния | 8 мМ |
| Тирозин | 1 мМ |
| Пируват | 35 мМ |
| Окисленный глутатион | 2 мМ |
| РНК-полимераза бактериофага T7 | 0,02 г/л |
| Плазмида, кодирующая белок легкой цепи | 2,5 мг/л |
| Плазмида, кодирующая белок тяжелой цепи | 7,5 мг/л |
| Cipro | 1 мг/л |
| Плюроник-R 31R1 | 0,005% (об./об.) |
| IAM-обработанный экстракт E. coli штамма SBDG028 | 30% (об./об.) |

Таблица 4. Контрольные установки биореактора (объем реакционной смеси 5 л)

| Параметр | Заданная величина |
|--|--|
| Температура | 30°C |
| pH | не контролируется |
| Поток воздуха (барботажное устройство) | 1,5 ст. л/мин |
| DO (растворенный кислород) | 100% насыщение воздухом |
| Встряхивание | 200–400 об./мин, как необходимо для контроля РО (первичный каскад DO) |
| Поток кислорода (барботажное устройство) | 0–2 ст. л/мин, как необходимо для контроля DO (вторичный каскад DO) |

Экспрессия анти-CD47-антитела IgG1-5m (IgG1, каркас VH1-18, 5 мутаций) в увеличенном масштабе.

Бесклеточный экстракт S30 обрабатывали 50 мкМ йодацетамидом (IAM) в течение 30 мин при комнатной температуре. После такой обработки экстракт объединяли с реагентами, указанными в табл. 5, и переносили в биореактор (Sartorius Biostat Q Bioreactor, максимальный рабочий объем 500 мл). Настройки биореактора устанавливали, как указано в таблице 6. После 5,5 часов протекания реакции в реакционную смесь дополнительно добавляли 5 мМ (конечная концентрация) окисленный глутатион. Окисленный глутатион готовили в виде 250 мМ маточного раствора с pH, который корректировали до уровня от 7 до 8 перед добавлением в реактор. Реакцию проводили в течение 15,7 ч, затем переносили для дальнейшей обработки.

Таблица 5. Компоненты бесклеточной реакционной смеси

| Реагент | Конечная концентрация в ВК реакционной смеси |
|---|--|
| AMP | 1,2 мМ |
| GMP | 0,86 мМ |
| UMP | 0,86 мМ |
| CMP | 0,86 мМ |
| Фосфат натрия | 15 мМ |
| 19 аминокислот (за исключением тирозина) | 2 мМ каждого |
| Щавелевая кислота | 4 мМ |
| Путресцин | 1 мМ |
| Спермидин | 1,5 мМ |
| Глутамат аммония | 10 мМ |
| Глутамат калия | 130 мМ |
| Глутамат магния | 8 мМ |
| Тирозин | 1 мМ |
| Пируват | 35 мМ |
| Окисленный глутатион | 2 мМ |
| РНК-полимераза бактериофага T7 | 0,02 г/л |
| Плазмида, кодирующая белок легкой цепи | 2,5 мг/л |
| Плазмида, кодирующая белок тяжелой цепи | 7,5 мг/л |
| Cipro | 1 мг/л |
| Плюрооник-R 31R1 | 0,005% (об./об.) |
| IAM-обработанный экстракт <i>E. coli</i> штамма SBDG031 | 30% (об./об.) |

Таблица 6. Контрольные установки биореактора (объем реакционной смеси 0,5 л)

| Параметр | Заданная величина |
|---|---|
| Температура | 25°C |
| pH | не контролируется |
| Поток воздуха (барботажное устройство) | 0,25 ст. л/мин |
| DO (растворенный кислород) | 80% насыщение воздухом |
| Встряхивание | 200–400 об./мин, как необходимо для контроля РО (первичный каскад DO) |
| Поток кислорода (барботажное устройство) | 0–1 ст. л/мин, как необходимо для контроля DO (вторичный каскад DO) |

6.2. Пример 2. Анализ Biacore связывания CD47.

Материал и способы.

Иммобилизация: поверхности, покрытые антителом против Fc человека (АНС) готовили посредством аминного связывания моноклонального мышного антитела против Fc IgG человека (входящего в состав набора для улавливания антител человека Biacore, GE Life Sciences, № в каталоге BR-1008-39) с поверхностью сенсорного чипа Biacore CM5. Рабочий буфер для процесса иммобилизации представлял собой буфер HBS-EP+ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% об./об. Р-20 в качестве поверхности-активного вещества). Следующие процессы осуществляли во всех четырех проточных ячейках, чтобы получить поверхности, с которыми через амин связано антитело против Fc IgG человека. Поверхность чипа CM5 активировали инъекцией смеси 1:1 (об./об.) 400 mM EDC и 100 mM NHS в течение 7 мин с расходом 10 мкл/мин. После такой обработки антитело против IgG человека разбавляли до 25 мкг/мл в 10 mM натрий-ацетатном буфере, pH 5,0, и инъектировали на все проточные ячейки со скоростью потока 10 мкг/мин в течение 7 мин. Затем инъектировали этаноламин со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 7 мин, чтобы блокировать все поверхности. Такой способ приводил к уровням иммобилизации ~10000–11000 условных единиц на сенсорный чип.

Кинетические анализы: для кинетических анализов анти-CD47-антитела улавливали на поверхностях, покрытых антителами против Fc человека (подготовка поверхностей описана выше). Для улавливания антител с использованием Fc человека антитела разбавляли до 10 мкг/мл в рабочем буфере HBS-EP+. Варианты антител иммобилизовали пропусканием через проточную ячейку 2, 3 или 4 со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 12 с. Аналит (антитело CD47 человека) разбавляли в рабочем буфере, создавая серийные разведения с разведениями в 2 раза, чтобы получить концентрации 3,125, 6,25, 12,5, 25 и 50 нМ. После улавливания анти-CD47-антител в проточные ячейки инъектировали анализ CD47 в течение 180 секунд (3 мин) со скоростью 50 мкл/мин и наблюдали диссоциацию комплекса в течение 900 с (15 мин). Также пропускали контрольные буфера и использовали для сравнения данных связывания анализа со стандартом перед подгонкой. Поверхности, покрытые анти-Fc человека регенерировали, используя две 30-секундные инъекции 3M MgCl₂ с расходом 30 мкл/мин между отдельными циклами связывания анализа.

Анализ кинетических данных: Экспериментальные результаты для данного взаимодействия антитело-антитела подгоняли с помощью модели связывания 1:1 с использованием параметров глобального R_{max}, глобальной k_a (ассоциация), глобальной k_d (диссоциация) и константы RI (показатель преломления объемной среды). Активность фракции (% активности лиганда) определяли с использованием следующей формулы, чтобы вычислить взаимосвязь между теоретическим R_{max} (R_{max} теор.) и экспериментальным R_{max} (R_{max} эксп.). В формуле стехиометрия представляет случаи взаимодействия между антителом и антигеном, например, когда антитело является лигандом, каждое плечо антитела может взаимодействовать с антигеном, таким образом стехиометрия равна 2.

$$R_{\max\text{теор.}} = \text{уровень лиганда} \times \left(\frac{\text{MW анализ}}{\text{MW лиганд}} \right) \times \text{стехиометрия}$$

$$\% \text{ активности лиганда} = \left(\frac{R_{\max \text{ эксп.}}}{R_{\max \text{ теор.}}} \right) \times 100$$

Результаты: анализ Biacore показал, что все три варианта анти-CD47-антитела с 5 мутациями (независимо от изотипа) имеют сходные скорости диссоциации и аффинности, при этом активность фракции (% активности лиганда) составлял около 38%. Также аффинность в случае вариантов антител с 5 мута-

циями хорошо соответствовала аффинности исходного антитела. Данные суммированы в таблице (табл. 7) ниже.

Таблица 7. Суммарные данные анализа Biacore

| Количество мутаций | Антиген | Лиганд | ka (1/M kd сек) | KD (M) (1/сек) | R _{max} (RU) | Chi ² (RU ²) | активность лиганда, % |
|-------------------------|---------|--------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------|--|--------------------------|
| PGRTV 5 мутаций | CD47 | IgG1-5m | 6,36E+05 | 2,60E-03 | 4,09E-09 | 123,4 | 1,83 37,4 |
| | CD47 | IgG4P-5m | 7,04E+05 | 2,54E-03 | 3,60E-09 | 106,5 | 1,86 38,2 |
| | CD47 | IgG4PE-5m | 5,94E+05 | 2,54E-03 | 4,27E-09 | 115,4 | 2,5 39,2 |
| Контрольное антитело | CD47 | Анти-CD47 БК-контроль | 7,32E+05 | 2,31E-03 | 3,16E-09 | 99,68 | 1,36 39,4 |

Данные для вариантов анти-CD47-антитела 13m (с 13 мутациями) и 13mZ (с 13 мутациями и аллотипом Z IgG1) показали очень быструю скорость диссоциации, и анализ кинетических параметров не привел к достоверной подгонке на основе модели связывания 1:1.

На фиг. 2A-2E изображены отдельные сенсограммы для вариантов антител IgG1-5m (фиг. 2A), IgG1-13m (фиг. 2B), IgG1-13mZ (фиг. 2C), IgG4P-5m (фиг. 2D) и IgG4PE-5m (фиг. 2E); и на фиг. 2F изображена сенсограмма контрольного анти-CD47-антитела.

6.3. Пример 3. Прямой анализ связывания CD47-клеток.

Чтобы получить кривые связывания образцы вариантов титровали 1:2 в FACS-буфере (PBS, 2% FCS), начиная с высокой концентрации ~66 нМ для каждого образца. $0,1 \times 10^6$ клеток CCRF-EM высевали в 96-луночный планшет и инкубировали в 50 мкл буфера FACS, содержащего указанную концентрацию образца вариантов, в течение 1 часа на льду. Затем клетки промывали 150 мкл буфера FACS и инкубировали в 50 мкл буфера FACS, содержащего второе антитело (антитело против IgG человека-PE, Jackson ImmunoResearch), разбавленное 1:100, в течение 1 ч на льду. Затем клетки промывали буфером FACS и фиксировали в 2% PFA для получения данных с использованием проточного цитометра LSR II, DB (BD Biosciences, San Jose, CA). Проточно-цитометрический анализ осуществляли, используя компьютерную программу FloJo, версию 9.6.4. Чтобы получить кривые титрования и Kd, средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) откладывали на графике против концентрации (нМ). Значения Kd вычисляли с использованием Prism 6, нелинейного регрессионного анализа подгонки кривых, специфичного для одного сайта связывания, с использованием углового коэффициента Хилла.

Результаты: Все полученные в СНО и в БК-системе моноклональные анти-CD47-антитела имели эквивалентные Kd связывания на поверхности клеток CCRF-СЕМ, которые являются Т-лимфобластными клетками человека (ATCC® CCL-119™). Вычисленные значения Kd (нМ) представлены в таблице ниже (табл. 8).

Таблица 8

| анти-CD47-МАт | Kd (нМ) |
|------------------------|---------|
| IgG1-исходное-СНО | 0,18 |
| IgG1-исходное-БК | 0,14 |
| IgG1-13m-БК | 0,15 |
| IgG1-13mZ-БК | 0,21 |
| IgG1-5m-БК | 0,12 |
| IgG4P-исходное-СНО | 0,18 |
| IgG4P-5m-БК | 0,14 |
| IgG4PE-исходное-СНО | 0,21 |
| IgG4PE-5m-БК | 0,14 |
| B6H12, mu анти-hu CD47 | ~16,0 |

6.4. Пример 4. Анализ фагоцитоза.

Получение макрофагов человека: мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из лейкоцитарной пленки (белого слоя между эритроцитами и плазмой в порции цельной крови после откручивания на центрифуге), полученной из центра переливания крови Stanford (Palo Alto, CA, USA). Лейкоцитарные пленки разбавляли в PBS в 2 раза и насыщали на 15 мл NycoPrep 1,077 (Axis-Shield, Dundee, Scotland) в пробирках Leucosep объемом 50 мл (Greiner Bio One, Monroe, NC, USA) и цен-

трифутировали при $1000 \times g$ в течение 20 мин. PBMC собирали из промежуточного слоя, промывали 35 мл PBS и центрифугировали при $250 \times g$ в течение 5 мин. Имеющиеся в виде примеси эритроциты лизировали, используя 10 мл лизирующего буфера ACK (Lonza, Allendale, NJ, USA), в течение 2 мин, и клетки разбавляли 40 мл PBS и пропускали через 40 мкм клеточное сито (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Клетки центрифугировали при $250 \times g$ в течение 5 мин и ресуспенсировали в 30 мл среды RPMI, содержащей 10% FBS, 2 мМ глутамина и пенициллин-стрептомицин. PBMC подсчитывали и культивировали в концентрации 5×10^6 клеток/мл в среде RPMI в течение ночи. На следующий день CD14-позитивные моноциты выделяли с помощью CD14-микрошарики (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA), используя AutoMacs Pro, и культивировали в среде RPMI, содержащей 50 нг/мл M-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), в течение 5-7 суток, чтобы получить дифференцированные макрофаги. Клетки замораживали в среде для замораживания культур выделенных клеток (Life Technologies, Grand Island, NY, USA).

Измерение активности фагоцитоза: Замороженные или свежие макрофаги человека культивировали в течение ночи в 96-луночных планшетах (20000 клеток в 0,1 мл среды RPMI с добавлением 50 нг/мл M-CSF). На следующий день среду заменяли 50 мкл среды RPMI без M-CSF после одной промывки. CD47-позитивные клетки CCRF-CEM (ATCC, Manassas, VA, USA), высеванные при плотности $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, метили, используя 10 мкМ CellTrace Oregon Green 488 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), в течение 30 мин и промывали 3 раза средой RPMI. Меченные клетки CCRF-CEM (80000 клеток в 50 мкл) и анти-CD47-антитела в 50 мкл среды RPMI добавляли к макрофагам. Анти-CD47-антитела тестировали при конечной концентрации от 4 нг/мл до 10 мкг/мл. Чашки кратковременно центрифугировали и инкубировали при 37°C в течение 3 ч. Макрофаги промывали 3 раза в PBS, чтобы извлечь клетки CCRF-CEM, и открепляли, используя 50 мкл аккутазы (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), при 37°C в течение 10 минут. Макрофаги собирали, промывали один раз буфером для промывки FACS (PBS, содержащий 0,2% FBS) и красили, используя анти-CD14-APC, в течение 15 минут. Клетки два раза промывали и фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 10 мин. Клетки анализировали проточной цитометрией, чтобы определить фагоцитарный индекс (% CD14-позитивных клеток, которые мечены Oregon Green). Данные анализировали с использованием GraphPad Prism, чтобы получить кривые зависимости доза-ответ и значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) с использованием нелинейного регрессионного анализа с переменным наклоном (4 параметра).

Результаты. Фагоцитарную активность наблюдали в случае всех вариантов IgG1 (БК и CHO), и IgG4P и IgG4PE только из CHO. Значения EC_{50} приведены в таблице ниже (табл. 9).

Таблица 9

| | Варианты анти-CD47 | EC_{50} (нМ) |
|--------|---------------------|-----------------------|
| IgG1 | IgG1-исходное-CHO | 0,3 |
| | IgG1-исходное-БК | 0,5 |
| | IgG1-5m-БК (R&D) | 0,6 |
| | IgG1-5m-БК (PD) | 0,3 |
| IgG4P | IgG4P-исходное-CHO | 0,5 |
| IgG4PE | IgG4P-исходное-БК | Не определяли |
| | IgG4P-5m-БК | Не определяли |
| | IgG4PE-исходное-CHO | 0,7 |
| | IgG4PE-исходное-БК | Не определяли |
| | IgG4PE-5m-БК | Не определяли |

6.5. Пример 5. Анализ гемагглютинации.

Опубликованные исследования свидетельствуют о том, что некоторые анти-CD47-антитела могут вызывать гемагглютинацию эритроцитов человека (RBC). Поэтому были осуществлены анализы гемагглютинации, чтобы охарактеризовать способность анти-CD47-антител стимулировать агглютинацию RBC.

RBC человека получали из Innovative Research (№ в каталоге IPLA-WB3). RBC человека (2 мл) промывали в 10 мл 1× dPBS (pH 7,4) и центрифугировали в течение 10 мин при 500g (1500 об/мин). На досадок аспирировали и RBC человека дважды промывали, ресуспенсировали в 8 мл 1× dPBS для получения 20% раствора RBC. Разведение в случае антитела (кролика) против RBC человека (Rockland Immunochemicals Inc., № в каталоге 109-4139, партия 27233), позитивного контроля, было 1:64 с серийными разведениями 1:3 (10×). Исходная концентрация в случае образцов составляла 1000 нМ с серийными разведениями 1:3 (10×). Титрование каждого антитела осуществляли пипеткой (50 мкл) во все лунки 96-луночного планшета с U-образным дном. Раствор RBC (50 мкл 20% раствора RBC) добавляли во все лунки планшета, и планшет инкубировали при 37°C в течение по меньшей мере от 1,5 до 12 ч (примечания).

ние: не наблюдали видимых различий в результатах, полученных в случае 1,5 ч и в течение ночи). Анти-тело (кролика) против RBC человека и MCA911 (мышиное антитело против CD47 человека (клон BRIC 126, Abnova)) служили в качестве позитивных контролей. Анализы визуализировали сверху планшета. Негативные (отсутствие гемагглютинации) результаты были видны в виде интактных красных пятен, тогда как позитивные (гемагглютинация) результаты выглядели в виде растекшегося красной массы.

Результаты: только позитивные контроли (антитело кролика против RBC человека и MCA911 (мышиное антитело против CD47 человека)) приводили к гемагглютинации. Ни моноклональные анти-CD47-антитела, экспрессированные в CHO, ни моноклональные анти-CD47-антитела антитела, экспрессированные в бесклеточной (БК)-системе, включая IgG1-исходное, IgG4P-исходное, IgG4PE-исходное, IgG1-13mZ-БК, IgG1-13m-БК, IgG1-5m-БК, IgG4P-5m-БК, IgG4PE-5m-БК, не приводили к гемагглютинации.

6.6. Пример 6. ELISA связывания C1Q.

Способ: 96-луночные планшеты для ELISA с высокой эффективностью связывания белков (Max-Sorp Nunc) покрывали в течение ночи при 4°C образцами вариантов анти-CD47-антитела, разбавленными в 0,05 М натрий-бикарбонатном буфере (pH 9). Образцы разводили при высокой концентрации 133,4 нМ (20 мкг/мл) и титровали 1:2, получая кривую разведения по 11 точкам. Планшеты три раза промывали PBS, 0,05% твин-20 и блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре разбавителем для ELISA (0,1 М NaPO₄, 0,1 М NaCl, 0,1% желатин, 0,05% твин-20, 0,05% ProClin300). Затем планшеты снова три раза промывали и инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре с 2 мкг/мл C1q человека (AbD Serotec 2221-5504, исходный раствор 1 мг/мл), разбавленного в разбавителе для ELISA. Затем планшеты три раза промывали и инкубировали с антителом овцы против C1q человека-HRP (AbD Serotec 2221-5004P), разбавленным 1:200 в разбавителе для ELISA, в течение 1 ч при комнатной температуре, чтобы выявить связанный C1q. Затем планшеты три раза промывали, затем добавляли 100 мкл раствора TMB. Реакцию гасили добавлением 100 мкл 1 М фосфорной кислоты и планшет считывали при 450 нМ. Графики данных строили с использованием Prism6 в виде кривой нелинейной регрессии: log (ингибитор) против ответа - переменный наклон (четыре параметра).

Результаты: IgG1-QN1-CHO проявляет активность в анализе ELISA C1Q, тогда как IgG4P, IgG4PE, и scFv моноклональные анти-CD47-антитела не проявляют активности ("NA") в анализе ELISA C1Q. Значения EC₅₀ приведены в таблице ниже (табл. 10).

Таблица 10

| Образец | EC ₅₀ (нМ) |
|----------------------|-----------------------|
| IgG1-исходное-CHO | 3,6 |
| IgG1-исходное-БК | NA |
| IgG1-13mZ-БК | NA |
| IgG1-13m-БК | NA |
| IgG1-5m-БК | NA |
| IgG4P-исходное-CHO | NA |
| IgG4P-исходное-БК | NA |
| IgG4P-5m-БК | NA |
| Анти-CD47 B6H12 scFv | NA |
| IgG4PE-исходное-CHO | NA |
| IgG4PE-исходное-БК | NA |
| IgG4PE-5m-БК | NA |

6.7. Пример 7. Анализ зависимой от комплемента цитотоксичности (CDC).

Способы: CD47-экспрессирующие линии клеток (Raji и/или CCRF) собирали и ресусцидировали в буфере CDC (RPMI 1640, L-глутамин (100× маточный раствор) и 1% БСА) в концентрации 0,3 миллиона клеток в миллилитре. Затем клетки высевали по 10000 клеток на лунку в 96-луночный планшет для культуры ткани с белыми лунками (Falcon) и инкубировали с образцами вариантов анти-CD47-антитела в конечной концентрации 10 мкг/мл в буфере CDC при 37°C в течение 1 ч. Центрифужные фильтры (микроцентрифужные пробирки Costar SpinX) использовали для удаления остаточных загрязнителей. Затем добавляли сыворотку кролика (7,5%) или человека (30%) в конечной концентрации 2,5% и 10%, соответственно, и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Сыворотку разбавляли буфером для анализа CDC. Затем измеряли гибель клеток с использованием набора Cell Tox Glot (Promega G292) и следуя инструкциям производителя. Планшеты считывали на считающем устройстве для планшетов Envision luminescent (программа Luminescent 96 well full area) и вычисляли CDC-активность в процентах в виде (обработанные клетки-спонтанные клетки)/(общий лизис-спонтанный лизис)*100.

Результаты: CDC-активность наблюдали в случае антител Bric 126, анти-CD20-IgG1-антител и ан-

ти-CD20-IgG4-антител, тогда как CDC-активность не наблюдали ("NA") ни при каких других антителах. Значения EC₅₀ приведены в таблице ниже (табл. 11).

Таблица 11

| Название | EC ₅₀ (нМ) |
|-------------------------------|-----------------------|
| CD20 IgG1 | 0,21 |
| BRIC 126 (анти-CD47-антитело) | 0,0014 |
| B6H12 (анти-CD47-антитело) | NA |
| IgG1-исходное-CHO | NA |
| IgG4P-исходное-CHO | NA |
| IgG4PE-исходное-CHO | NA |
| IgG1-исходное-БК | NA |
| IgG1-5m-БК | NA |
| IgG1-13m-БК | NA |
| IgG1-13mZ-БК | NA |
| IgG4P-исходное-БК | NA |
| IgG4P-5m-БК | NA |
| Контрольный изотип IgG1 | NA |
| Контрольный изотип IgG4 | NA |
| IgG4PE-исходное-БК | NA |
| IgG4PE-5m-БК | NA |

6.8. Пример 8. Анализ зависимой от антител цитотоксичности (ADCC).

Способы: РВС получали из лейкоцитарной пленки. Лейкоцитарные пленки разбавляли в PBS в 2 раза и насыщали на 15 мл NucoPrep 1,077 (Axis-Shield, Dundee, Scotland) в пробирках Leucosep объемом 50 мл (Greiner Bio One, Monroe, NC, USA) и центрифугировали при 1000 × g в течение 20 мин. РВМС собирали из промежуточного слоя и промывали 35 мл PBS и центрифугировали при 250×g в течение 5 мин. Имеющиеся в виде примеси эритроциты лизировали, используя 10 мл лизирующего буфера ACK (Lonza, Allendale, NJ, USA), в течение 2 мин, и клетки разбавляли 40 мл PBS и пропускали через 40 мкм клеточное сито (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Клетки центрифугировали при 250×g в течение 5 мин и ресуспендировали в 30 мл среды RPMI, содержащей 10% FBS, 2 мМ глутамина и пенициллин-стрептомицин. 10000 клеток CCRF-CEM или SKBR3 культивировали совместно с 300000 РВМС в каждой лунке в 96-луночном полипропиленовом планшете с U-образным дном. РВМС получали из лейкоцитарной пленки человека, полученной из центра переливания крови Stanford. Трехкратные разведения образцов вариантов добавляли в каждую лунку в двух повторах, начиная с наибольшей концентрации 22,2 нМ, и инкубировали при 37°C в течение 3 ч. Затем клетки лизировали в 50 мкл реагента Glo, следуя инструкциям производителя. Планшеты считывали на считывающем устройстве для планшетов Envision luminescent (программа Luminescent 96 well full area). Активность ADCC в процентах вычисляли в виде (обработанные клетки - спонтанные клетки)/(общий лизис спонтанный лизис)*100.

Результаты: ADCC-активность наблюдали в случае антител трастузумаба (CHO) и исходного IgG1-CHO, которые оба были экспрессированы в клетках CHO; тогда как ADCC-активность не наблюдали ("NA") ни при каком другом тестированном анти-CD47-антителе (экспрессированных в клетках CHO или экспрессированных в БК-системе). Значения EC₅₀ приведены в таблице ниже (табл. 12).

Таблица 12

| Название антитела | IC ₅₀ (нМ) |
|-------------------------|-----------------------|
| IgG1-исходное-CHO | 0,06 |
| трастузумаб (CHO) | 0,001 |
| трастузумаб (БК) | NA |
| Контрольный изотип IgG1 | NA |
| IgG4P-исходное-CHO | NA |
| IgG4PE-исходное-CHO | NA |

| | |
|-------------------------|----|
| Контрольный изотип IgG4 | NA |
| IgG1-исходное-БК | NA |
| IgG1-5m-БК | NA |
| IgG1-13m-БК | NA |
| IgG1-13mZ-БК | NA |
| IgG4P-исходное-БК | NA |
| IgG4P-5m-БК | NA |
| IgG4PE-исходное-БК | NA |
| IgG4PE-5m-БК | NA |

6.9. Пример 9. Анализ с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) (анализ термостабильности).

Способ: Дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК) осуществляли на приборе для капиллярной ДСК GE VP. Анализ проводили при температуре 20-100°C с изменением нагрева 60°C/ч. Режим обратной связи был отключен, и использовали период фильтрации 10 с. Период термостатирования перед сканированием был установлен на 5 мин. Все образца тестировали в концентрации 1 мг/мл в следующем буфере: 50 мМ L-гистидин, 150 мМ NaCl, 2% трегалоза, pH 6,0.

Результаты: С использованием ДСК анализировали три разных конструкции анти-CD47-IgG1-антитела:

- 1) IgG1-13mZ;
- 2) IgG1-13m;
- 3) IgG1-5m.

В частности, интерес представлял переход в расплавленное состояние Fab-домена (TM2), учитывая что три антитела отличались только по остаткам, локализованным в Fab-домене. Как показывают данные на фиг. 3А, наблюдалось хорошее согласованное разворачивание при переходе Fab в случае всех трех конструкций, при этом IgG1-5m имел самую высокую TM2.

В таблице ниже (табл. 13) суммированы температуры переходов для трех разных переходов всех трех анти-CD47-IgG1-конструкций. Как можно видеть, могут наблюдаться только миорные (<1,0°C) различия в TM для переходов CH2 (TM1) и CH3 (TM3). Однако TM2 IgG1-5m свидетельствует о стабилизации с температурой на 1,5°C выше по сравнению с другими вариантами.

Таблица 13

| Вариант | TM1 [°C] | TM2 [°C] | TM3 [°C] |
|-----------|----------|----------|----------|
| IgG1-13mZ | 62,0 | 75,3 | 81,8 |
| IgG1-13m | 62,5 | 75,3 | 82,5 |
| IgG1-5m | 62,2 | 76,6 | 82,8 |

В частности, IgG1-5m проявляет удивительно улучшенную термостабильность по сравнению с полученным в культуре клеток СНО эталонным стандартом IgG4PE (CHO IgG4PE) (фиг. 3В). Как можно видеть, все термоиндуцированные переходы в случае материала CHO IgG4PE лежат ниже 75°C, тогда как IgG1-5m в значительной степени стабилизирован и денатурирует при более высоких температурах, за исключением домена CH2 при 62,2°C.

Чтобы увидеть, может ли термостабилизация, наблюдаемая в контексте IgG1, также распространяется на остов IgG4, с использованием ДСК сравнивали три следующих варианта анти-CD47-IgG4:

- 1) IgG4PE-5m;
- 2) IgG4P-5m;
- 3) IgG4PE CHO.

Как видно на термограмме, представленной на фиг. 3С, плавление Fab-области в контексте IgG4P и IgG4PE улучшается на 9°C при введении 5-мутаций по сравнению с эталонным материалом IgG4PE CHO.

Полученные результаты, вместе взятые, показывают, что термостабилизация Fab-домена может быть достигнута введением выбранных мутаций. Так как область Fab остается неизменной в оставах IgG1 и IgG4, повышение термостабильности по-видимому распространяется с одного остова на другой, что свидетельствует о том, что это также может быть справедливым и в отношении других изотипов IgG1.

6.10. Пример 10. Фармакокинетические свойства анти-CD47-антител.

Способы: анти-CD47-антитела IgG4-PE CHO, IgG1-БК и IgG1-5m-БК вводили мышам в виде болясной внутривенной инъекции в дозах на уровне 3,0, 3,0 и 2,5 мг/кг, соответственно. Образцы плазмы собирали в выбранных временных точках до 28 суток (672 ч) после введения дозы и определяли концентрацию соответствующего белка в иммуноанализе. Затем определяли фармакокинетические свойства с

использованием подходя без учета компартментов с использованием WinNonlin "v" 5.3, Phoenix 64 (Certara, CA). AUC вычисляли, используя линейное правило трапеций для восходящей части кривой и логарифмическое правило трапеций для нисходящей части. Конечное время полужизни определяли на основании регрессии log концентрации в плазме относительно времени. Количество точек, используемых для регрессии определяли в результате визуального просмотра данных, при этом использовали минимум три конечных временных точки. Начальный объем распределения вычисляли на основании дозы/концентрации в плазме, экстраполированной к нулевому времени. Все другие параметры вычисляли в WinNonlin с использованием стандартных способов.

Результаты: фармакокинетика в случае IgG4-РЕ СНО, IgG1-БК и IgG1-5m-БК была сходной. Клиренс является низким, что приводит к относительно длительному времени полужизни, несмотря на то, что объемы распределения также являются небольшими, обычными для таких типов соединений. Начальный объем распределения был приблизительно равен объему крови, хотя объемы распределения на основании площади и в стационарном состоянии составляли приблизительно половину от внеклеточной воды.

| Конъюгат | C_0 (мкг/мл) | Cl | | | | | | |
|-------------|-------------------|---------------------------------------|------------------------------------|--|-----------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | | AUC _{last} (мкг*час/с/мл) | AUC _∞ (мкг*час/с/мл) | Конечн ое е t _{1/2} (час) | (мл/ч ас/кг) | Начальны й V (мл/кг) | V _z (мл/кг) | V _{ss} (мл/кг) |
| IgG4-РЕ СНО | 76,13 | 10063 | 11391 | 218,8 | 0,26 | 873 | 83,2 | 80 |
| IgG1-БК | 64,9 | 7009 | 7368 | 165 | 0,41 | 148 | 96,9 | 100,8 |
| IgG1 | 48,8 | 7021 | 7789 | 193,1 | 0,32 | 51,22950 | 89,4 | 92,4 |
| (5 mut)-БК | | | | | | 82 | | |

6.11. Пример 11. Противоопухолевая активность *in vivo*.

Противоопухолевую активность анти-CD47-антител, полученных в бесклеточной системе, тестировали *in vivo* с применением модели ксенотрансплантатов опухолей, используя линию клеток миеломы человека RPMI8226.

Способы: мышам NOD/SCID подкожно инъецировали клетки RPMI 8226. Затем мышей обрабатывали контрольным наполнителем, hIgG4 или БК-анти-CD47-антителами, такими как анти-CD47 IgG1-5m, которые вводили (qwx3) в дозе 1 мг/кг, 0,3 мг/кг или 0,1 мг/кг. Контролировали объем опухолей.

Результаты: на фиг. 5 изображен график зависимости объема опухолей от времени (дни после инокуляции опухолей). БК-анти-CD47 IgG1-5m-антитело позволяло достигать уменьшения объема опухоли (TVR) на 83% при дозе 1 мг/кг и TVR 50% при дозе 0,3 мг/кг. Процент мышей без опухолей в конце составлял 25% (2/8) в случае дозы 1 мг/кг БК-анти-CD47 IgG1-5m-антитела.

Все публикации (например, публикации или патенты или заявки на выдачу патентов), цитированные в настоящем описании, включены в настоящую публикацию в виде ссылки в полном объеме и для всех целей в такой же степени, как и в том случае, если бы специально и по отдельности было указано, что каждая отдельная публикация (например, публикация или патент или заявка на выдачу патентов) включена в виде ссылки в полном объеме для всех целей.

Другие варианты входя в объем следующей далее формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD47, содержащее по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из S228P и L235E согласно нумерации EU в константном домене в пределах шарнирной области для предотвращения или снижения обмена цепями, и

где антитело при получении с использованием бесклеточной системы дает более высокий титр экспрессируемых антител или выход по сравнению с исходным антителом, получаемым с использованием бесклеточной системы, содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность: $X_1QX_2QLVQSGAEVKX_3GX_4SVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQX_5LEWMGWIDPDQGDTEYAQKX_6QX_7RVTX_8TX_9DX_{10}SX_{11}STAYMELX_{12}SLRSX_{13}DTAX_{14}YYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV$ (SEQ ID NO:20), где X_1 представляет собой M или в положении X_1 аминокислота отсутствует, X_2 представляет собой M или V, X_3 представляет собой P, X_4 представляет собой S или A, X_5 представляет собой A или G, X_6 представляет собой F или L, X_7 представляет собой G, X_8 представляет собой I или M, X_9 представляет собой R или T, X_{10} представляет собой R или T, X_{11} представляет собой T, X_{12} представляет

собой R, X₁₃ представляет собой E или D и X₁₄ представляет собой V; и

(ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, содержащую аминокислотные последовательности KASQDIHRYLS (SEQ ID NO:17), RANRLVS (SEQ ID NO:18) и LQY-DEFPYT (SEQ ID NO:19), соответственно,

где антитело содержит одну или несколько модификаций в каркасном домене вариабельной области тяжелой цепи по сравнению с родительским анти-CD47 антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, 2, 3 или 4.

2. Моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD47 человека, где антитело, если получено с использованием бесклеточной системы, дает более высокий титр экспрессии антитела или выход по сравнению с родительским антителом, полученным с использованием бесклеточной системы, содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность: X₁QX₂QLVQSGAEVKKX₃GX₄SVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQX₅LEWMGWIDPDQGDTEYAQ KX₆QX₇RTVX₈TX₉DX₁₀SX₁₁STAYMELX₁₂SLRSX₁₃DTAX₁₄YYCNAAYGSSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO:20), где X₁ представляет собой M или в положении X₁ аминокислота отсутствует, X₂ представляет собой M или V, X₃ представляет собой P, X₄ представляет собой S или A, X₅ представляет собой A или G, X₆ представляет собой F или L, X₇ представляет собой G, X₈ представляет собой I или M, X₉ представляет собой R или T, X₁₀ представляет собой R или T, X₁₁ представляет собой T, X₁₂ представляет собой R, X₁₃ представляет собой E или D, и X₁₄ представляет собой V; и

(ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, содержащую аминокислотные последовательности KASQDIHRYLS (SEQ ID NO:17), RANRLVS (SEQ ID NO:18) и LQY-DEFPYT (SEQ ID NO:19), соответственно,

где антитело содержит одну или несколько модификаций в каркасном домене вариабельной области тяжелой цепи по сравнению с родительским анти-CD47 антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, 2, 3 или 4.

3. Антитело по п.1 или 2, в котором V_H содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

4. Антитело по п.1 или 2, в котором V_H содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

5. Антитело по п.1 или 2, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5.

6. Антитело по п.1 или 2, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

7. Антитело по п.1 или 2, которое содержит VH в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7.

8. Антитело по п.1 или 2, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

9. Антитело по п.1 или 2, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9.

10. Антитело по п.1 или 2, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10.

11. Антитело по п.1 или 2, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11.

12. Антитело по любому из пп.1-11, которое при экспрессии с использованием бесклеточной системы проявляет более низкую аффинность связывания или не связывается с Fc_γR по сравнению с экспрессией с использованием клеток CHO.

13. Антитело по любому из пп.1-11, которое содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO: 13 без аминокислоты M на N-конце.

14. Антитело по п.1 или 2, где X₁ представляет собой M или в положении X₁ отсутствует аминокислота, X₂ представляет собой M, X₃ представляет собой P, X₄ представляет собой S, X₅ представляет собой G, X₆ представляет собой F, X₇ представляет собой G, X₈ представляет собой I, X₉ представляет собой R, X₁₀ представляет собой R, X₁₁ представляет собой T, X₁₂ представляет собой R, X₁₃ представляет собой E и X₁₄ представляет собой V.

15. Антитело по п.1, где антитело содержит VH в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7.

16. Антитело по п.1, где X₁ представляет собой M или в положении X₁ отсутствует аминокислота, X₂ представляет собой M, X₃ представляет собой P, X₄ представляет собой S, X₅ представляет собой A, X₆ представляет собой F, X₇ представляет собой G, X₈ представляет собой I, X₉ представляет собой R, X₁₀ представляет собой R, X₁₁ представляет собой T, X₁₂ представляет собой R, X₁₃ представляет собой E и X₁₄ представляет собой V.

17. Коньюгат, содержащий антитело по любому из пп.1-16, которое коньюгировано с меткой или токсином.

18. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественной опухоли, экспрессирующей CD47, содержащая терапевтически эффективное количество анти-CD47-антитела по любому из пп.1-17 или его антигенсвязывающего фрагмента, и фармацевтически приемлемый носитель.

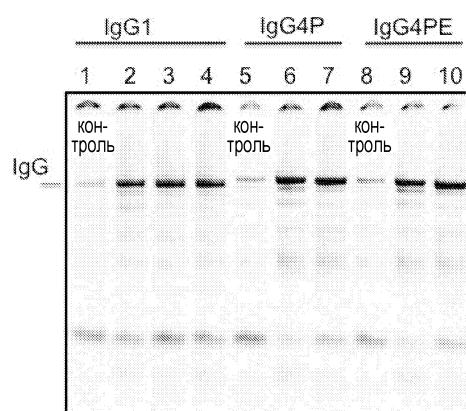
19. Способ лечения злокачественной опухоли, экспрессирующей CD47, который включает введение анти-CD47-антитела по любому из пп.1-16 пациенту, в количестве, достаточном для лечения злокачественной опухоли.

20. Способ облегчения симптома злокачественной опухоли, экспрессирующей CD47, который включает введение анти-CD47-антитела по любому из пп.1-16 пациенту, в количестве, достаточном для облегчения одного или нескольких симптомов злокачественной опухоли.

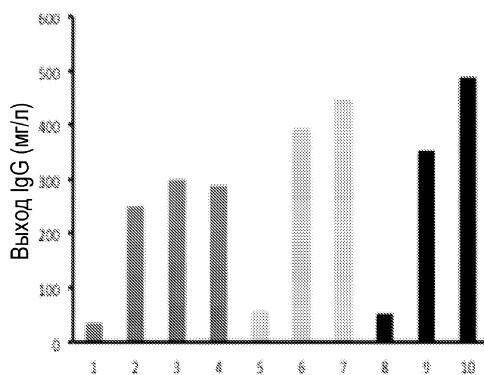
21. Способ по любому из пп.19-20, в котором злокачественная опухоль является гематологической злокачественной опухолью.

22. Способ по любому из пп.19-20, в котором злокачественная опухоль является солидным раком.

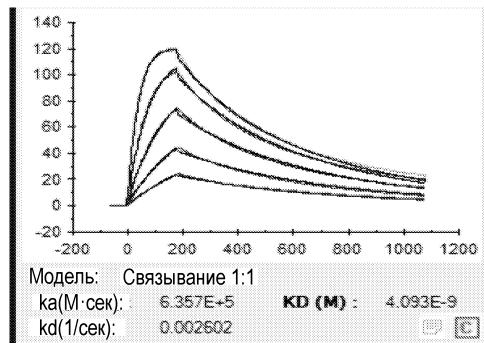
23. Способ по любому из пп.19-22, в котором злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому, неходжкинскую лимфому, острый миелоидный лейкоз (AML), рак молочной железы, рак мочевого пузыря, немелкоклеточный рак/карциному легкого, гепатоклеточную карциному (HCC), саркому или рак головы и шеи.



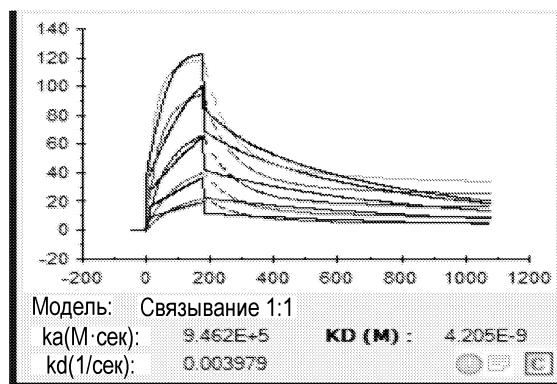
Фиг. 1А



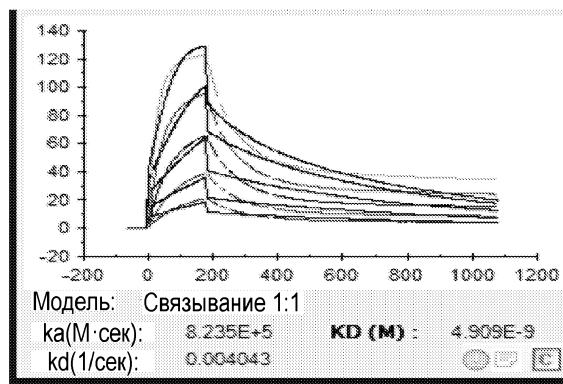
Фиг. 1В



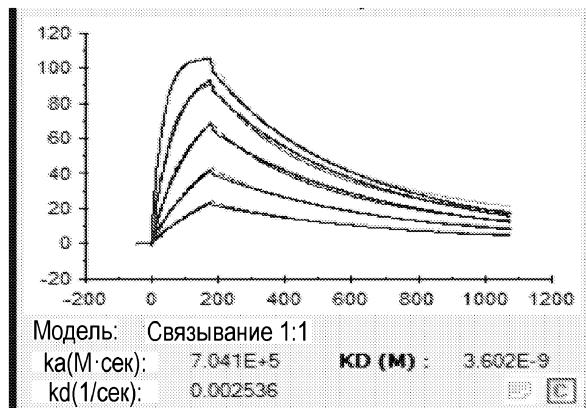
Фиг. 2А



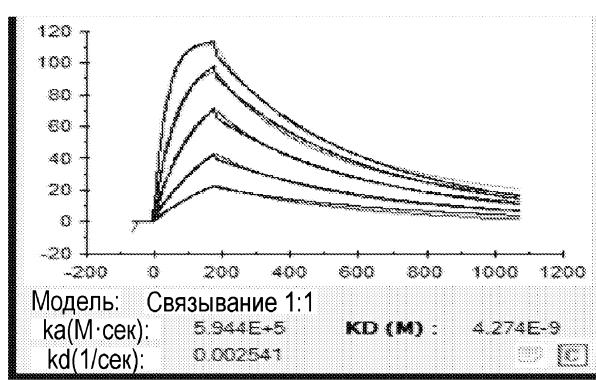
Фиг. 2В



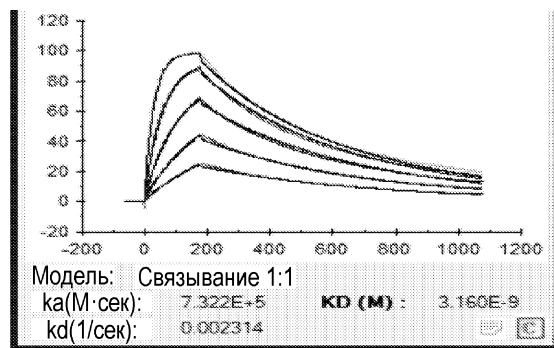
Фиг. 2С



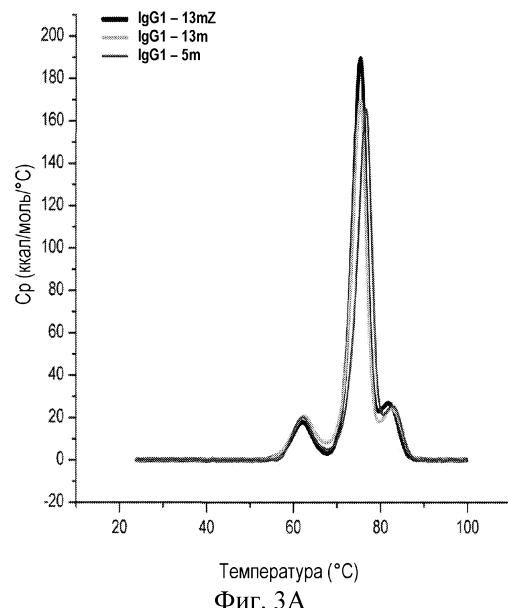
Фиг. 2Д



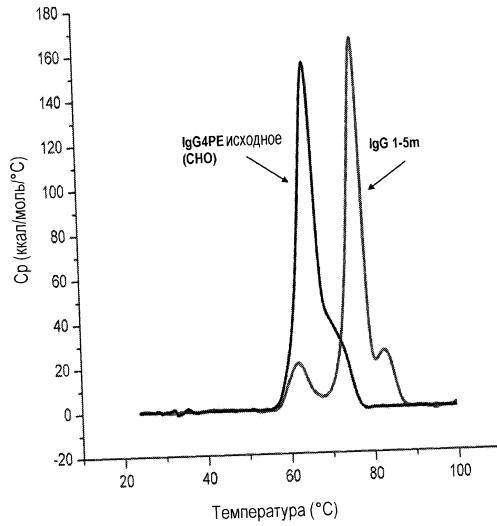
Фиг. 2Е



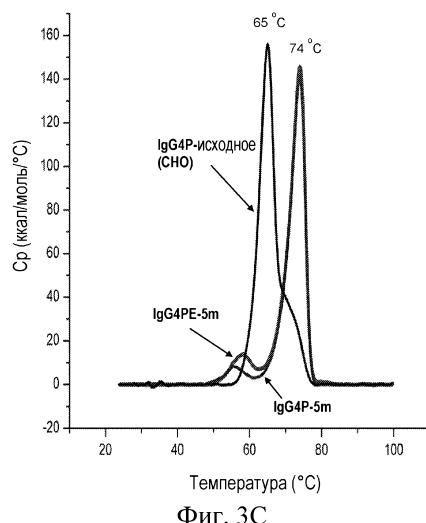
Фиг. 2F



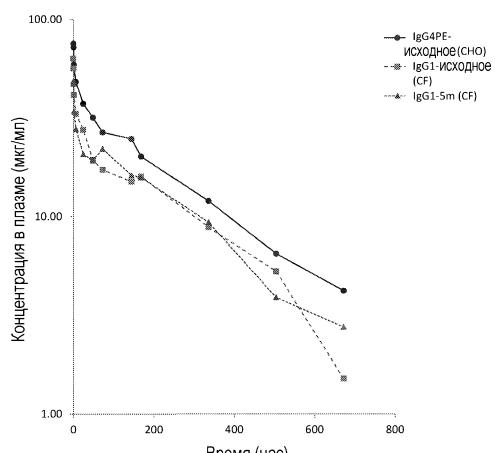
Фиг. 3А



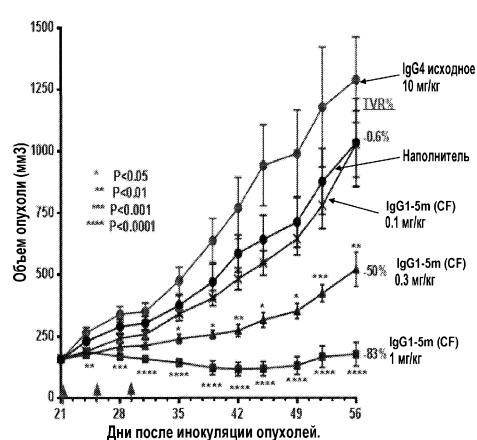
Фиг. 3В



Фиг. 3С



Фиг. 4



Фиг. 5

