

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201400875** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2015.01.30

(51) Int. Cl. *C12P 21/08* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2013.02.06

(54) **АНТИТЕЛА К CD47 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **61/595,216; 61/659,752**

(32) **2012.02.06; 2012.06.14**

(33) **US**

(86) **PCT/US2013/024995**

(87) **WO 2013/119714 2013.08.15**

(71) Заявитель:
ИНХИБРКС ЛЛК (US)

(72) Изобретатель:
**Экелмэн Брендэн, Тиммер Джон,
Разай Амир, Деверо Куинн, Джонс
Кайл, Нгуй Питер Л. (US)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение в общем имеет отношение к моноклональным антителам, распознающим CD47, более конкретно таким антителам к CD47, которые не вызывают существенной агглютинации клеток, к способам получения таких антител и к способам применения этих моноклональных антител в качестве терапевтических средств.

201400875
A1

201400875

A1

АНТИТЕЛА К CD47 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Родственные заявки

Настоящая заявка претендует на приоритет согласно 35 U.S.C. § 119(e) по Предварительной заявке на патент США No. 61/595,216, поданной 6 февраля 2012 г., и Предварительной заявке на патент США No. 61/659,752, поданной 14 июня 2012 г. Каждая из этих заявок включена сюда путем ссылки во всей полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в общем имеет отношение к моноклональным антителам, распознающим CD47, более конкретно таким антителам к CD47, которые не вызывают гемагглютинации эритроцитов человека, к способам получения таких антител и к способам применения этих моноклональных антител в качестве терапевтических средств.

Уровень техники

CD47, также известный как ассоциированной с интегрином белок (IAP), антиген ОА3 рака яичников, связанный с Rh антиген и MER6, представляет собой многократно-пронизывающий трансмембранный рецептор, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов. Экспрессия и/или активность CD47 были вовлечены в ряде заболеваний и расстройств. Соответственно, существует потребность в способах терапии, нацеленных на CD47.

Сущность изобретения

Настоящим изобретением предусмотрены моноклональные антитела, которые распознают и связываются с CD47, в частности с CD47 человека. Антитела по изобретению способны модулировать, например, блокировать, ингибировать, уменьшать, противодействовать, нейтрализовать или иным образом нарушать экспрессию, активность и/или сигнализирование CD47, причем эти антитела не вызывают существенной гемагглютинации эритроцитов человека, также называемых красными клетками крови. Однако способность антител настоящего изобретения связывать CD47 на поверхности клеток и не вызывать слипания клеток не ограничивается эритроцитами. Антитела настоящего изобретения уникально связывают CD47 таким образом, который не вызывает слипания CD47-положительных клеток. Антитела по изобретению и их производные способны модулировать, например, блокировать, ингибировать, уменьшать,

противодействовать, нейтрализовать или иным образом нарушать взаимодействие между CD47 и SIRP α (регулирующий сигналы белок α), причем эти антитела не вызывают существенной гемагглютинации эритроцитов человека. Предусмотренные здесь антитела собирательно именуется “антителами к CD47”. Антитела к CD47 по изобретению представляют существенное улучшение перед существующими антителами к CD47, вызывающими гемагглютинацию эритроцитов человека (например, см. Kikuchi Y, Uno S, Yoshimura Y et al. A bivalent single-chain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 315: 912-8). Так, антитела к CD47 по изобретению представляют существенное улучшение перед существующими антителами B6H12, BRC126 и CC2C6 к CD47, которые все блокируют SIRP α , но вызывают гемагглютинацию эритроцитов, как это подробно описано ниже. Антитела к CD47 типа полного IgG по настоящему изобретению (к примеру, 2A1 и его гуманизированные производные, включая представленные в табл. 1) не вызывают существенной агглютинации клеток. Так, антитела к CD47 по изобретению не вызывают гемагглютинации эритроцитов. Здесь впервые описаны антитела к CD47 в формате полного IgG, которые блокируют SIRP α и не вызывают существенной агглютинации.

Антитела к CD47 по изобретению проявляют многие желательные характеристики, такие, без ограничения, как сильное блокирование взаимодействия между CD47 и его лигандом SIRP α без существенной гемагглютинации эритроцитов, а также сильная противоопухолевая активность. Например, антитела к CD47 по изобретению блокируют взаимодействие между CD47 и SIRP α по меньшей мере на 40%, на 45%, на 50%, на 55%, на 60%, на 65%, на 70%, на 75%, на 80%, на 85%, на 95%, или по меньшей мере на 99% по сравнению с уровнем взаимодействия между CD47 и SIRP α в отсутствие описанных здесь антител к CD47.

Антитела к CD47 по изобретению не вызывают существенной агглютинации клеток, например, антитела к CD47 по изобретению не вызывают существенной гемагглютинации эритроцитов. В некоторых случаях существенная агглютинация клеток относится к степени агглютинации в присутствии существующих антител к CD47. В одном аспекте степень агглютинации в присутствии антител к CD47 по изобретению уменьшается по меньшей мере на 5%, на 10%, на 20%, на 30%, на 40%, на 50%, на 60%, на 70%, на 80%, на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению со степенью агглютинации в присутствии существующих антител к CD47. В некоторых воплощениях антитела к CD47 по изобретению не вызывают существенной агглютинации, если степень агглютинации в присутствии антител к CD47 по изобретению уменьшается по меньшей мере на 5%, на 10%, на 20%, на 30%, на 40%, на 50%, на 60%, на 70%, на 80%, на 90% или

по меньшей мере на 99% по сравнению со степенью агглютинации в присутствии существующих антител к CD47. В других воплощениях антитела к CD47 по изобретению не вызывают существенной агглютинации, если степень агглютинации в присутствии антител к CD47 по изобретению уменьшается по меньшей мере на 5%, на 10%, на 20%, на 30%, на 40%, на 50%, на 60%, на 70%, на 80%, на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению со степенью агглютинации в присутствии антитела 1B4 к CD47, которое содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи и последовательность варибельной области легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 81, соответственно. Предпочтительно антитела к CD47 по изобретению не вызывают существенной агглютинации клеток при концентрации антител от 10 пМ до 10 мкМ, например, при концентрации антител в 50 пМ, 100 пМ, 1 нМ, 10 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 1 мкМ или 5 мкМ.

Антитела настоящего изобретения также являются значительно более сильными на моделях опухолей по сравнению с антителами, известными в данной области. Например, способность макрофагов к фагоцитозу опухолевых клеток в присутствии антител к CD47 по изобретению повышается по меньшей мере на 5%, на 10%, на 20%, на 30%, на 40%, на 50%, на 60%, на 70%, на 80%, на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению со способностью макрофагов к фагоцитозу опухолевых клеток в присутствии существующих антител к CD47.

Специалистам должно быть известно, что степень агглютинации, например, степень гемагглютинации эритроцитов, можно количественно определить без излишнего экспериментирования. Например, специалистам должно быть известно, что степень гемагглютинации определяется путем измерения площади в точке RBC после выполнения анализа гемагглютинации в присутствии антител к CD47 по изобретению, как описано в приведенных ниже примерах. В некоторых случаях площадь в точке RBC в присутствии антител к CD47 по изобретению сравнивается с площадью в точке RBC в отсутствие антител к CD47, т.е. при нулевой гемагглютинации. Таким образом, гемагглютинация определяется количественно относительно исходного уровня (контроля). Большая площадь в точке RBC соответствует более высокой степени гемагглютинации. С другой стороны, для количественной оценки гемагглютинации также может применяться денситометрия пятен RBC.

Описанные здесь антитела к CD47 применимы при лечении, замедлении течения, предотвращении рецидива или ослаблении симптомов рака или других неопластических состояний. Так, описанные здесь антитела к CD47 применимы при лечении гематологических раковых заболеваний и/или опухолей. Например, описанные здесь

антитела к CD47 применимы при лечении опухолей CD47+. В качестве примера, без ограничения, описанные здесь антитела к CD47 применимы при лечении неходжкинской лимфомы (NHL), острой лимфоцитарной лейкемии (ALL), острой миелогенной лейкемии (AML), хронической лимфоцитарной лейкемии (CLL), хронической миелогенной лейкемии (CML), множественной миеломы (MM), рака молочной железы, рака яичников, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, меланомы, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака легких, лейомиомы, лейомиосаркомы, глиомы, глиобластомы и др. Твердые опухоли включают, например, опухоли молочной железы, опухоли яичников, опухоли легких, опухоли поджелудочной железы, опухоли предстательной железы, опухоли меланомы, колоректальные опухоли, опухоли легких, опухоли головы и шеи, опухоли мочевого пузыря, опухоли пищевода, опухоли печени и опухоли почек.

В настоящем изобретении “гематологический рак” означает рак крови и включает лейкемию, лимфому и миелому, среди прочего. “Лейкемия” означает такой рак крови, при котором вырабатывается слишком много лейкоцитов, неэффективных в борьбе с инфекцией, при этом вытесняются другие составные части крови, такие как тромбоциты и эритроциты. Подразумевается, что случаи лейкемии классифицируются как острые или хронические. Определенные формы лейкемии включают, в качестве примера, но без ограничения, острую лимфоцитарную лейкемию (ALL), острую миелогенную лейкемию (AML), хроническую лимфоцитарную лейкемию (CLL), хроническую миелогенную лейкемию (CML), миелопролиферативные заболевания (MPDS) и синдром миелодисплазии. “Лимфома” может означать лимфому Ходжкина, вялотекущую или агрессивную неходжкинскую лимфому, лимфому Беркитта или фолликулярную лимфому (мелкоклеточную или крупноклеточную) и др. Миелома может означать множественную миелому (MM), гигантоклеточную миелому, миелому тяжелых цепей или легких цепей либо миелому Бенс-Джонса.

Примеры моноклональных антител по изобретению включают, к примеру, антитела, описанные здесь. Примеры антител включают антитела, у которых переменная область тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO: 5-30, а переменная область легкой цепи выбрана из SEQ ID NO: 31-47. Антитела также включают антитела, у которых переменная область тяжелой цепи по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична последовательности, приведенной по меньшей мере в одной из SEQ ID NO: 5-30, а переменная область легкой цепи по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична последовательности, приведенной по меньшей мере в одной из SEQ ID NO: 31-

47. Предпочтительно антитела распознают и связываются с CD47 человека и не вызывают существенной гемагглютинации эритроцитов человека. Такие антитела соответственно именуется здесь антителами к CD47. Антитела к CD47 включают полностью человеческие моноклональные антитела, а также гуманизированные моноклональные антитела и химерные антитела. Такие антитела проявляют специфичность в отношении CD47 человека, причем показано, что они модулируют, например, блокируют, ингибируют, уменьшают, противодействуют, нейтрализуют или иным образом нарушают экспрессию, активность и/или сигнализирование CD47 без существенной гемагглютинации эритроцитов.

Представленные здесь антитела к CD47 проявляют ингибирующую активность, к примеру, ингибируя экспрессию (например, ингибируя экспрессию CD47 на клеточной поверхности), активность и/или сигнализирование CD47 либо нарушая взаимодействие CD47 и SIRP α . Представленные здесь антитела полностью или частично снижают или иным образом модулируют экспрессию или активность CD47 при связывании или при ином взаимодействии с CD47, например, CD47 человека. Ослабление или модулирование биологической функции CD47 является полным, существенным или частичным при взаимодействии между антителами и полипептидом и/или пептидом CD47 человека. Считается, что антитело полностью ингибирует экспрессию или активность CD47, если 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, в отсутствие связывания с описанным здесь антителом. Считается, что антитело существенно ингибирует экспрессию или активность CD47, если уровень экспрессии или активности CD47 в присутствии антитела снижается по меньшей мере на 50%, например, на 55%, 60%, 75%, 80%, 85 % или на 90% по сравнению с уровнем экспрессии или активности CD47 в отсутствие связывания с описанным здесь антителом к CD47. Считается, что антитело частично ингибирует экспрессию или активность CD47, если уровень экспрессии или активности CD47 в присутствии антитела снижается меньше чем на 95%, например, на 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% или на 90% по сравнению с уровнем экспрессии или активности CD47 в отсутствие взаимодействия, например, связывания с описанным здесь антителом.

Антитела по изобретению также включают моноклональные антитела, которые специфически связываются с CD47, при этом они не вызывают существенной агглютинации, например, гемагглютинации эритроцитов (“гемагглютинации RBC”). Антитела настоящего изобретения уникально связываются с CD47 таким образом, что это

не вызывает слипания CD47-положительных клеток; однако способность антител настоящего изобретения связывать CD47 на поверхности клеток и не вызывать слипания клеток не ограничивается эритроцитами.

Фармацевтические композиции по изобретению могут включать антитело по изобретению и носитель. Такие фармацевтические композиции могут быть включены в наборы, такие, к примеру, как диагностические наборы.

Изобретением предусмотрены моноклональные антитела, которые связываются с CD47, либо их иммунологически активные фрагменты, причем данные антитела не вызывают существенной агглютинации клеток после введения, например, антитела не вызывают существенной гемагглютинации эритроцитов после введения. В некоторых воплощениях антитела являются химерными, гуманизированными или полностью человеческими. В некоторых воплощениях антитела связываются с CD47 человека. В некоторых воплощениях антитела либо их иммунологически активные фрагменты предотвращают взаимодействие CD47 с SIRP α . Считается, что антитело полностью ингибирует взаимодействие CD47 с SIRP α , если уровень взаимодействия CD47/SIRP α в присутствии антитела снижается по меньшей мере на 95%, например, на 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% по сравнению с уровнем взаимодействия CD47/SIRP α в отсутствие взаимодействия с антителом, например, связывания с антителом. Считается, что антитело частично ингибирует взаимодействие CD47/SIRP α , если уровень взаимодействия CD47/SIRP α в присутствии антитела снижается менее чем на 95%, например, на 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% или на 90% по сравнению с уровнем взаимодействия CD47/SIRP α в отсутствие взаимодействия с антителом, например, связывания с антителом.

Количество антител, достаточное для лечения или профилактики рака у субъекта, к примеру, составляет такое количество, которое достаточно для снижения сигнализации CD47 (например, см. Yamauchi et al., 2013 Blood, Jan 4. [Epub ahead of print]; Soto-Pantoja et al., 2013 Expert Opin Ther Targets, 17: 89-103; Irandoust et al., 2013 PLoS One, Epub Jan 8; Chao et al., 2012 Curr Opin Immunol, 24: 225-32; Theocharides et al., 2012 J Exp Med, 209(10): 1883-99; Csányi et al., 2012 Arterioscler Thromb Vasc Biol, 32: 2966-73; Maxhimer et al., 2009 Sci Transl Med, 1: 3ra7; Sarfati et al., 2008 Curr Drug Targets, 9: 842-850; Miyashita et al., 2004 Mol Biol Cell, 15: 3950-3963; E.J. Brown and W.A. Frazier, 2001 Trends Cell Biol, 11: 130-135; Oldenborg et al., 2001 J Exp Med, 193: 855-862; Blazar et al., 2001 J Exp Med, 194: 541-549; Oldenborg et al., 2000 Science, 288: 2051-2054; и Gao et al., 1996 J Biol Chem, 271: 21-24). Например, количество антител, достаточное для лечения или профилактики рака у субъекта, составляет такое количество, которое достаточно для

снижения ингибирующего фагоцитоз сигнала в макрофагах, возникающего при взаимодействии CD47/SIRP α в сигнальной оси CD47/SIRP α , т.е. антитело по изобретению усиливает опосредованный макрофагами фагоцитоз экспрессирующих CD47 клеток. В настоящем описании термин “снижается” относится к снижению сигнализации CD47 в присутствии антитела по изобретению. Опосредованное CD47 сигнализирование снижается, если уровень сигнализации CD47 в присутствии антитела к CD47 по изобретению будет по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% меньше, чем контрольный уровень сигнализации CD47 (т.е. уровень сигнализации CD47 в отсутствие антитела). Уровень сигнализации CD47 измеряется любым из целого ряда методов, таких, к примеру, но без ограничения, как измерение активации нижележащих генов и/или анализ репортера типа люциферазы, реагирующего на активацию CD47. Специалистам должно быть известно, что уровень сигнализации CD47 можно измерить различными способами, включая, к примеру, коммерчески доступные наборы.

В некоторых воплощениях антитело или его иммунологически активный фрагмент относится к изотипу IgG. В некоторых воплощениях константная область антитела относится к изотипу IgG1 человека и имеет аминокислотную последовательность:

```
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKTHTCP PCPAPE[LL]GG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN[ ] STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)
```

В некоторых воплощениях константная область IgG1 человека модифицирована по аминокислоте Asn297 (в рамке, нумерация по Kabat), чтобы предотвратить гликозилирование антитела, к примеру, Asn297Ala (N297A). В некоторых воплощениях константная область антитела модифицирована по аминокислоте Leu235 (нумерация по Kabat), чтобы изменить взаимодействие с Fc-рецептором, к примеру, Leu235Glu (L235E) или Leu235Ala (L235A). В некоторых воплощениях константная область антитела модифицирована по аминокислоте Leu234 (нумерация по Kabat), чтобы изменить взаимодействие с Fc-рецептором, например, Leu234Ala (L234A). В некоторых воплощениях константная область антитела модифицирована по обоим аминокислотам 234 и 235, к примеру, Leu234Ala и Leu235Ala (L234A/L235A) (индекс EU в Kabat et al.

(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest)).

В некоторых воплощениях константная область антитела относится к изотипу IgG2 человека и имеет аминокислотную последовательность:

```
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVR
KCCVECPPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC
KVS NKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG
FYPSDISVEW ESNQOPENNY KTTTPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 2)
```

В некоторых воплощениях константная область IgG2 человека модифицирована по аминокислоте Asn297 (в рамке, нумерация по Kabat), чтобы предотвратить гликозилирование антитела, например, Asn297Ala (N297A).

В некоторых воплощениях константная область антитела относится к изотипу IgG3 человека и имеет аминокислотную последовательность:

```
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRVEL
KTPLGDTTHT CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCPEPKSC
DTPPPCPRCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
NIFSCSVMHE ALHNRFQTKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 3)
```

В некоторых воплощениях константная область IgG3 человека модифицирована по аминокислоте Asn297 (в рамке, нумерация по Kabat), чтобы предотвратить гликозилирование антитела, например, Asn297Ala (N297A). В некоторых воплощениях константная область IgG3 человека модифицирована по аминокислоте 435, чтобы увеличить время полужизни, например, Arg435His (R435H) (индекс EU в Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest)).

В некоторых воплощениях константная область антитела относится к изотипу IgG4 человека и имеет аминокислотную последовательность:

```
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
```

KYGPPCP[**S**]CP APEFL[**L**]GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
 PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQF[**N**]STY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 4)

В некоторых воплощениях константная область IgG4 человека модифицирована в пределах шарнирного участка, чтобы предотвратить или уменьшить обмен нитями, например, Ser228Pro (S228P). В других воплощениях константная область IgG4 человека модифицирована по аминокислоте 235, чтобы изменить взаимодействие с Fc-рецептором, например, Leu235Glu (L235E). В некоторых воплощениях константная область IgG4 человека модифицирована и в пределах шарнирного участка, и по аминокислоте 235, например, Ser228Pro и Leu235Glu (S228P/L235E). В некоторых воплощениях константная область IgG4 человека модифицирована по аминокислоте Asn297 (нумерация по Kabat), чтобы предотвратить гликозилирование антитела, например, Asn297Ala (N297A) (индекс EU в Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest)).

В некоторых воплощениях константная область IgG человека модифицирована так, чтобы усилить связывание с FcRn. Примеры мутаций в Fc, усиливающих связывание с FcRn, представлены Met252Tyr, Ser254Thr, Thr256Glu (M252Y, S254T, T256E, соответственно) (нумерация по Kabat, Dall'Acqua et al. 2006 J. Biol Chem Vol 281(33) 23514-23524), или Met428Leu и Asn434Ser (M428L, N434S) (Zalevsky et al. 2010 Nature Biotech, Vol 28(2) 157-159). (индекс EU в Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest)). В некоторых воплощениях константная область IgG человека модифицирована так, чтобы изменить антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), например, модификации аминокислот, 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; см. обзор в Kaneko and Niwa, 2011 Biodrugs, 25(1):1-11.

В некоторых воплощениях константная область IgG человека модифицирована так, чтобы индуцировать гетеродимеризацию. Например, аминокислотная модификация в домене CH3 по Thr366, который при замене на более крупную аминокислоту, например, Tyr (T366W), сможет преимущественно образовывать пару со вторым доменом CH3,

содержащим аминокислотные модификации на менее крупные аминокислоты в положениях Thr366, Leu368 и Tyr407, например, Ser, Ala и Val, соответственно (T366S/L368A/Y407V). Гетеродимеризация посредством модификаций СН₃ может дополнительно стабилизироваться введением дисульфидной связи, к примеру, путем замены Ser354 на Cys (S354C) и Y349 на Cys (Y349C) на противоположных доменах СН₃ (см. обзор в Carter, 2001 *Journal of Immunological Methods*, 248: 7-15).

Изобретением также предусмотрены фармацевтические композиции, которые включают одно или несколько моноклональных антител, связывающихся с CD47, либо их иммунологически активные фрагменты, причем эти антитела не вызывают существенной гемагглютинации эритроцитов после введения.

Гемагглютинация является примером гомотипического взаимодействия, при котором две экспрессирующие CD47 клетки подвергаются агрегации или слипаются при обработке бивалентными связывающими CD47 частицами. Способность антител по настоящему изобретению связываться с CD47 на поверхности клеток и не вызывать слипания клеток не ограничивается эритроцитами. Антитела настоящего изобретения, как оказалось, уникально связывают CD47 таким образом, что не вызывают слипания CD47-положительных клеточных линий, например, клеток Daudi.

В некоторых случаях антитело содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5-30. Антитело необязательно содержит переменную область легкой цепи (V_L), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31-47. В некоторых случаях антитело содержит и область V_H , выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5-30, и область V_L , выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31-47. Антитела по изобретению также включают антитела, у которых переменная область тяжелой цепи по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична последовательности, приведенной по меньшей мере в одной из SEQ ID NO: 5-30, а переменная область легкой цепи по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична последовательности, приведенной по меньшей мере в одной из SEQ ID NO: 31-47. В других аспектах антитело содержит область V_H , представленную в любой из SEQ ID NO: 5, 7, 8, 11, 15-17, 20-22 и 27-30, в паре с областью V_L , представленной в любой из SEQ ID NO: 31-39, 42, 43, 44 и 47. В другом воплощении антитело содержит область V_H , представленную в любой из SEQ ID NO: 5, 7, 8, 11, 12, 15-17, 20-22 и 27-30, в паре с областью V_L , представленной в любой из SEQ ID NO: 31, 32, 35, 40, 41, 42, 43, 44 и 47. В еще одном аспекте антитело содержит комбинацию из области V_H и области V_L , выбранную из комбинаций, перечисленных в табл. 1.

В некоторых воплощениях антитело к CD47 или его иммунологически активный фрагмент содержит определяющий комплементарность участок 1 из V_H (CDR1), последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 66, V_H CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 или SEQ ID NO: 76, V_H CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 77, V_L CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 68, V_L CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71, и V_L CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 55. Например, антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит V_H CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 50, V_H CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 51, V_H CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 52, последовательность V_L CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 53, V_L CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 54, и V_L CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 55. В другом примере, антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит V_H CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 50, V_H CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 72, V_H CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 52, V_L CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 53, V_L CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 71, и V_L CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 55.

В одном воплощении антитела настоящего изобретения связываются с CD47 в ориентации голова-к-боку, где тяжелая цепь располагается возле мембраны клетки, экспрессирующей CD47, в то время как легкая цепь перекрывает сайт связывания SIRP α на CD47. В другом воплощении антитела настоящего изобретения связываются с CD47 в ориентации голова-к-боку, где легкая цепь располагается возле мембраны клетки, экспрессирующей CD47, в то время как тяжелая цепь перекрывает сайт связывания SIRP α на CD47.

Антитела к CD47 связываются с эпитопом, который включает в себя любые из аминокислотных остатков 1-116 в CD47 при нумерации их в соответствии с SEQ ID NO: 147 (то есть SEQ ID NO: 48 без сигнальной последовательности из аминокислот 1-18). Например, антитела настоящего изобретения связываются с эпитопом, который включает

в себя один или несколько аминокислотных остатков Q31, N32, T33, T34, E35, V36, Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44, R45, D46, I47, Y48, T49, F50, D51, G52, A53, L54, N55, K56, S57, T58, V59, P60, T61, D62, F63, S64, S65, A66, K67, I68, E69, V70, S71, Q72, L73, L74, K75, G76, D77, A78, S79, L80, K81, M82, D83, K84, S85, D86, A87, V88, S89, H90, T91, G92, N93, Y94, T95, C96, E97, V98, T99, E100, L101, T102, R103, E104, G105, E106, T107, I108, I109 и E110 в CD47 при нумерации их в соответствии с SEQ ID NO: 147.

В некоторых случаях антитела настоящего изобретения связываются с прерывистым эпитопом, включающим в себя один или несколько аминокислотных остатков Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44, R45, D46, I47, Y48, T49, F50 и D51 в CD47 при нумерации их в соответствии с SEQ ID NO: 147. К примеру, антитела настоящего изобретения связываются с прерывистым эпитопом, включающим аминокислотные остатки Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104 или E106 в CD47 при нумерации их в соответствии с SEQ ID NO: 147. К примеру, антитела настоящего изобретения связываются с прерывистым эпитопом, включающим по меньшей мере остатки петли (остатки 43-46) KGRD (SEQ ID NO: 56) в CD47 при нумерации их в соответствии с SEQ ID NO: 147. К примеру, антитела настоящего изобретения связываются с прерывистым эпитопом, включающим по меньшей мере остатки Y37, K39, K41 петли (остатки 43-46) KGRD (SEQ ID NO: 56), D51, H90, N93, E97, T99, E104, E106 в CD47 при нумерации их в соответствии с SEQ ID NO: 147. К примеру, антитела настоящего изобретения связываются с прерывистым эпитопом, включающим остатки Y37, K39, K41 петли (остатки 43-46) KGRD (SEQ ID NO: 56), D51, H90, N93, E97, T99, E104 и E106 в CD47 при нумерации их в соответствии с SEQ ID NO: 147.

Область V_H описанных здесь антител к CD47 главным образом участвует в связывании с петлей KGRD (SEQ ID NO: 56) CD47. Таким образом, уникальный эпитоп, с которым связываются антитела настоящего изобретения, находится на боку CD47. В отличие от существующих антител к CD47, известных в данной области, отличительным признаком описанных здесь антител к CD47 является ориентация домена V_H в проксимальном положении к мембране, предотвращающая слипание клеток, например, гемагглютинацию эритроцитов, удерживая антитела таким образом, что они не могут образовывать мостики с молекулами CD47 на соседних клетках. Кроме того, поскольку домен V_K у описанных здесь антител к CD47 взаимодействует с апикальными остатками типа Y37, T102 и E104, которые участвуют в связывании SIRP α , то именно домен V_K физически препятствует связыванию SIRP α с CD47.

Также предусмотрены выделенные антитела или их иммунологически активные фрагменты, которые конкурируют с описанными здесь антителами к CD47 за

предотвращение взаимодействия CD47 с SIRP α .

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

Изобретением также предусмотрены способы ослабления симптомов рака или других неопластических заболеваний путем введения нуждающимся в этом субъектам одного или нескольких моноклональных антител, связывающихся с CD47, либо их иммунологически активных фрагментов, причем антитела не вызывают существенной гемагглютинации эритроцитов после введения. Антитела вводятся в количестве, достаточном для ослабления симптомов рака или других неопластических заболеваний у субъекта. В некоторых воплощениях субъектом является человек. В некоторых воплощениях антитела являются химерными, гуманизированными или полностью человеческими. В некоторых воплощениях антитела связываются с CD47 человека. В некоторых воплощениях антитела либо их иммунологически активные фрагменты предотвращают взаимодействие CD47 с SIRP α . В некоторых воплощениях антитела либо их иммунологически активные фрагменты относятся к изотипу IgG, выбранному из группы, состоящей из изотипа IgG1, изотипа IgG2, изотипа IgG3 и изотипа IgG4. В некоторых воплощениях антитела либо их иммунологически активные фрагменты относятся к изотипу IgG, выбранному из IgG4P и IgGPE.

В некоторых воплощениях описанные здесь антитела к CD47 применяются в сочетании с одним или несколькими дополнительными средствами или комбинациями дополнительных средств. Подходящие дополнительные средства включают текущие фармацевтические и/или хирургические средства лечения для предполагаемого назначения, такого, к примеру, как рак. Например, антитела к CD47 могут применяться в сочетании с одним или несколькими дополнительными средствами химиотерапии или

противораковой терапии. В качестве альтернативы химиотерапии дополнительным средством служит лучевая терапия. В некоторых воплощениях средство химиотерапии представляет собой вещество, индуцирующее гибель клеток. В некоторых воплощениях средство химиотерапии вызывает потерю асимметрии фосфолипидов через плазматическую мембрану, к примеру, вызывает экспозицию фосфатидилсерина (PS) на клеточной поверхности. В некоторых воплощениях средство химиотерапии вызывает повреждение эндоплазматического ретикула (ER). В некоторых воплощениях средство химиотерапии является ингибитором протеасом. В некоторых воплощениях средство химиотерапии вызывает транслокацию белков ER на поверхность клетки. В некоторых воплощениях средство химиотерапии вызывает транслокацию и выход на поверхность клетки кальретикулина.

В некоторых воплощениях антитело к CD47 и дополнительное средство входят в состав единой терапевтической композиции, а антитело к CD47 и дополнительное средство вводятся одновременно. В качестве альтернативы антитело к CD47 и дополнительное средство отделены друг от друга, например, каждое входит в состав отдельной терапевтической композиции, а антитело к CD47 и дополнительное средство вводят одновременно или же антитело к CD47 и дополнительное средство вводят в разные моменты времени во время курса лечения. К примеру, антитело к CD47 вводят перед введением дополнительного средства, антитело к CD47 вводят после введения дополнительного средства или же антитело к CD47 и дополнительное средство вводят попеременно. Как описано здесь, антитело к CD47 и дополнительное средство вводят в виде однократной дозы или в виде нескольких доз.

Специалистам должно быть понятно, что антитела по изобретению имеют разнообразное применение. Например, антитела по изобретению применяются в качестве терапевтических средств, в качестве реагентов в диагностических наборах или в качестве средств диагностики либо в качестве реагентов при конкурентном анализе для создания терапевтических реагентов.

Краткое описание фигур

На фиг. 1A приведен график, показывающий связывание CD47 на клетках Daudi антителами в супернатантах гибридомы при определении методом проточной цитометрии. На фиг. 1B приведен график, показывающий способность некоторых из антител к CD47 в супернатанте гибридомы блокировать связывание рекомбинантного SIRP α человека с рекомбинантным CD47 человека при определении методом ELISA.

На фиг. 2 приведен ряд графиков, показывающих (а) связывание очищенных

антител мыши к CD47 с клетками Raji из культуры клеток лимфобластоидной линии, полученных из лимфомы Беркитта, и (b) с клетками CCRF-CEM из культуры клеток CD47-положительной лимфобластоидной линии Т-клеток человека при анализе методом проточной цитометрии. В этом эксперименте сравнивали связывание мышиных антител настоящего изобретения с коммерчески доступными антителами к CD47 – B6H12 и 2D3.

На фиг. 3 приведен ряд графиков, показывающих способность антител к CD47 блокировать связывание SIRPα (a) методом ELISA с рекомбинантным белком человека либо (b) методом проточной цитометрии с использованием клеток CCRF-CEM и рекомбинантного белка SIRPα человека.

На фиг. 4 приведен ряд фотографий, графиков и таблиц, показывающих гемагглютинацию эритроцитов (RBC) антителами к CD47. Гемагглютинация RBC проявляется помутнением в лунках, тогда как неагглютинированные RBC имеют вид пятнышек. Из фиг. 4A видно, что антитело 2A1 не вызывает гемагглютинации при всех исследованных концентрациях. Индекс гемагглютинации приведен на графике. Из фиг. 4B видно, что 2A1 является редким исключением из многих антител к CD47 по своей неспособности вызывать агглютинацию эритроцитов. Также видно отсутствие агглютинирующей активности у человеческой химерной версии 2A1 (2A1-xi). Из фиг. 4C видно, что моноклональное антитело 2D3 к CD47, которое не блокирует SIRPα, не вызывает гемагглютинации. На фиг. 4D представлен диапазон высоких концентраций антител к CD47 при анализе гемагглютинации и показан эффект про-зоны. Индекс гемагглютинации приведен на графике. На фиг. 4E представлен более узкий диапазон концентраций антитела 1B4 к CD47 при гемагглютинации, тогда как этот эффект отсутствует при связывании 2A1. Из фиг. 4F видно, что 2A1, химерный 2A1 (2A1-xi) и гуманизированные варианты 2A1 не вызывают гемагглютинации. В большинстве экспериментов в качестве положительного контроля на гемагглютинацию использовали антитело 9E4 и коммерческое антитело B6H12. Также в этих анализах использовали и другие коммерческие антитела, а именно блокирующие SIRPα антитела BRC126 и CC2C6 и не блокирующее SIRPα антитело 2D3.

На фиг. 5 приведен график, показывающий связывание 2A1 и B6H12 с В-клетками макаки (суно) и клетками Raji при определении методом проточной цитометрии. 2A1 связывается с CD47 человека и макаки с эквивалентным сродством, равно как и B6H12, хотя и с более низким сродством к CD47 человека и макаки по сравнению с 2A1.

На фиг. 6 приведен график, показывающий связывание 2A1, 2A1-xi и B6H12 с клетками Raji при определении методом проточной цитометрии. Важно отметить, что график подтверждает, что у химерной версии 2A1 были правильно установлены

последовательности вариабельной области тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей.

На фиг. 7А-7J приведен ряд графиков, показывающих связывание гуманизированных вариантов 2А1 с клетками Raji. В качестве внутреннего контроля у большинства графиков использовали 2А1-хi. Тестировали различные комбинации тяжелой и легкой цепей, как описано в примере 8.

На фиг. 8А приведен снимок записи при эксклюзионной хроматографии на установке АКТА FLPC с колонкой Superdex 200. Представлены варианты антитела АВ6.12 типа IgG1, IgG4Р и IgGРЕ. Все три варианта мономерны более чем на 97%. На фиг. 8В представлена фотография окрашенного Coomassie Blue геля при SDS-PAGE различных гуманизированных вариантов 2А1 в восстановительных (R) и невосстановительных (NR) условиях.

На фиг. 9 приведен ряд графиков, показывающих способность антител к CD47 усиливать фагоцитоз клеток раковых линий человека происходящими из моноцитов человека макрофагами (MDM). На фиг. 9А представлен индекс фагоцитоза, при этом использовались следующие антитела: коммерческое антитело В6Н12, мышинное антитело 2А1, гуманизированный вариант антитела АВ2.05 и неблокирующее коммерческое антитело 2D3. На фиг. 9В представлен индекс фагоцитоза, при этом использовались следующие антитела: коммерческое антитело В6Н12, гуманизированное антитело АВ2.05 (IgG1 человека) и варианты гуманизированного антитела АВ6.12 типа IgG1, IgG4Р и IgG4РЕ. В этих экспериментах в качестве линии клеток мишени CD47 использовались клетки CCRF-CEM.

На фиг. 10 приведен ряд графиков, показывающих противоопухолевые эффекты антител к CD47 на модели опухолей Raji. На фиг. 10А представлена эффективность мышинных антител 9Е4, 1В4, 2А1 и коммерческого антитела В6Н12. На фиг. 10В представлена эффективность изоформ IgG1, IgG4Р и IgG4РЕ гуманизированного антитела АВ6.12, а также мышинного антитела 2А1. На обеих моделях мыши получали дозы антител по 200 мкг три раза в неделю.

На фиг. 11 представлены графические изображения совместных кристаллических комплексов CD47-IgV с доменом IgV SIRP α (А; кодовый № 2JJS в Банке данных по белкам (PDB)), В6Н12 (В) и 2А1 (С). 2А1 и В6Н12 связываются в весьма различных ориентациях и с разными эпитопами на CD47, которые оба перекрываются с сайтом связывания SIRP α . Антитело 2А1 связывается в ориентации голова-бок на белке CD47.

Раскрытие сущности изобретения

Настоящим изобретением предусмотрены моноклональные антитела, которые

специфически связываются с CD47, включая CD47 человека. Эти антитела собирательно именуется здесь антителами к CD47.

CD47, многократно-пронизывающий трансмембранный рецептор, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов, взаимодействует с SIRP α (регулирующий сигналы белок α) на макрофагах и тем самым ослабляет фагоцитоз. Раковые клетки, у которых работает этот путь, избегают фагоцитоза. Как подробно описано ниже, это есть новый механизм иммунного избегания опухолями, поэтому терапевтическое воздействие на CD47 имеет широкое применение при различных раковых заболеваниях.

Экспрессия CD47 коррелирует с плохим клиническим исходом при многих раковых заболеваниях, включая неходжкинскую лимфому (NHL), острую лимфоцитарную лейкемию (ALL), острую миелогенную лейкемию (AML), рак яичников, глиому, глиобластому и др. Кроме того, CD47 установлен в качестве маркера раковых стволовых клеток при лейкемии и в твердых опухолях (Jaiswal et al., 2009 Cell, 138(2): 271-85; Chan et al., 2009 Proc Natl Acad Sci USA, 106(33): 14016-21; Chan et al., 2010 Curr Opin Urol, 20(5): 393-7; Majeti R et al., 2011 Oncogene, 30(9): 1009-19).

Блокирующие CD47 антитела проявляли противоопухолевую активность на различных моделях опухолей *in vivo*. Кроме того, эти антитела проявляли синергизм с другими терапевтическими антителами, включая Rituxan[®] и Herceptin[®], на моделях опухолей. Блокирование взаимодействия CD47 с SIRP α может способствовать фагоцитозу экспрессирующих CD47 клеток макрофагами (см. обзор в Chao et al., 2012 Curr Opin Immunol, 24(2): 225-32). Мыши, лишённые CD47, весьма устойчивы к лучевой терапии, что свидетельствует о роли воздействия на CD47 в комбинации с лучевой терапией (Isenberg et al., 2008 Am J Pathol, 173(4): 1100-1112; Maxhimer et al., 2009 Sci Transl Med, 1(3): 3ra7). Кроме того, на сингенных моделях опухолей у таких мышей проявляется снижение метастазирования в костях по сравнению с мышами дикого типа (Uluçkan et al., 2009 Cancer Res, 69(7): 3196-204).

Важно отметить, что большинство антител к CD47, как оказалось, вызывают гемагглютинацию эритроцитов человека. Гемагглютинация является примером гомотипического взаимодействия, при котором две экспрессирующие CD47 клетки подвергаются агрегации или слипаются при обработке бивалентными связывающими CD47 частицами. Например, сообщалось, что антитело MABL к CD47, в виде полного IgG или F(ab')₂, вызывает гемагглютинацию эритроцитов, и этот эффект уменьшался только тогда, когда MABL переделали в scFv или бивалентный scFv (например, см. Uno S, Kinoshita Y, Azuma Y et al. Antitumor activity of a monoclonal antibody against CD47 in xenograft models of human leukemia. Oncol Rep 2007, 17: 1189-94; Kikuchi Y, Uno S,

Yoshimura Y et al. A bivalent single-chain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 315: 912-8). Другие известные антитела к CD47, в том числе B6H12, BRC126 и CC2C6, также вызывают гемагглютинацию эритроцитов, как подробно описано ниже. Таким образом, агрегация клеток представляет главное ограничение при терапевтическом воздействии на CD47 с помощью существующих антител типа полного IgG.

Кроме того, важной характеристикой антител к CD47 является способность блокировать взаимодействие между CD47 и SIRP α , что способствует фагоцитозу экспрессирующих CD47 клеток макрофагами. Многие существующие антитела к CD47 блокируют SIRP α ; однако до описанного здесь изобретения, существующие антитела, блокирующие SIRP α , давали побочный эффект гемагглютинации, который, как описано выше, является нежелательным. Другие существующие антитела, как-то 2D3, не вызывают гемагглютинации; однако эти антитела также не блокируют SIRP α , что делает их неэффективными для усиления фагоцитоза. Таким образом, до описанного здесь изобретения существовала настоятельная необходимость выявления таких антител к CD47, которые блокируют SIRP α , но не вызывают слипания клеток.

Антитела к CD47 по настоящему изобретению не дают нежелательного эффекта гемагглютинации, тем самым повышая эффективность терапевтического таргетинга CD47, и сохраняют способность блокировать взаимодействие CD47 с SIRP α , тем самым способствуя фагоцитозу клеток, экспрессирующих CD47. В частности, антитела к CD47 типа полного IgG по настоящему изобретению (например, 2A1 и его гуманизированные производные, включая представленные в табл. 1) не вызывают агглютинации клеток в значительной степени. Так, антитела к CD47 по изобретению не вызывают существенной гемагглютинации RBCs. Здесь впервые описаны антитела к CD47 в формате полного IgG, которые блокируют SIRP α и не вызывают существенной гемагглютинации. В целом антитела по изобретению (например, антитело 2A1 и его гуманизированные производные) являются уникальными среди существующих антител к CD47 по своей способности блокировать SIRP α , не вызывая существенной гемагглютинации.

Антитела к CD47 по изобретению проявляют многие желательные характеристики, такие, без ограничения, как сильное блокирование взаимодействия между CD47 и его лигандом SIRP α без существенной гемагглютинации или иного модулирования гемагглютинации эритроцитов, а также сильная противоопухолевая активность. Например, антитела к CD47 по изобретению блокируют взаимодействие между CD47 и SIRP α по меньшей мере на 40%, на 45%, на 50%, на 55%, на 60%, на 65%, на 70%, на 75%, на 80%, на 85%, на 95%, или по меньшей мере на 99% по сравнению с уровнем

взаимодействия между CD47 и SIRP α в отсутствие описанных здесь антител к CD47. Антитела к CD47 по изобретению не вызывают существенной агглютинации клеток, например, антитела к CD47 по изобретению не вызывают существенной гемагглютинации эритроцитов. Например, степень агглютинации в присутствии антител к CD47 по изобретению уменьшается по меньшей мере на 5%, на 10%, на 20%, на 30%, на 40%, на 50%, на 60%, на 70%, на 80%, на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению со степенью агглютинации в присутствии существующих антител к CD47. В некоторых воплощениях антитела к CD47 по изобретению не вызывают существенной агглютинации, если степень агглютинации в присутствии антител к CD47 по изобретению уменьшается по меньшей мере на 5%, на 10%, на 20%, на 30%, на 40%, на 50%, на 60%, на 70%, на 80%, на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению со степенью агглютинации в присутствии антитела 1B4 к CD47, которое содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи и последовательность варибельной области легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 81, соответственно. Антитела настоящего изобретения также являются значительно более сильными на моделях опухолей по сравнению с антителами, известными в данной области. Например, способность макрофагов к фагоцитозу опухолевых клеток в присутствии антител к CD47 по изобретению повышается по меньшей мере на 5%, на 10%, на 20%, на 30%, на 40%, на 50%, на 60%, на 70%, на 80%, на 90% или по меньшей мере на 99% по сравнению со способностью макрофагов к фагоцитозу опухолевых клеток в присутствии существующих антител к CD47.

Специалистам должно быть известно, что степень агглютинации, например, степень гемагглютинации эритроцитов, можно количественно определить без излишнего экспериментирования. Например, специалистам должно быть известно, что степень гемагглютинации определяется путем измерения площади в точке RBC после выполнения анализа гемагглютинации в присутствии антител к CD47 по изобретению, как описано в приведенных ниже примерах. В некоторых случаях площадь в точке RBC в присутствии антител к CD47 по изобретению сравнивается с площадью в точке RBC в отсутствие антител к CD47, т.е. при нулевой гемагглютинации. Таким образом, гемагглютинация определяется количественно относительно исходного уровня (контроля). Большая площадь в точке RBC соответствует более высокой степени гемагглютинации. С другой стороны, для количественной оценки гемагглютинации также может применяться денситометрия пятен RBC.

Антитела к CD47 по изобретению связываются с CD47 человека и блокируют его взаимодействие с SIRP α (фиг. 1B, 3 и 7J). Эти антитела не вызывают существенной

гемагглютинации эритроцитов человека (фиг. 4). Эти антитела способны усиливать фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами (фиг. 9). Более того, антитела к CD47 проявляют сильную противоопухолевую активность на мышинной модели лимфомы человека (фиг. 10). Таким образом, антитела к CD47 по изобретению обходят основной ограничительный фактор для терапевтического таргетинга CD47. Соответственно, антитела к CD47 по изобретению должны иметь большое значение при лечении многих раковых заболеваний.

Антитела по изобретению, которые специфически связываются с CD47 человека, блокируют, ингибируют, нарушают или иным образом модулируют взаимодействие между CD47 человека и SIRP α человека, не вызывая существенной гемагглютинации или иного модулирования гемагглютинации эритроцитов.

Антитела настоящего изобретения связываются с эпитопом CD47 с константой равновесного связывания (K_d) ≤ 1 мкМ, например, ≤ 100 нМ, предпочтительно ≤ 10 нМ и более предпочтительно ≤ 1 нМ. Например, представленные здесь антитела к CD47 проявляют значения K_d в пределах между ≤ 1 нМ и 1 пМ.

Антитела к CD47 по изобретению служат для модулирования, блокирования, ингибирования, уменьшения, препятствования, нейтрализации или иного нарушения функциональной активности широко распространенного CD47. Функциональные активности CD47 включают, к примеру, сигнализирование посредством взаимодействия с SIRP α , модулирование, например, увеличение внутриклеточной концентрации кальция при адгезии клеток на внеклеточном матриксе, взаимодействие с С-концевым доменом клеточного связывания тромбоспондина, взаимодействие с фибриногеном и взаимодействие с различными интегринами. Например, антитела к CD47 полностью или частично ингибируют функциональную активность CD47 путем частичного или полного модулирования, блокирования, ингибирования, уменьшения, препятствования, нейтрализации или иного нарушения связывания CD47 с SIRP α .

Считается, что антитело к CD47 полностью модулирует, блокирует, ингибирует, уменьшает, препятствует, нейтрализует или иным образом нарушает функциональную активность CD47, если уровень функциональной активности CD47 в присутствии антитела к CD47 снижается по меньшей мере на 95%, например, на 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по сравнению с уровнем функциональной активности CD47 в отсутствие связывания с описанным здесь антителом к CD47. Считается, что антитело к CD47 существенно модулирует, блокирует, ингибирует, уменьшает, препятствует, нейтрализует или иным образом нарушает функциональную активность CD47, если уровень активности CD47 в присутствии антитела к CD47 снижается по меньшей мере на

50%, например, на 55%, 60%, 75%, 80%, 85 % или на 90% по сравнению с уровнем активности CD47 в отсутствие связывания с описанным здесь антителом к CD47. Считается, что антитело к CD47 частично модулирует, блокирует, ингибирует, уменьшает, препятствует, нейтрализует или иным образом нарушает функциональную активность CD47, если уровень активности CD47 в присутствии антитела к CD47 снижается меньше чем на 95%, например, на 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% или на 90% по сравнению с уровнем активности CD47 в отсутствие связывания с описанным здесь антителом к CD47.

Определения

Если не указано иначе, научные и технические термины при использовании их в связи с настоящим изобретением должны иметь те значения, которые обычно понимаются рядовыми специалистами в данной области. Кроме того, если по контексту не требуется иное, термины в единственном числе должны включать и множественное число, а термины во множественном числе должны включать и единственное число. Как правило, описанные здесь методы культуры клеток и тканей, молекулярной биологии, белковой, олиго- или полинуклеотидной химии и гибридизации, а также применяемая в связи с этим номенклатура являются хорошо известными и широко применяются в данной области. Применяются стандартные методы для получения рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, культуры тканей и трансформации (например, электропорация, липофекция). Ферментативные реакции и методы очистки выполняются в соответствии с инструкциями производителя либо как это общепринято в данной области или как описано здесь. Вышеприведенные методы и процедуры в общем выполняются по стандартным методикам, хорошо известным в данной области или описанным в разного рода общих и более специальных работах, которые приводятся и обсуждаются по всему тексту настоящего описания, например, см., Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Описанные здесь лабораторные процедуры и методы аналитической химии, химии органического синтеза, медицинской и фармацевтической химии, а также применяемая в связи с этим номенклатура являются хорошо известными и широко применяются в данной области. Для химического синтеза, химических анализов, получения фармацевтических препаратов, лекарственных форм и их введения, а также лечения больных применяются стандартные методы.

В применении к настоящему описанию предусматривается, если не указано иначе, что следующие термины должны иметь следующие значения.

В настоящем описании термины “CD47”, “ассоциированный с интегрином белок”

(IAP), “антиген ОАЗ рака яичников”, “связанный с Rh антиген” и “MER6” являются синонимами и могут применяться взаимозаменяемым образом.

Термины “красные клетки крови” (RBC) и “эритроциты” являются синонимами и применяются здесь взаимозаменяемым образом.

Термин “агглютинация” означает слипание клеток, тогда как термин “гемагглютинация” означает слипание определенного подмножества клеток, т.е. эритроцитов. Таким образом, гемагглютинация является разновидностью агглютинации.

В настоящем описании термин “антитело” относится к молекулам иммуноглобулина и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулина (Ig), т.е. молекулам, содержащим антиген-связывающий сайт, который специфически связывается (иммунореагирует) с антигеном. Под “специфически связывается” или “иммунореагирует с” или “направлено против” подразумевается то, что антитело реагирует с одним или несколькими антигенными детерминантами данного антигена и не реагирует с другими полипептидами или же связывается со значительно более низким сродством ($K_d > 10^{-6}$). Антитела включают, без ограничения, поликлональные, моноклональные, химерные, dAb (доменные антитела), одноцепочечные антитела, Fab-, Fab'- и F(ab')₂-фрагменты, F_v, scFv и экспрессирующие Fab библиотеки.

Основной структурной единицей антител, как известно, является тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, а каждая пара содержит одну “легкую” (примерно 25 кДа) и одну “тяжелую” (примерно 50-70 кДа) цепь. Аминоконцевая часть каждой цепи включает варибельную область примерно от 100 до 110 или больше аминокислот, которая главным образом отвечает за распознавание антигена. Карбокси-концевая часть каждой цепи составляет константную область, которая главным образом отвечает за эффекторную функцию. В общем, молекулы антител у человека относятся к какому-либо из классов IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, которые отличаются друг от друга природой тяжелой цепи, присутствующей в молекуле. Некоторые классы имеют также подклассы, как-то IgG1, IgG2 и др. Кроме того, у человека легкая цепь может быть представлена каппа-цепью или лямбда-цепью.

Термин “моноклональное антитело” (mAb) или “композиция моноклонального антитела” в настоящем описании относится к такой популяции молекул антител, которая содержит лишь один вид молекул антитела, состоящего из продукта уникального гена легкой цепи и продукта уникального гена тяжелой цепи. В частности, определяющие комплементарность участки (CDR) у моноклонального антитела идентичны во всех молекулах популяции. Антитела mAb содержат антиген-связывающий сайт, способный давать иммунную реакцию с определенным эпитопом антигена и характеризующийся

уникальным средством связывания для него.

В общем, молекулы антител у человека относятся к какому-либо из классов IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, которые отличаются друг от друга природой тяжелой цепи, присутствующей в молекуле. Некоторые классы имеют также подклассы, как-то IgG1, IgG2 и др. Кроме того, у человека легкая цепь может быть представлена каппа-цепью или лямбда-цепью.

Термин “антиген-связывающий сайт” или “связывающий участок” относится к той части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. Антиген-связывающий сайт образуется из аминокислотных остатков N-концевой варибельной (“V”) области тяжелой (“H”) и легкой (“L”) цепей. Три очень разных отрезка в пределах V-областей тяжелой и легкой цепей, именуемые “гиперварибельными участками”, располагаются между более консервативными фланкирующими участками, известными как “каркасные участки” или “FR”. Таким образом, термин “FR” относится к тем аминокислотным последовательностям, которые в природе находятся между и прилегают к гиперварибельным участкам в иммуноглобулинах. В молекуле антитела три гиперварибельных участка легкой цепи и три гиперварибельных участка тяжелой цепи располагаются относительно друг друга в трехмерном пространстве так, что образуется антиген-связывающая поверхность. Антиген-связывающая поверхность комплементарна трехмерной поверхности связавшегося антигена, а три гиперварибельных участка каждой из тяжелых и легких цепей называются “участками, определяющими комплементарность” или “CDR”. Отнесение аминокислот к каждому домену соответствует определениям по Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987, 1991)), или Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989).

В настоящем описании термин “эпитоп” охватывает любые белковые детерминанты, способные специфически связываться с иммуноглобулином или его фрагментом или T-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных группировок таких молекул, как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно имеют определенные трехмерные структурные характеристики, а также определенные характеристики зарядов. Считается, что антитело специфически связывается с антигеном, если константа диссоциации составляет ≤ 1 мкМ, например, ≤ 100 нМ, предпочтительно ≤ 10 нМ и более предпочтительно ≤ 1 нМ.

В настоящем описании термины “иммунологическое связывание” и “свойства иммунологического связывания” относятся к таким нековалентным взаимодействиям, которые возникает между молекулами иммуноглобулина и того антигена, к которому этот

иммуноглобулин специфичен. Сила или сродство взаимодействия при иммунологическом связывании могут выражаться в терминах константы диссоциации (K_d) взаимодействия, причем меньшее значение K_d означает большее сродство. Свойства иммунологического связывания отдельных полипептидов можно количественно определить хорошо известными методами. Один из таких методов включает измерение скорости образования и диссоциации комплекса антиген-связывающий сайт/антиген, причем эти скорости зависят от концентраций партнеров по комплексу, сродства взаимодействия и геометрических параметров, которые в равной степени влияют на скорость в обоих направлениях. Таким образом, “константу скорости k_{on} ” и “константу скорости k_{off} ” можно определить путем подсчета концентраций и фактических скоростей ассоциации и диссоциации (см. Nature 361:186-87 (1993)). Соотношение k_{off}/k_{on} позволяет сократить все параметры, не связанные со сродством, и равно константе диссоциации K_d (вообще см. Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Считается, что антитело настоящего изобретения специфически связывается с CD47, если константа равновесного связывания (K_d) составляет ≤ 1 мкМ, предпочтительно ≤ 100 нМ, более предпочтительно ≤ 10 нМ и наиболее предпочтительно от 100 пМ до 1 пМ при измерении такими методами, как связывание радиолигандов, поверхностный плазмонный резонанс (SPR), анализ связывания методом проточной цитометрии или другими методами, известными специалистам в данной области.

Термин “выделенный полинуклеотид” в настоящем описании должен означать полинуклеотид геномного, кДНК или синтетического происхождения либо каких-то комбинаций из них, причем в силу своего происхождения “выделенный полинуклеотид” (1) не связан со всем или с частью того полинуклеотида, в котором “выделенный полинуклеотид” встречается в природе, (2) функционально связан с таким полинуклеотидом, с которым он не связан в природе, или (3) не встречается в природе в составе более крупной последовательности.

Термин “выделенный белок” в настоящем описании означает белок, происходящий из кДНК, рекомбинантной РНК или синтетического происхождения либо каких-то комбинаций из них, причем в силу своего происхождения или источника получения “выделенный белок” (1) не связан с белками, встречающимися в природе, (2) свободен от других белков из того же источника, например, свободен от морских белков, (3) экспрессируется в клетках другого вида, или (4) не встречается в природе.

Термин “полипептид” в настоящем описании применяется как общий термин для обозначения нативных белков, фрагментов или аналогов последовательностей полипептидов. Таким образом, фрагменты и аналоги нативных белков представляют

собой разновидности полипептидов вообще.

Термин “природный” в настоящем описании применительно к объектам означает то, что объект встречается в природе. Например, последовательность полипептида или полинуклеотида, которая находится в организме (включая вирусы) и может быть выделена из природного источника, а также не была преднамеренно модифицирована человеком в лаборатории или каким-то иным образом, является природной.

Термин “функционально связанный” в настоящем описании относится к расположению описанных при этом компонентов в таком взаимоотношении, которое позволяет им функционировать в соответствии с их предназначением. Регуляторная последовательность, “функционально связанная” с кодирующей последовательностью, встраивается таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности происходит в условиях, совместимых с регуляторными последовательностями.

Термин “регуляторная последовательность” в настоящем описании относится к последовательностям полинуклеотидов, которые необходимы для осуществления экспрессии и процессинга тех кодирующих последовательностей, с которыми они связаны. Природа таких регуляторных последовательностей различается в зависимости от организма хозяина: у прокариот такие регуляторные последовательности обычно включают промотор, сайт связывания с рибосомой и последовательность терминации транскрипции, а у эукариот обычно такие регуляторные последовательности включают промоторы и последовательности терминации транскрипции. Термин “регуляторные последовательности” охватывает, как минимум, все компоненты, присутствие которых необходимо для экспрессии и процессинга, а также может включать и дополнительные компоненты, присутствие которых будет полезным, к примеру, лидерные последовательности и последовательности партнеров по слиянию. Термин “полинуклеотид” в настоящем описании относится к полимерной форме нуклеотидов длиной по меньшей мере в 10 оснований, как-то рибонуклеотидов или дезоксирибонуклеотидов либо модифицированных форм нуклеотидов любого типа. Этот термин охватывает одно- и двухцепочечные формы ДНК.

Термин “олигонуклеотид” в настоящем описании включает как природные, так и модифицированные нуклеотиды, связанные между собой природными и не-природными олигонуклеотидными связями. Олигонуклеотиды составляют подмножество полинуклеотидов, как правило, длиной в 200 оснований или меньше. Предпочтительно олигонуклеотиды имеют длину от 10 до 60 оснований, наиболее предпочтительно 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или от 20 до 40 оснований. Олигонуклеотиды обычно одноцепочечны, например, для зондов, хотя олигонуклеотиды могут быть и

двухцепочечными, например, для конструирования мутантных генов. Олигонуклеотиды по изобретению бывают смысловыми или антисмысловыми олигонуклеотидами.

Термин “природные нуклеотиды” в настоящем описании включает дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Термин “модифицированные нуклеотиды” в настоящем описании включает нуклеотиды с модифицированными или замещенными группами сахаров и пр. Термин “олигонуклеотидные связи” в настоящем описании включает такие олигонуклеотидные связи, как фосфоротиоатные, фосфородитиоатные, фосфороселеноатные, фосфородиселеноатные, фосфоанилотиоатные, фосфораниладатные, фосфоимидатные и др. Например, см. LaPlanche et al., Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al., J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein et al., Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon et al., Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al., U.S. Patent No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews 90:543 (1990). Олигонуклеотиды могут включать в себя и метки для детектирования, если нужно.

Термин “избирательно гибридизируется” в настоящем описании означает детектируемое и специфическое связывание. Полинуклеотиды, олигонуклеотиды и их фрагменты по изобретению избирательно гибридизируются с цепочками нуклеиновой кислоты в таких условиях гибридизации и отмывки, при которых сводится к минимуму заметное и детектируемое связывание с неспецифическими нуклеиновыми кислотами. Для создания избирательных условий гибридизации можно использовать условия высокой жесткости, которые известны в данной области и изложены здесь. В общем, гомология последовательности нуклеиновой кислоты между полинуклеотидами, олигонуклеотидами и фрагментами по изобретению и искомой последовательностью нуклеиновой кислоты должна составлять по меньшей мере 80%, более предпочтительно с увеличением гомологии по крайней мере до 85%, 90%, 95%, 99% и 100%. Две аминокислотные последовательности являются гомологичными, если имеется частичное или полное совпадение между их последовательностями. Например, гомология в 85% означает, что 85% аминокислот будут идентичными при совмещении этих двух последовательностей по максимальному совпадению. При максимизации совпадения допускаются пробелы (в любой из двух совмещаемых последовательностей) длиной в 5 или меньше, а более предпочтительно 2 или меньше. Альтернативно и предпочтительно, две белковые последовательности (или последовательности полученных из них полипептидов длиной по меньшей мере в 30 аминокислот) считаются гомологичными, в применении к настоящему описанию, если у них показатель совмещения составляет более 5 (в единицах

стандартного отклонения) при использовании программы ALIGN с мутационной матрицей замен и пеней за пробел 6 или больше, см. Dayhoff M.O., in Atlas of Protein Sequence and Structure, pp. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)), а также Supplement 2 к этому тому, pp. 1-10. Более предпочтительно две последовательности или их части считаются гомологичными, если у них аминокислоты идентичны на 50% или больше при оптимальном совмещении с помощью программы ALIGN. Термин “соответствует” в настоящем описании означает то, что последовательность полинуклеотида гомологична (то есть идентична, а не строго эволюционно родственна) всей или части последовательности базового полинуклеотида, или же что последовательность полипептида идентична последовательности базового полипептида. В противоположность этому термин “комплементарная” в настоящем описании означает то, что комплементарная последовательность гомологична всей или части последовательности базового полинуклеотида. В качестве иллюстрации: нуклеотидная последовательность “TATAC” соответствует базовой последовательности “TATAC” и комплементарна базовой последовательности “GTATA”.

Для описания взаимоотношения между двумя или несколькими полинуклеотидными или аминокислотными последовательностями применяются следующие термины: “эталонная последовательность”, “окно сравнения”, “идентичность последовательностей”, “степень идентичности последовательностей” и “существенная идентичность”. “Эталонная последовательность” – это заданная последовательность, которая используется в качестве основы для сравнения последовательностей, причем эталонная последовательность может представлять собой часть более длинной последовательности, например, в виде сегмента полноразмерной кДНК или последовательности гена, приведенной в перечне последовательностей, или же может составлять полную кДНК или последовательность гена. Как правило, эталонная последовательность имеет длину по меньшей мере 18 нуклеотидов или 6 аминокислот, скорее по меньшей мере 24 нуклеотида или 8 аминокислот, но чаще по меньшей мере 48 нуклеотидов или 16 аминокислот. Поскольку два полинуклеотида или две аминокислотные последовательности могут каждая (1) содержать последовательность (то есть часть полной полинуклеотидной или аминокислотной последовательности), которая аналогична между двумя молекулами, а (2) также могут содержать последовательность, которая расходится между двумя полинуклеотидами или аминокислотными последовательностями, то сравнение последовательностей между двумя (или несколькими) молекулами обычно проводится путем сравнения последовательностей двух

молекул по “окну сравнения”, чтобы выявить и сопоставить локальные участки сходства последовательностей. “Окно сравнения” в настоящем описании означает некий концептуальный сегмент из по меньшей мере 18 смежных положений нуклеотидов или 6 аминокислот, причем полинуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность сравнивается с базовой последовательностью из по меньшей мере 18 смежных нуклеотидов или 6 аминокислот, при этом часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать вставки, делеции, замены и т.п. (то есть пробелы) на 20% процентов или меньше по сравнению с эталонной последовательностью (не содержащей вставок или делеций) для оптимального совмещения двух последовательностей. Оптимальное совмещение последовательностей при совмещении по окнам сравнения может проводиться по алгоритму локальной гомологии Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), по алгоритму совмещения гомологичности Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), методом поиска подобия Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), с помощью компьютерных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программ Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), в пакете программ Geneworks или MacVector, либо путем визуального осмотра, и выбирается наилучшее совмещение (т.е. дающее самую высокую степень гомологичности в окне сравнения) из полученных различными методами.

Термин “идентичность последовательностей” означает, что две полинуклеотидные или аминокислотные последовательности идентичны (т.е. по каждому из нуклеотидов или по каждому из остатков) по окну сравнения. Термин “степень идентичности последовательностей” рассчитывается путем сопоставления двух оптимально совмещенных последовательностей по окну сравнения, определения числа положений, по которым в обеих последовательностях встречаются идентичные основания нуклеиновой кислоты (к примеру, А, Т, С, G, U или I) или остатки, получения числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения (т.е. на размер окна) и умножения результата на 100, получая степень идентичности последовательностей в процентах. Термин “существенная идентичность” в настоящем описании обозначает такую характеристику полинуклеотидной или аминокислотной последовательности, при которой полинуклеотидная или аминокислотная последовательность включает последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична, предпочтительно по меньшей мере на 90-95% процентов идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 99% процентов идентична по последовательности при сравнении с базовой последовательностью по окну сравнения из

по меньшей мере 18 положений нуклеотидов (6 аминокислот), скорее по окну сравнения из по меньшей мере 24-48 положений нуклеотидов (8-16 аминокислот), при этом степень идентичности последовательностей рассчитывается путем сравнения с базовой последовательностью, а сама последовательность может содержать делеции или вставки, составляющие в общей сложности 20% или меньше от базовой последовательности по окну сравнения. Базовая последовательность может быть частью более длинной последовательности.

В настоящем описании для двадцати обычных аминокислот применяются стандартные сокращения. См. *Immunology - A Synthesis* (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Подходящими компонентами для полипептидов настоящего изобретения также могут быть стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати обычных аминокислот, неприродные аминокислоты, как-то α -, α -дизамещенные аминокислоты, N-алкильные аминокислоты, молочная кислота и другие нестандартные аминокислоты. Примеры нестандартных аминокислот включают: 4-гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, σ -N-метиларгинин и другие подобные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). При обозначении полипептидов в настоящем описании слева располагается N-концевая сторона, а справа – C-концевая сторона, в соответствии со стандартной практикой и традицией.

Точно так же, если не указано иначе, левый конец одноцепочечных полинуклеотидных последовательностей считается 5'-концевым, а левая сторона двухцепочечных полинуклеотидных последовательностей именуется 5'-стороной. Нарращивание образующихся РНК-транскриптов происходит в направлении от 5'- к 3'-концу, причем участки последовательности в направлении транскрипции на нити ДНК, имеющей такую же последовательность, что и РНК, которые располагаются с 5'-стороны от 5'-конца РНК-транскрипта, именуются "вышерасположенными последовательностями", а участки последовательности на цепи ДНК, имеющей такую же последовательность, что и РНК, которые располагаются с 3'-стороны от 3'-конца РНК-транскрипта, именуются "нижнерасположенными последовательностями".

Применительно к полипептидам термин "существенная идентичность" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном совмещении, как-то с помощью программы GAP или BESTFIT при значениях весов пробелов по умолчанию, имеют идентичные по меньшей мере на 80% последовательности, предпочтительно идентичные по меньшей мере на 90% процентов, более предпочтительно по меньшей мере на 95% и

наиболее предпочтительно идентичные по меньшей мере на 99% последовательности.

Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными заменами аминокислот.

Консервативные замены аминокислот означают взаимозаменяемость остатков, имеющих сходные боковые цепи. Например, группа аминокислот с алифатическими боковыми цепями: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; группа аминокислот с алифатическими и гидроксильными боковыми цепями: серин и треонин; группа аминокислот с амидосодержащими боковыми цепями: аспарагин и глутамин; группа аминокислот с ароматическими боковыми цепями: фенилаланин, тирозин и триптофан; группа аминокислот с основными боковыми цепями: лизин, аргинин и гистидин; и группа аминокислот с серосодержащими боковыми цепями: цистеин и метионин. Предпочтительные группы аминокислот для консервативных замен: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутаминовая-аспарагиновая кислота и аспарагин-глутамин.

Как уже сказано, предусматривается, что небольшие вариации аминокислотных последовательностей антител или молекул иммуноглобулинов охватываются настоящим изобретением при условии, что аминокислотная последовательность при этом сохраняется по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, 90%, 95% и наиболее предпочтительно на 99%. В частности, предусмотрены консервативные замены аминокислот. Консервативными являются такие замены, которые имеют место в пределах одного семейства аминокислот, родственных по своим боковым цепям. Генетически кодируемые аминокислоты обычно делятся на семейства: (1) кислые аминокислоты – аспартат, глутамат; (2) основные аминокислоты – лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные аминокислоты – аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан, и (4) незаряженные полярные аминокислоты – глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Гидрофильные аминокислоты включают аргинин, аспарагин, глутамин, аспартат, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобные аминокислоты включают аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают: (i) серин и треонин, которые составляют алифатическо-гидроксильное семейство; (ii) аспарагин и глутамин, которые составляют амидосодержащее семейство; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, которые составляют алифатическое семейство; и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, которые составляют ароматическое семейство. Например, разумно ожидать, что отдельная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин или аналогичная замена одной аминокислоты на

структурно родственную аминокислоту не окажет большого эффекта на связывание или свойства полученной молекулы, особенно если замена не затрагивает аминокислоты в каркасном участке. Приведет ли аминокислотная замена к функциональному пептиду – это можно легко установить путем анализа специфической активности производного полипептида. Методы анализа подробно описаны далее. Фрагменты или аналоги антител или молекул иммуноглобулина могут быть легко получены рядовыми специалистами. Предпочтительные N- и C-концы фрагментов или аналогов встречаются возле границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены можно идентифицировать путем сравнения данных о нуклеотидных и/или аминокислотных последовательностях с общественными или фирменными базами данных по последовательностям. Предпочтительно для идентификации мотивов в последовательностях или прогнозируемых конформационных доменов белков, встречающихся в других белках с известной структурой и/или функцией, применяются компьютерные методы сравнения. Известны методы идентификации белковых последовательностей, образующих известные трехмерные структуры: Bowie et al., *Science* 253:164 (1991). Таким образом, приведенные выше примеры показывают, что специалисты в данной области могут распознавать мотивы в последовательностях и структурные конформации, которые могут использоваться для определения структурных и функциональных доменов в соответствии с изобретением.

Предпочтительными заменами аминокислот являются такие замены, которые: (1) уменьшают подверженность протеолизу, (2) уменьшают чувствительность к окислению, (3) изменяют средство связывания для образования белковых комплексов, (4) изменяют средство связывания и (4) придают или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких аналогов. Аналоги могут включать в себя различные мутантные последовательности, отличные от природной последовательности пептида. Например, в природной последовательности (предпочтительно в той части полипептида, которая находится вне доменов, образующих межмолекулярные контакты) может быть одна или несколько аминокислотных замен (предпочтительно консервативных замен аминокислот). Консервативная замена аминокислот не должна существенно изменять структурные характеристики исходной последовательности (например, замена аминокислот не должна разрушать спираль, имеющуюся в исходной последовательности, или нарушать другие вторичные структуры, присущие исходной последовательности). Примеры признанных вторичных и третичных структур полипептидов описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1984); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing,

New York, N.Y. (1991); и Thornton et al., Nature 354:105 (1991).

Термин “фрагмент полипептида” в настоящем описании относится к таким полипептидам, которые имеют N-концевые и/или C-концевые делеции, но при этом остальная аминокислотная последовательность идентична соответствующим положениям в природной последовательности, к примеру, выведенным из полной последовательности кДНК. Как правило, фрагменты имеют длину по меньшей мере в 5, 6, 8 или 10 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 14 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 20 аминокислот, обычно по меньшей мере 50 аминокислот, еще более предпочтительно по меньшей мере 70 аминокислот. Термин “аналог” в настоящем описании относится к таким полипептидам, которые состоят из сегмента длиной по меньшей мере в 25 аминокислот, который существенно идентичен части выведенной аминокислотной последовательности и специфически связывается с CD47 при подходящих условиях для связывания. Как правило, аналоги полипептидов содержат консервативные замены (либо вставки или делеции) аминокислот относительно природной последовательности. Аналоги обычно имеют длину по меньшей мере в 20 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 50 аминокислот или больше, и зачастую могут иметь такую же длину, как у полноразмерного природного полипептида.

Аналоги пептидов широко применяются в фармацевтической промышленности в качестве непептидных лекарств, обладающих свойствами, аналогичными свойствам исходного пептида. Такие непептидные соединения называют “миметиками пептидов” или “пептидомиметиками”: Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986), Veber and Freidinger TINS p.392 (1985); Evans et al., J. Med. Chem. 30:1229 (1987). Такие соединения часто разрабатываются при помощи компьютерного молекулярного моделирования. Пептидомиметики, аналогичные по структуре терапевтически полезным пептидам, могут применяться для получения эквивалентного терапевтического или профилактического эффекта. Как правило, пептидомиметики имеют структурное сходство с исходным полипептидом (т.е. полипептидом, обладающим биохимическими свойствами или фармакологической активностью), как-то антителами человека, но у них одна или несколько пептидных связей необязательно заменены связями, выбранными из группы, состоящей из: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (*цис*- и *транс*-), $-\text{COCH}_2-$, $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_2\text{SO}-$, с помощью хорошо известных методов. Для получения более стабильных пептидов может применяться систематическая замена одной или нескольких аминокислот в консенсусной последовательности на D-аминокислоты такого же типа (к примеру, D-лизин вместо L-лизина). Кроме того, могут быть получены пептиды с ограничениями, содержащие консенсусную последовательность или практически

идентичный вариант консенсусной последовательности, хорошо известными методами (Rizo and Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992)), например, путем добавления внутренних остатков цистеина, способных образовывать внутримолекулярные дисульфидные мостики, вызывающие циклизацию пептида.

Термин “средство” применяется здесь для обозначения химических соединений, смеси химических соединений, биологических макромолекул или экстрактов, полученных из биологических материалов.

В настоящем описании термины “метка” или “меченый” относятся к включению детектируемого маркера, например, путем включения аминокислоты с радиоактивной меткой или присоединения к полипептиду биотиниловых группировок, которые можно детектировать с помощью меченного авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которые можно детектировать с помощью оптических или калориметрических методов). В некоторых ситуациях метка или маркер также может быть терапевтическим. Известны различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов, которые можно использовать. Примеры меток для полипептидов включают, без ограничения, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантаноидные люминофоры), ферментные метки (например, пероксидаза хрена, *n*-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные, биотиниловые группы, заданные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности типа “лейциновых молний”, сайты связывания для вторичных антител, домены связывания металлов, эпитопные метки-теги). В некоторых воплощениях метки прикрепляются через спейсерные плечи различной длины для уменьшения потенциальных стерических помех.

Термин “фармацевтическое средство или препарат” в настоящем описании означает химическое соединение или композицию, способные вызвать требуемый терапевтический эффект при правильном введении пациенту.

Термин “противоопухолевое средство” в настоящем описании означает средство, которое обладает функциональным свойством подавлять развитие или прогрессирование новообразований у человека, в частности злокачественных (раковых) поражений типа карциномы, саркомы, лимфомы или лейкемии. Зачастую противоопухолевые средства обладают свойством ингибировать метастазы.

Другие химические термины применяются в соответствии с общепринятой практикой в данной области, к примеру, см. *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

В настоящем описании “существенно очищенный” означает, что рассматриваемый компонент преобладает среди присутствующих (т.е. на молярной основе он встречается чаще, чем любые другие индивидуальные компоненты композиции), а предпочтительно существенно очищенная фракция представляет собой такую композицию, в которой рассматриваемый компонент составляет по меньшей мере 50% (на молярной основе) от всех присутствующих видов макромолекул.

Как правило, существенно очищенная композиция должна составлять более 80% от всех видов макромолекул, присутствующих в композиции, более предпочтительно больше чем 85%, 90%, 95% или 99%. Наиболее предпочтительно рассматриваемый компонент очищен практически до гомогенного состояния (в композиции не обнаруживаются примеси стандартными методами обнаружения), при этом композиция состоит практически из одного вида макромолекул.

Антитела к CD47

Моноклональные антитела по изобретению обладают способностью связываться с CD47, ингибировать связывание SIRP α с CD47, снижать опосредованное CD47-SIRP α сигнализирование, усиливать фагоцитоз и ингибировать рост и/или миграцию опухолей. Ингибирование определяется, к примеру, методами клеточного анализа, описанными здесь в Примерах.

Типичными антителами по изобретению являются антитело 2A1, химерный вариант 2A1 и гуманизированные варианты 2A1. Примеры антител по изобретению включают антитела, у которых переменная область тяжелой цепи (V_H) выбрана из SEQ ID NO: 5-30, а переменная область легкой цепи (V_L) выбрана из SEQ ID NO: 31-47. В частности, примеры антител включают антитела, представленные в табл. 1.

Таблица 1

Антитело	Переменная область тяжелой цепи (V_H)	Переменная область легкой цепи (V_L)
2A1	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 31
2A1-xi	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 32
AB2.03	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 33
AB2.04	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 34
AB2.05	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 35
AB2.06	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 36
AB2.07	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 37
AB2.08	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 38
AB2.09	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 39
AB2.13	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 43
AB3.09	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 39
AB6.12	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 42

AB6.13	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 43
AB6.14	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 44
AB6.17	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 47
AB10.13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 43
AB10.14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 44
AB11.05	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 35
AB12.05	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 35
AB15.05	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 35
AB16.05	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 35
AB17.05	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 35
AB22.05	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 35
AB23.05	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 35
AB24.05	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 35
AB25.05	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 35

Кроме того, в изобретение также включены антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и описанные здесь антитела к CD47. Например, антитела по изобретению специфически связываются с эпитопом, который включает один или несколько аминокислотных остатков из CD47 человека (например, см. Genbank Accession No. Q08722.1).

Аминокислотная последовательность типичного человеческого антитела к CD47 представлена ниже (Genbank Accession No. Q08722.1 (GI: 1171879), включено сюда путем ссылки)). Сигнальная последовательность (аминокислоты 1-18) подчеркнута.

```

1 mwplvaalll gsaccgsaql lfnktksvef tfcndtvvip cfvtnmeaqn ttevyvkwkf
61 kgrdiytf dg alnkstvptd fssakiev sq llkgdasl km dksdavsh tg nytcevtelt
121 regetiiek yrsvwfs p n enilivif pi faillfwgqf giktlkyrsg gmdektiall
181 vaglvitviv ivgailfvpg eyslknatgl glivtstgil illhyyvfst aigltsfvia
241 ilviqviayi lavvglslci aacipmhgpl lisgl silal aqllglvymk fvasnqkti q
301 pprkaveepl nafkeskgmm nde (SEQ ID NO: 48)

```

Для ясности ниже представлена аминокислотная последовательность типичного человеческого антитела к CD47 без сигнальной последовательности.

```

1 qllfnktksv eftfcndtvv ipcfvtnmea qnttevyvkw kfkgrdiytf dgalnkstv p
61 tdfssakiev sqllkgdasl kmdksdavsh tgnytcevt e lt regetiie lkyrvvswfs
121 pnenilivif pifaillfwg qfgiktlkyr sggmdektia llvaglvitv ivivgailfv
181 pgeyslknat glglivtstg ilillhyyvf staigltsfv ia ilviqvia yilavvglsl
241 ciaacipmhg pllisgl sil ala qllglvy mkfvasnqkt iqpprkavee plnafkeskg
301 mmnde (SEQ ID NO: 147)

```

Аминокислотная последовательность типичного домена CD47-IgV человека представлена ниже:

```

19 qllfnktksv eftfcndtvv ipcfvtnmea qnttevyvkw kfkgrdiytf dgalnkstv p

```


79 tdfssakiev sqllkgdasl kmdksdavsh tgnytcevte ltregetiie lkyrvv
(SEQ ID NO: 49)

Примеры моноклональных антител по изобретению включают, к примеру, гуманизированные антитела, у которых переменная область тяжелой цепи (V_H) и/или переменная область легкой цепи (V_L) представлены в приведенных ниже последовательностях.

Ниже представлены переменные области тяжелой цепи (V_H) антител к CD47. При этом выделены определяющие комплементарность участки (CDR) области V_H антител к CD47. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность V_H CDR1 представлена GFNIKDYLLH (SEQ ID NO: 50), GYTFTYLLH (SEQ ID NO: 57), GFTFTYLLH (SEQ ID NO: 58), GYNFTYLLH (SEQ ID NO: 59), GYTITYLLH (SEQ ID NO: 60), GYTFKYLLH (SEQ ID NO: 61), GYTFTDYLLH (SEQ ID NO: 62), GFTFTDYLLH (SEQ ID NO: 63), GFTITDYLLH (SEQ ID NO: 64), GYTFKDYLLH (SEQ ID NO: 65) или GFTFKDYLLH (SEQ ID NO: 66). В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность V_H CDR2 представлена WIDPDNGDTE (SEQ ID NO: 51), WIDPDQGDTE (SEQ ID NO: 72), WIDPDYGDTE (SEQ ID NO: 73), WIDPDSGDTE (SEQ ID NO: 74), WIDPDNADTE (SEQ ID NO: 75) или WIDPDNTDTE (SEQ ID NO: 76). В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность V_H CDR3 представлена NAAYGSSSPMDY (SEQ ID NO: 52) или NAAYGSSPYMDY (SEQ ID NO: 77).

EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPDNGDTEFAPKFGKATMTADTSSN
TAYLQLSSLTSEDYAVYYCNAAYGSSSPMDYWGQGTSTVTV (SEQ ID NO: 5)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIDYLLHWVQAPGKGLEWVGWIDPDNGDTEYAEKFGQGRVTITADTSTD
TAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSPMDYWGQGTSTVTV (SEQ ID NO: 6)

QMQLVQSGAEVKKKGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWVGWIDPDNGDTEYAKQFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSPMDYWGQGTSTVTV (SEQ ID NO: 7)

EVQLVQSGAEVKKKGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWVGWIDPDNGDTEYAKQFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSPMDYWGQGTSTVTV (SEQ ID NO: 8)

QMQLVQSGAEVKKKGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWVGWIDPDNGDTEYAKQFQGRVTITADTSSN
TAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSPMDYWGQGTSTVTV (SEQ ID NO: 9)

QMQLVQSGAEVKKKGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWVGWIDPDNGDTEYAKQFQGRVTITADTSTD
TAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSPMDYWGQGTSTVTV (SEQ ID NO: 10)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDQGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDTAMYICNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 11)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDYGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDTAMYICNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 12)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDSGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDTAMYICNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 13)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNADTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDTAMYICNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 14)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNTDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDTAMYICNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 15)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVCKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDTAMYICNAAYGSSPYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 16)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVCKASGYTFTYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDTAMYICNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 17)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVCKASGFTFTYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDTAMYICNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 18)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVCKASGYNTYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDTAMYICNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 19)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVCKASGYTITYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDTAMYICNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 20)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVCKASGYTFKYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDTAMYICNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 21)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVCKASGYTFTDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDTAMYICNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 22)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVCKASGFTFTDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDTAMYICNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 23)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVCKASGFTITDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDTAMYICNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 24)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVCKASGYTFKYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS

TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 25)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCASGFTFKDYLLHWVRQAPGQALEWGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 26)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYLQLSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 27)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLTSEDAMYYCNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 28)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDYYLHWVRQAPGQALEWGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 29)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDYYLHWVQQAPGKGLEWGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDRSMS
TAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMQDYWGQTTVTV (SEQ ID NO: 30)

Ниже представлены переменные области легкой цепи (V_L) антител к CD47. При этом выделены участки CDR области V_L антител к CD47. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность V_L CDR1 представлена KASQDIHRYLS (SEQ ID NO: 53), RASQDIHRYLA (SEQ ID NO: 67) или RARQGIHRYLS (SEQ ID NO: 68). В некоторых воплощениях, аминокислотная последовательность V_L CDR2 представлена RANRLVD (SEQ ID NO: 54), RANRLQS (SEQ ID NO: 69), RANRRAT (SEQ ID NO: 70) или RANRLVS (SEQ ID NO: 71). В некоторых воплощениях, аминокислотная последовательность V_L CDR3 представлена LQYDEFPPYT (SEQ ID NO: 55).

DIKMTQSPSSLYASLGERVTITCKASQDIHRYLSWFQKPKGKSPKILYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISS
LEYEDMGIYYCLQYDEFPPYTFGGGTKLEMK (SEQ ID NO: 31)

DIKMTQSPSSLYASLGERVTITCKASQDIHRYLSWFQKPKGKSPKILYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISS
LEYEDMGIYYCLQYDEFPPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 32)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWYQKPKGKAPKLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDFTFTISS
LQPEDIATYYCLQYDEFPPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 33)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQKPKGKAPKSLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCLQYDEFPPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 34)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQKPKGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS
LQPEDFATYYCLQYDEFPPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 35)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWYQQKPGKAPKRLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS
LQPEDFATYYCLQYDEFPPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 36)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHRYLAWYQQKPGKVPKLLIYRANRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDVATYYCLQYDEFPPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 37)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHRYLAWYQQKPGQAPRLLIYRANRRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS
LEPEDFAVYYCLQYDEFPPYTFGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 38)

DIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS
LQPEDFATYYCLQYDEFPPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 39)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS
LQPEDFATYYCLQYDEFPPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 40)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKILIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS
LQPEDFATYYCLQYDEFPPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 41)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS
LQPEDFATYYCLQYDEFPPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 42)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKILIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS
LQPEDFATYYCLQYDEFPPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 43)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS
LQPEDFATYYCLQYDEFPPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 44)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS
LQPEDFATYYCLQYDEFPPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 45)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS
LQPEDFATYYCLQYDEFPPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 46)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS
LQPEDFATYYCLQYDEFPPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 47)

В некоторых случаях описанные здесь антитела к CD47 включают переменную область тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 5-30, и переменную область легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 31-47. Типичное антитело к CD47 содержит переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 31; переменную область тяжелой цепи,

тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 35; переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 35; или переменную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 27, и переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 35.

Описанные здесь антитела к CD47 включают любую из областей V_H , представленных в SEQ ID NO: 5-30, вместе с любой из областей V_L , представленных в SEQ ID NO: 31-47. В частности, описанные здесь антитела к CD47 содержат любую из областей V_H , представленных в SEQ ID NO: 5, 7, 8, 11, 15-17, 20-22, 27-30, вместе с любой из областей V_L , представленных в SEQ ID NO: 31-39, 42, 43, 44 и 47.

Описанные здесь антитела к CD47 включают любой из участков V_H CDR1, представленных в SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, любой из участков V_H CDR2, представленных в SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76, любой из участков V_H CDR3, представленных в SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 77, любой из участков V_L CDR1, представленных в SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 68, любой из участков V_L CDR2, представленных в SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 71, и участок V_L CDR3, представленный в SEQ ID NO: 55.

Специалистам должно быть известно, что можно без излишнего экспериментирования установить, имеет ли моноклональное антитело такую же специфичность, что и моноклональное антитело по изобретению (к примеру, антитело 2A1 или антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 5-31, и переменную область легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 31-47), определяя, будет ли первое антитело предотвращать связывание последнего с CD47. Если тестируемое моноклональное антитело конкурирует с моноклональным антителом по изобретению, о чем свидетельствует снижение связывания у моноклонального антитела по изобретению, то эти два моноклональных антитела связываются с одним и тем же или сходным эпитопом.

Альтернативный способ определения того, обладает ли моноклональное антитело специфичностью моноклонального антитела по изобретению, состоит в предварительной инкубации моноклонального антитела по изобретению с растворимым белком CD47 (с которым оно обычно реагирует), а затем добавлении тестируемого моноклонального антитела для определения того, будет ли ингибироваться способность тестируемого моноклонального антитела к связыванию с CD47. Если тестируемое моноклональное

антитело ингибируется, то оно, по всей вероятности, обладает такой же или функционально эквивалентной специфичностью к эпитопу, что и моноклональное антитело по изобретению.

Антитела настоящего изобретения

Скрининг моноклональных антител по изобретению также может проводиться, к примеру, путем измерения опосредованного CD47 и/или CD47/SIRPα сигнализирования и определения того, будет ли тестируемое моноклональное антитело модулировать, блокировать, ингибировать, снижать, противодействовать, нейтрализовать или иным образом нарушать опосредованное CD47 и/или CD47/SIRPα сигнализирование. Такой анализ может включать анализ конкурентного связывания. Кроме того, при таком анализе можно измерять биологические показатели, к примеру, способность усиливать фагоцитоз экспрессирующих CD47 клеток макрофагами, как описано в Примере 9 (фиг. 9).

Для получения моноклональных антител против CD47 или против его производных, фрагментов, аналогов, гомологов или ортологов можно применять различные методики, известные в данной области (к примеру, см. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow E and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, включено сюда путем ссылки). Полностью человеческие антитела – это такие молекулы антител, у которых все последовательности и легкой цепи, и тяжелой цепи, включая CDRs, происходят из генов человека. Такие антитела именуется здесь “человеческими антителами” или “полностью человеческими антителами”. Человеческие моноклональные антитела получают, к примеру, по методикам, описанным ниже в разделе «Примеры». Человеческие моноклональные антитела также можно получить методом Trioma; методом гибридомы с В-клетками человека (см. Kozbor et al., 1983 *Immunol Today* 4: 72); и методом гибридомы EBV для получения человеческих моноклональных антител (см. Cole et al., 1985 In: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Можно использовать человеческие моноклональные антитела и получать их с помощью гибридомы человека (см. Cote et al., 1983 *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2026-2030) или путем трансформации В-клеток человека с помощью вируса Эпштейна-Барр *in vitro* (см. Cole et al., 1985 In: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Антитела подвергают очистке хорошо известными методами типа аффинной хроматографии с помощью белка А или белка G, которая дает главным образом фракцию IgG из иммунной сыворотки. После этого либо в качестве альтернативы можно иммобилизовать на колонке специфический антиген, который служит мишенью для искомого иммуноглобулина, либо его эпитоп, и подвергнуть очистке иммуноспецифичное

антитело методом иммуноаффинной хроматографии. Очистка иммуноглобулинов обсуждается, к примеру, в статье D. Wilkinson (The Scientist, published by The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28).

Антитела к CD47 по изобретению представляют собой моноклональные антитела. Моноклональные антитела, которые модулируют, блокируют, ингибируют, снижают, противодействуют, нейтрализуют или иным образом нарушают опосредованную CD47 и/или CD47/SIRP α клеточную сигнализацию, получают, к примеру, путем иммунизации животных мембраносвязанным и/или растворимым CD47, к примеру, CD47 человека или его иммуногенным фрагментом, производным или вариантом. В качестве альтернативы животных иммунизируют клетками, трансфицированными вектором, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей CD47, при этом CD47 экспрессируется и остается на поверхности трансфицированных клеток. С другой стороны, антитела можно получать путем скрининга библиотеки, содержащей последовательности антител или их антиген-связывающих доменов, на связывание с CD47. Такие библиотеки получают, к примеру, в бактериофагах в виде слитых белков или пептидов с белком оболочки бактериофага, который экспрессируется на поверхности собранных фаговых частиц, а кодирующие последовательности ДНК содержатся в частицах фага (то есть это “библиотеки фагового дисплея”). После этого проводится скрининг гибридом, полученных при слиянии миеломы/B-клеток, на реактивность к CD47.

Моноклональные антитела получают, к примеру, гибридомными методами типа тех, что описаны в Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975). В гибридном методе обычно иммунизируют мышей, хомяков или других подходящих животных иммунизирующим агентом, вызывающим активацию лимфоцитов, вырабатывающих или способных вырабатывать антитела, которые будут специфически связываться с иммунизирующим агентом. С другой стороны, можно иммунизировать лимфоциты *in vitro*.

Иммунизирующим агентом, как правило, служит белковый антиген, его фрагмент или слитый белок. Обычно используются лимфоциты периферической крови, если нужны клетки человеческого происхождения, либо клетки селезенки или лимфатических узлов, если нужны клетки не человека, а других млекопитающих. Затем лимфоциты сливают с клетками иммортализованной линии с помощью подходящего вещества для слияния типа полиэтиленгликоля, получая клетки гибридомы (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Клетки иммортализованной линии, как правило, представлены трансформированными клетками млекопитающих, в частности, клетками миеломы грызунов, быка и человека. Обычно используют клетки миеломных

линий крыс или мышей. Клетки гибридомы можно культивировать в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, ингибирующих рост или выживаемость не подвергшихся слиянию иммортализованных клеток. Например, если у исходных клеток нет фермента гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (HGPRT или HPRT), то культуральная среда для гибридомы, как правило, должна содержать гипоксантин, аминоптерин и тимидин ("среда HAT"), то есть вещества, которые предотвращают рост клеток, дефектных по HGPRT.

Предпочтительными линиями иммортализованных клеток являются такие линии, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильно высокий уровень экспрессии антител выбранными клетками, вырабатывающими антитела, и чувствительны к таким средам, как среда HAT. Более предпочтительными линиями иммортализованных клеток являются линии миеломы мышей, которые можно получить, к примеру, из Центра распространения клеток Salk Institute, San Diego, California, и American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Для получения моноклональных антител также были описаны линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека (см. Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63)).

Затем культуральную среду, в которой культивируются клетки гибридомы, можно подвергнуть анализу на наличие моноклональных антител, направленных против антигена. Предпочтительно специфичность связывания моноклональных антител, вырабатываемых клетками гибридомы, определяют методом иммунопреципитации или методом связывания *in vitro* типа радиоиммуноанализа (РИА) или твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Такие методы хорошо известны в данной области. Сродство связывания моноклональных антител, к примеру, можно определить методом Скэтчарда по Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980). Кроме того, при терапевтическом применении моноклональных антител важно идентифицировать антитела, обладающие высокой степенью специфичности и высоким сродством связывания для заданного антигена.

После идентификации требуемых клеток гибридомы нужные клоны можно субклонировать методом серийных разведений и культивировать стандартными методами (см. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Подходящие для этого культуральные среды включают, к примеру, модифицированную Дюльбекко среду Игла и среду RPMI-1640. С другой стороны, клетки гибридомы можно культивировать *in vivo* в виде асцитов у млекопитающих.

Секретируемые субклонами моноклональные антитела можно выделить либо

подвергнуть очистке из культуральной среды или асцитной жидкости стандартными методами очистки иммуноглобулинов, такими, к примеру, как хроматография в сефарозе с белком А или в гидроксипатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Моноклональные антитела также можно получить методами рекомбинантной ДНК типа описанных в U.S. Patent No. 4,816,567. Можно легко выделить ДНК, кодирующую моноклональные антитела по изобретению, и просеквенировать стандартными методами (например, с помощью олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышиных антител). Предпочтительным источником такой ДНК служат клетки гибридомы по изобретению. После выделения можно вставить ДНК в экспрессирующий вектор, а затем трансфицировать им клетки хозяина типа клеток яичников китайского хомячка (СНО), эмбриональных почечных клеток человека (НЕК) 293, клеток COS обезьян, клеток PER.C6[®], NS0, SP2/0, YB2/0 или клеток миеломы, не вырабатывающих без этого белки иммуноглобулинов, чтобы они синтезировали моноклональные антитела в рекомбинантных клетках хозяина. К тому же ДНК можно модифицировать, например, вставить кодирующие последовательности константных доменов тяжелой и легкой цепей человека вместо гомологичных последовательностей мыши (см. U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)) или ковалентно присоединить к кодирующей последовательности иммуноглобулина всю или часть кодирующей последовательности не иммуноглобулина, а другого полипептида. Такой неиммуноглобулиновый полипептид можно вставить вместо константных доменов антитела по изобретению или вместо переменных доменов одного антигенсвязывающего сайта антитела по изобретению, получая химерные бивалентные антитела.

Человеческие антитела и гуманизация антител

Моноклональные антитела по изобретению включают полностью человеческие антитела и гуманизированные антитела. Такие антитела подходят для введения людям, не вызывая иммунной реакции у человека против вводимого иммуноглобулина.

Антитела к CD47 получают, к примеру, по методикам, описанным в приведенных ниже примерах. Например, антитела к CD47 по изобретению идентифицируют по модифицированной стратегии иммунизации RIMMs (неоднократная иммунизация по нескольким участкам) у мышей с последующим получением гибридомы.

В других, альтернативных методах, антитела к CD47 разрабатывают, к примеру, методами фагового дисплея с использованием антител, содержащих только человеческие последовательности. Такие подходы хорошо известны в данной области, например, в WO

92/01047 и U.S. Pat. No. 6,521,404, которые включены сюда путем ссылки. При таком подходе проводится скрининг фаговой комбинаторной библиотеки, несущей случайные пары легких и тяжелых цепей, используя природный или рекомбинантный источник CD47 или его фрагментов. При другом подходе антитела к CD47 получают способом, в котором по меньшей мере одна стадия процесса включает иммунизацию трансгенных животных (не человека) белком CD47 человека. При этом у таких ксеногенных животных некоторые из эндогенных локусов тяжелых и/или легких каппа-цепей отключатся и теряют способность к перегруппировке, которая необходима для получения генов, кодирующих иммуноглобулины в ответ на антиген. Кроме того, животным стабильно трансфецируют по меньшей мере один локус тяжелой цепи человека и по меньшей мере один локус легкой цепи человека. При этом в ответ на вводимый антиген человеческие локусы подвергаются перегруппировке с образованием генов, кодирующих переменные области человека, иммуноспецифичные к антигену. Следовательно, после иммунизации ксеномышь будет вырабатывать В-клетки, секретирующие полностью человеческие иммуноглобулины.

В данной области хорошо известны различные методы получения ксеногенных животных (не человека). Например, см. U.S. Pat. No. 6,075,181 и No. 6,150,584, которые включены сюда путем ссылки во всей полноте. Общая стратегия была продемонстрирована в связи с созданием первых линий ксеномышей XenoMouse™ и опубликована в 1994 г. См. Green et al., Nature Genetics 7:13-21 (1994), которая включена сюда путем ссылки во всей полноте. А также см. U.S. Patent Nos. 6,162,963; 6,150,584; 6,114,598; 6,075,181; 5,939,598; Japanese Patent Nos. 3 068 180 B2, 3 068 506 B2, 3 068 507 B2, European Patent No. EP 0 463 151 B1 и International Patent Applications No. WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 и другие из этой серии.

В качестве альтернативного подхода использовался подход “минилокус”, при котором воспроизводился экзогенный локус Ig путем включения кусков (отдельных генов) из локуса Ig. При этом в конструкцию для введения животным вставляется один или несколько генов V_H , один или несколько генов D_H , один или несколько генов J_H , константная область μ и вторая константная область (предпочтительно константная область γ). Например, см. U.S. Patent Nos. 5,545,806; 5,545,807; 5,591,669; 5,612,205; 5,625,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,643,763; 5,661,016; 5,721,367; 5,770,429; 5,789,215; 5,789,650; 5,814,318; 5,877,397; 5,874,299; 6,023,010; 6,255,458; European Patent No. 0 546 073 B1; и International Patent Application Nos. WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, WO 98/24884 и другие из этой серии.

Также было продемонстрировано получение человеческих антител из мышей, которым посредством слияния микроклеток вводились большие куски хромосом или целые хромосомы. См. European Patent Application Nos. 773 288 и 843 961.

Реакции человека на мышьиные антитела (НАМА) привели промышленность к созданию химерных или иным образом гуманизированных антител. Поскольку химерные антитела содержат константную область человека и иммунную переменную область, то ожидается, что будут наблюдаться определенные реакции человека на химерные антитела (НАСА), особенно при хроническом или мультидозовом применении антител. Поэтому было бы желательно получение полностью человеческих антител против CD47 для того, чтобы устранить или иным образом ослабить проблемы и/или эффекты реакций типа НАМА или НАСА.

Получение антител с пониженной иммуногенностью также осуществляется посредством гуманизации, химеризации и дисплейными методами с использованием соответствующих библиотек. Как известно, мышьиные антитела или антитела других видов можно гуманизировать или приматизировать с помощью хорошо известных методов. Например, см. Winter and Harris, *Immunol. Today* 14:43 46 (1993) и Wright et al., *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992). Нужные антитела можно сконструировать методами рекомбинантной ДНК, заменяя CH1, CH2, CH3, шарнирные домены и/или каркасные домены на соответствующие человеческие последовательности (см. WO 92102190 и U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,792; 5,714,350; и 5,777,085). Кроме того, известно и применение кДНК Ig для конструирования химерных генов иммуноглобулинов (Liu et al., *PNAS* 84: 3439 (1987) и *J. Immunol* 139: 3521 (1987)). Выделяется мРНК из гибридомы или других клеток, вырабатывающих антитело, и используется для получения кДНК. Нужная кДНК может быть амплифицирована методом полимеразной цепной реакции с помощью специфических праймеров (US Pat. Nos. 4683195 и 4683202). В качестве альтернативы создается библиотека и подвергается скринингу для выделения нужных последовательностей. Затем последовательность ДНК, кодирующую переменную область антитела, сливают с последовательностями константной области человека. Последовательности генов константных областей человека приведены в Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, N.I.H. Publication No. 91-3242. Гены С-области человека легко доступны из известных клонов. Выбор изотипа определяется желательными эффекторными функциями, такими как связывание комплемента или активность при зависимой от антител клеточной цитотоксичности. Предпочтительными изотипами являются IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Можно использовать любые из константных областей легкой цепи человека, т.е. каппа

или лямбда. Затем химерные, гуманизированные антитела подвергают экспрессии стандартными методами.

Можно получить фрагменты антител типа Fv, F(ab')₂ и Fab путем расщепления интактных белков, например, расщепления протеазами или химического расщепления. С другой стороны, можно создать усеченный ген. К примеру, химерный ген, кодирующий часть F(ab')₂-фрагмента, будет включать последовательности ДНК, кодирующие домен СН1 и шарнирную область Н-цепи, после которых следует стоп-кодон, давая усеченную молекулу.

Можно использовать консенсусные последовательности J-областей из Н и L для создания олигонуклеотидов для использования в качестве праймеров для введения полезных сайтов рестрикции в J-области для последующего соединения сегментов V-области с сегментами С-области человека. Можно модифицировать кДНК С-области методом направленного мутагенеза так, чтобы вставить сайт рестрикции в аналогичном положении в человеческую последовательность.

Экспрессионные вектора включают плазмиды, ретровирусы, YACs, эписомы из EBV и пр. Удобным вектором является такой, который кодирует функционально полную последовательность С_H или С_L иммуноглобулина человека, с соответствующими сайтами рестрикции, сконструированными таким образом, чтобы можно было легко вставить и экспрессировать любые последовательности V_H или V_L. В таких векторах обычно происходит сплайсинг между донорским сайтом сплайсинга во вставленной J-области и акцепторным сайтом сплайсинга перед С-областью человека, а также в тех участках сплайсинга, которые находятся внутри экзонов С_H человека. Полиаденилирование и терминация транскрипции происходят в нативных хромосомных участках после кодирующих областей. Образующееся химерное антитело можно соединить с любым сильным промотором, включая ретровирусные LTR, например, ранним промотором SV-40 (Okayama et al., Mol. Cell. Biol. 3:280 (1983)), LTR вируса саркомы Rous (Gorman et al., PNAS 79: 6777 (1982)) и LTR вируса лейкемии мышей Moloney (Grosschedl et al., Cell 41:885 (1985)). К тому же, как известно, можно использовать нативные промоторы Ig и пр.

Кроме того, человеческие антитела или антитела из других видов можно получить по технологии дисплейного типа, включая, без ограничения, фаговый дисплей, ретровирусный дисплей, рибосомный дисплей и другие методы, используя хорошо известные методики, а полученные молекулы можно подвергнуть дополнительному созреванию типа созревания аффинности, причем такие методы хорошо известны в данной области: Wright et al., Crit. Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992), Hanes and Plückthun, PNAS USA 94:4937-4942 (1997) (рибосомный дисплей), Parmley and Smith, Gene

73:305-318 (1988) (фаговый дисплей), Scott, TIBS, 17:241-245 (1992), Cwirla et al., PNAS USA 87:6378-6382 (1990), Russel et al., Nucl. Acids Research 21:1081-1085 (1993), Hoganboom et al., Immunol. Reviews 130:43-68 (1992), Chiswell and McCafferty, TIBTECH 10:80-8A (1992), и U.S. Patent No. 5,733,743. Если дисплейные технологии используются для получения не человеческих, а других антител, то такие антитела можно гуманизировать, как описано выше.

Такими методами можно получить антитела против экспрессирующих CD47 клеток, растворимых форм CD47, его эпитопов или пептидов, а также экспрессирующие их библиотеки (например, см. U.S. Patent No. 5,703,057), которые можно затем подвергнуть скринингу, как описано выше, на описанные здесь активности.

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

Это может быть вектор, липосомы, голая ДНК, ДНК с адьювантом, генная пушка, катетер и пр. Вектора включают химические конъюгаты типа описанных в WO 93/64701, которые содержат направляющую часть (к примеру, лиганд к рецептору на клеточной поверхности) и связывающую нуклеиновые кислоты часть (к примеру, полилизин), вирусные вектора (к примеру, ДНК-вирусные или РНК-вирусные вектора), слитые белки типа описанных в PCT/US95/02140 (WO 95/22618), которые представляют собой слитые белки, содержащие направляющую часть (к примеру, антитело, специфичное к клеткам мишени) и связывающую нуклеиновые кислоты часть (к примеру, протамин), плазмиды, фаги и др. Вектора могут быть хромосомными, нехромосомными или синтетическими.

Предпочтительными векторами являются вирусные вектора, слитые белки и химические конъюгаты. Ретровирусные вектора включают вирусы лейкемии Moloney у мышей. Предпочтительны ДНК-вирусные вектора. Они включают поксвирусные вектора типа ортопоксвирусных или авипоксвирусных векторов, герпесвирусные вектора типа векторов из вируса Herpes simplex I (HSV) (см. Geller A.I. et al., J. Neurochem. 64:487 (1995); Lim F. et al., in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford, England) (1995); Geller A.I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7603 (1993); Geller A.I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1149 (1990); аденовирусные вектора (см. LeGal LaSalle et al., Science 259:988 (1993); Davidson et al., Nat. Genet 3:219 (1993); Yang et al., J. Virol. 69:2004 (1995); и аденоассоциированные вирусные вектора (см. Kaplitt M.G. et al., Nat. Genet. 8:148 (1994).

Поксвирусные вектора вводят гены в цитоплазму клетки. Авипоксвирусные вектора дают лишь кратковременную экспрессию нуклеиновой кислоты. Аденовирусные вектора, аденоассоциированные вирусные вектора и вектора из вируса *Herpes simplex*

(HSV) предпочтительны для введения нуклеиновой кислоты в нервные клетки. Аденовирусные вектора дают более краткосрочную экспрессию (около 2 месяцев), чем аденоассоциированные вирусы (около 4 месяцев), что в свою очередь короче, чем у векторов из HSV. Выбор конкретного вектора зависит от клеток мишени и подлежащего лечению заболевания. Введение может осуществляться стандартными методами, например, путем инфицирования, трансфекции, трансдукции или трансформации. Примеры методов переноса генов включают, к примеру, голую ДНК, преципитацию CaPO_4 , DEAE-декстран, электропорацию, слияние протопластов, липофекцию, микроинъекцию клеток и вирусные вектора.

Вектор может использоваться для наведения практически на любые нужные клетки мишени. Например, для направления вектора (к примеру, аденовирусного, HSV) в нужное место может использоваться стереотаксическая инъекция. Кроме того, частицы можно вводить посредством интрацеребровентрикулярной (ICV) инфузии с помощью инфузионной системы-мининасоса типа системы SynchroMed Infusion. При доставке больших молекул в протяженные участки головного мозга также оказался эффективным метод, основанный на объемном потоке, называемый конвекцией, который может быть полезным при доставке вектора в клетки мишени (см. Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080 (1994); Morrison et al., Am. J. Physiol. 266:292-305 (1994)). Можно использовать и другие методы, включая катетеры, внутривенные, парентеральные, внутрибрюшинные и подкожные инъекции и пероральные или другие известные способы введения.

Такие вектора могут использоваться для экспрессии больших количеств антител, которые можно использовать различным образом. Например, для выявления наличия CD47 в образце. Антитела также может использовать для связывания и разрушения CD47 и/или нарушения взаимодействия CD47/SIRP α и опосредованного CD47/SIRP α сигнализирования.

Можно адаптировать методики для получения одноцепочечных антител, специфичных к антигенному белку по изобретению (например, см. U.S. Patent No. 4,946,778). Кроме того, можно адаптировать методики для получения экспрессирующих Fab библиотек (например, см. Huse et al., 1989 Science 246: 1275-1281), что позволит быстро и эффективно определять моноклональные Fab-фрагменты с требуемой специфичностью к белку или его производным, фрагментам, аналогам или гомологам. Можно получить фрагменты антител, содержащие идиотипы к белковому антигену, известными в данной области методами, включая, без ограничения: (i) F(ab')₂-фрагменты, получаемые при расщеплении пепсином молекулы антитела; (ii) Fab-фрагменты,

получаемые при восстановлении дисульфидных мостиков у $F(ab')_2$ -фрагментов; (iii) Fab-фрагменты, получаемые при обработке молекулы антитела папаином и восстановителем; и (iv) F_V -фрагменты.

Изобретение также охватывает F_V -, Fab-, Fab'- и $F(ab')_2$ -фрагменты антител к CD47, одноцепочечные антитела к CD47, однодоменные антитела (например, нанотела или V_{HH}) к CD47, биспецифичные антитела к CD47 и гетероконъюгаты антител к CD47.

Биспецифичные антитела представляют собой такие антитела, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере к двум различным антигенам. В данном случае одна из специфичностей связывания предназначена для CD47. Второй мишенью для связывания является любой другой антиген, предпочтительно белок или рецептор на клеточной поверхности или субъединица рецептора.

Способы получения биспецифичных антител известны в данной области. Обычно рекомбинантное получение биспецифичных антител основывается на совместной экспрессии двух пар тяжелой цепи/легкой цепи иммуноглобулина, при этом две тяжелые цепи имеют разные специфичности (Milstein and Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Вследствие случайного ассортимента тяжелых и легких цепей иммуноглобулина эти гибридомы (квадромы) могут вырабатывать смесь из десяти различных молекул антител, из которых только одна имеет правильную биспецифичную структуру. Очистка правильных молекул обычно осуществляется методом аффинной хроматографии. Подобные методики изложены в WO 93/08829 от 13 мая 1993 г. и в Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Вариабельные домены антител с требуемой специфичностью связывания (сайты связывания антитело-антиген) могут быть слиты с последовательностями константных доменов иммуноглобулина. Предпочтительно их сливают с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим по крайней мере часть шарнира и участки C_{H2} и C_{H3} . Предпочтительно по меньшей мере в одном из слитых белков находится первый константный участок (C_{H1}) тяжелой цепи, содержащий сайт, необходимый для связывания легкой цепи. ДНК, кодирующую слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и, если нужно, легкой цепи иммуноглобулина, встраивают в отдельные экспрессирующие вектора и совместно трансфецируют в подходящий организм хозяина. Более подробно о получении биспецифичных антител см., к примеру, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

В соответствии с другим подходом, описанным в WO 96/27011, можно подвергнуть инженерии интерфейс между парой молекул антител так, чтобы максимизировать процент гетеродимеров, получаемых из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительный

интерфейс включает по крайней мере часть участка C_{H3} константного домена антитела. В этом методе одну или несколько аминокислот с небольшими боковыми цепями из интерфейса первой молекулы антитела заменяют на более крупные боковые цепи (например, тирозин или триптофан). На интерфейсе второй молекулы антитела создаются компенсаторные крупным боковым цепям “полости” идентичного или сходного размера путем замены аминокислот с крупными боковыми цепями на меньшие (например, аланин или треонин). Это обеспечивает механизм для повышения выхода гетеродимеров по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами типа гомодимеров.

Биспецифичные антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифичных антител типа $F(ab')_2$). В литературе описаны способы получения биспецифичных антител из фрагментов антител. Например, биспецифичные антитела могут быть получены при помощи химического связывания. Brennan et al., Science 229:81 (1985) описали способ, в котором интактные антитела расщепляют протеолитически с получением $F(ab')_2$ -фрагментов. Эти фрагменты восстанавливают в присутствии комплексирующего дитиола реагента арсенита натрия для стабилизации ближних дитиолов и предотвращения образования межмолекулярных дисульфидных связей. Полученные Fab' -фрагменты затем превращают в производные тионитробензоата (TNB). Одно из производных Fab' -TNB затем обратно превращают в Fab' -тиол путем восстановления меркаптоэтиламиноом и смешивают с эквимольным количеством другого производного Fab' -TNB с образованием биспецифичного антитела. Полученные биспецифичные антитела можно использовать в качестве реагентов для селективной иммобилизации ферментов.

Кроме того, можно выделить Fab' -фрагменты прямо из *E. coli* и химически конъюгировать их с образованием биспецифичных антител. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) описали получение полностью гуманизированных молекул биспецифичных антител типа $F(ab')_2$. Каждый Fab' -фрагмент по отдельности секретируют из *E. coli* и подвергают направленной химической конъюгации *in vitro* с образованием биспецифичного антитела. Полученное при этом биспецифичное антитело связывалось с клетками, суперэкспрессирующими рецептор ErbB2, и с нормальными Т-клетками человека, а также запускало литическую активность у цитотоксических лимфоцитов человека против клеток опухоли молочной железы человека.

Также были описаны различные способы получения и выделения фрагментов биспецифичных антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, биспецифичные антитела получали с помощью лейциновых молний: Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). Пептиды лейциновых молний из белков Fos и

Jun соединяли с Fab'-частями двух различных антител путем слияния генов. Гомодимеры антител восстанавливали по шарнирной области с образованием мономеров, а затем снова окисляли с образованием гетеродимеров антител. Этот метод также может применяться для получения гомодимеров антител. Альтернативный механизм получения фрагментов биспецифичных антител обеспечила технология "диател", описанная в Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993). Фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с переменным доменом легкой цепи (V_L) через линкер, который слишком короток и не позволяет образование пары между двумя доменами на одной и той же цепи. Соответственно, домены V_H и V_L одного фрагмента вынуждены образовывать пару с комплементарными доменами V_L и V_H из другого фрагмента, при этом образуются два антиген-связывающих сайта. Известна и другая стратегия получения фрагментов биспецифичных антител при помощи димеров одноцепочечных Fv (sFv), см. Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994).

Предусмотрены антитела и более чем с двумя валентностями. Например, можно получить триспецифичные антитела: Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

Типичные биспецифичные антитела могут связываться с двумя различными эпитопами, из которых по меньшей мере один берет начало в белковом антигене по изобретению. С другой стороны, анти-антигенное плечо молекулы иммуноглобулина может соединяться с плечом, которое связывается с триггерной молекулой на лейкоцитах типа молекул Т-клеточных рецепторов (например, CD2, CD3, CD28 или B7) либо Fc-рецепторов для IgG (FcγR) типа FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16) с тем, чтобы сосредоточить клеточные защитные механизмы в клетках, экспрессирующих определенный антиген. Биспецифичные антитела также можно использовать для того, чтобы направлять цитотоксические средства в клетки, экспрессирующие определенный антиген. Такие антитела содержат антигесвязывающее плечо и плечо, которое связывает цитотоксическое средство или хелатор радионуклидов типа EOTUBE, DPTA, DOTA или TETA. Другие представляющие интерес биспецифичные антитела связываются с описанным здесь белковым антигеном и к тому же связывают тканевой фактор (TF).

В рамки настоящего изобретения также входят антитела типа гетероконъюгатов. Гетероконъюгаты антител состоят из двух соединенных ковалентно антител. Такие антитела, к примеру, предлагались для наведения клеток иммунной системы на нежелательные клетки (см. U.S. Patent No. 4,676,980) и для лечения ВИЧ-инфекции (см. WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Предусматривается, что такие антитела можно получать *in vitro* с использованием известных методов химии синтеза белков, в том числе с перекрестно-сшивающими реагентами. Например, можно конструировать

иммунотоксины с помощью реакции обмена дисульфидов или путем образования тиоэфирной связи. Примеры подходящих реагентов для этой цели включают иминотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат, а также реагенты, приведенные, к примеру, в U.S. Patent No. 4,676,980.

Может понадобиться модифицировать антитело по изобретению в отношении эффекторной функции с тем, чтобы повысить, например, эффективность антитела при лечении заболеваний, связанных с нарушением сигнализирования CD47. Например, можно ввести остаток цистеина в Fc-область, что позволит образование межцепочечной дисульфидной связи в этой области. Полученное при этом гомодимерное антитело может обладать лучшей способностью к интернализации и/или большей способностью к опосредованному комплементом уничтожению клеток и зависимой от антител клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Caron et al., J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992); и Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)). С другой стороны, можно создать антитело с двойной Fc-областью, которое будет обладать повышенной способностью к лизису комплемента и ADCC (см. Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)).

Изобретение также имеет отношение к иммуноконъюгатам, содержащим антитело, конъюгированное с цитотоксическим средством типа токсина (к примеру, обладающего ферментативной активностью токсина бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения либо его фрагментов) или радиоактивного изотопа (т.е. радиоконъюгата).

Обладающие ферментативной активностью токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают цепь А дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Sapaonaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены. Доступны различные радионуклиды для получения радиоконъюгированных антител. Их примеры включают ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y и ^{186}Re .

Конъюгаты антител с цитотоксическими средствами получают с помощью различных бифункциональных реагентов для конъюгирования белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиолат (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (типа диметиладипимидата HCl), активные сложные эфиры (типа дисукцинимидилсуберата), альдегиды (типа глутарового альдегида), бис-азидосоединения (типа бис-(*n*-азидобензоил)гександиамина), производные

бис-дiazония (типа бис-(*n*-дiazидобензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (типа толуол-2,6-диизоцианата) и бис-активные соединения фтора (типа 1,5-дифтор-2,4-динитробензола). Например, иммунотоксин рицин можно получить, как описано в Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987): Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. (см. WO 94/11026).

Рядовым специалистам должно быть известно, что можно конъюгировать самые различные молекулы с полученными антителами по изобретению (к примеру, см. "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), все содержание которого включено сюда путем ссылки).

Связывание может осуществляться с помощью любой химической реакции, соединяющей две молекулы, лишь бы только антитело и другая молекула сохраняли свои соответствующие активности. Такая связь может включать различные химические механизмы, к примеру, ковалентное связывание, аффинное связывание, интеркаляцию, координационное связывание и комплексообразование. Однако предпочтительным является ковалентное связывание. Ковалентное связывание может осуществляться либо путем прямой конденсации существующих боковых цепей, либо путем включения образующих мостики молекул. При связывании белковых молекул типа антител настоящего изобретения с другими молекулами применяются многие двухвалентные или поливалентные соединительные реагенты. Например, репрезентативные реагенты для связывания могут включать такие органические соединения, как тиоэфиры, карбодиимиды, сложные эфиры сукцинимидов, диизоцианаты, глутаральдегид, диазобензолы и гексаметилендиамины. Этот перечень не является исчерпывающим по различным классам связывающих реагентов, известных в данной области, а скорее представляет пример наиболее распространенных связывающих реагентов (см. Killen and Lindstrom, J. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen et al., Immunol. Reviews 62:185-216 (1982); и Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)).

Предпочтительные линкеры описаны в литературе (к примеру, см. Ramakrishnan S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984), где описано применение MBS (N-малеимидобензоильный эфир N-гидроксисукцинимид). Также см. U.S. Patent No. 5,030,719, где описано применение галогенированного производного ацетилгидразида, соединенного с антителом через олигопептидный линкер. Особенно предпочтительные линкеры включают: (i) EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид; (ii) SMPT (4-сукцинимидилоксикарбонил- α -метил- α -(2-пиридилдитио)толуол (Pierce Chem. Co., кат.

№ 21558G); (iii) SPDP (сукцинимидил-6-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]гексаноат (Pierce Chem. Co., кат. № 21651G); (iv) сульфо-LC-SPDP (сульфосукцинимидил-6-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]гексаноат (Pierce Chem. Co., кат. № 2165-G); и (v) сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид; Pierce Chem. Co., кат. № 24510), конъюгированный с EDC.

Вышеописанные линкеры содержат компоненты, обладающие разными свойствами, что приводит к конъюгатам с различными физико-химическими свойствами. Например, сульфо-NHS-эфиры алкилкарбоксилатов более стабильны, чем сульфо-NHS эфиры ароматических карбоксилатов. Содержащие NHS-эфир линкеры менее растворимы, чем сульфо-NHS-эфиры. Далее, линкер SMPT содержит стерически затрудненную дисульфидную связь и может образовывать конъюгаты с повышенной стабильностью. Дисульфидные связи в общем менее стабильны, чем другие связи, так как дисульфидная связь расщепляется *in vitro*, в результате чего будет меньше конъюгата. Сульфо-NHS, в частности, может повысить устойчивость карбодиимидной конденсации. Карбодиимидная конденсация (типа EDC) в сочетании с сульфо-NHS дает сложные эфиры, которые более устойчивы к гидролизу, чем сама реакция карбодиимидной конденсации.

Приведенные здесь антители также могут быть составлены в виде иммунолипосом. Липосомы, содержащие антители, получают известными способами типа описанных в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); и U.S. Pat. Nos. 4,485,045 и 4,544,545. Липосомы с повышенным временем циркуляции описаны в U.S. Patent No. 5,013,556.

Особенно полезные липосомы могут быть получены методом обратнoфазового испарения с помощью липидной композиции, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-производные фосфатидилэтаноламина (PEG-PE). Липосомы пропускают через фильтры с определенным размером пор, получая липосомы требуемого диаметра. Fab'-фрагменты антител настоящего изобретения можно конъюгировать с липосомами, как описано в Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982), посредством реакции дисульфидного обмена.

Применение антител против CD47

Следует иметь в виду, что терапевтические средства в соответствии с изобретением вводятся вместе с подходящими носителями, наполнителями и другими веществами, которые включают в композиции для улучшения переноса, доставки, переносимости и пр. Много подходящих лекарственных форм можно найти в фармацевтическом справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), в частности там же Chapter 87 by Blaug,

Seymour. Эти лекарственные формы включают, к примеру, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные либо анионные) везикулы (типа Lipofectin™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии типа карбовакс (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Любые из вышеприведенных смесей могут подойти для лечения и терапии в соответствии с настоящим изобретением, при условии, что активный ингредиент в составе не инактивируется этим составом, а лекарственная форма физиологически совместима со способом введения и выдерживает его. Также см. Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance" Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000); Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals" Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000); Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery – some emerging concepts" J. Pharm. Sci. 89(8):967-78 (2000); Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998); и приведенные в них ссылки насчет дополнительной информации о рецептурах, наполнителях и носителях, хорошо известных химикам-фармацевтам.

В одном воплощении антитела по изобретению, в том числе моноклональные антитела по изобретению, могут применяться в качестве терапевтических средств. Такие средства обычно применяются для диагностики, прогнозирования, мониторинга, лечения, облегчения и/или предупреждения заболевания или патологии, связанной с нарушением экспрессии, активности и/или сигнализирования CD47 у субъекта. Терапевтический режим осуществляется путем идентификации субъекта, например, больного человека, страдающего (или подверженного риску) заболеванием или расстройством, связанным с нарушением экспрессии, активности и/или сигнализирования CD47, к примеру, раком или другим неопластическим состоянием, с использованием стандартных методов. Субъекту вводится препарат антитела, предпочтительно антитела с высокой специфичностью и высоким сродством к своему антигену-мишени, которое, как правило, дает эффект за счет связывания со своей мишенью. Введение антитела может устранять или ингибировать или нарушать экспрессию, активность и/или сигнальную функцию мишени (например, CD47). Введение антитела может устранять или ингибировать или нарушать связывание мишени (например, CD47) с эндогенным лигандом (например, SIRPα), с которым она естественным образом связывается. К примеру, антитело связывается с мишенью и модулирует, блокирует, ингибирует, снижает, противодействует, нейтрализует или иным образом нарушает экспрессию, активность и/или сигнализирование CD47.

Заболевания или расстройства, связанные с нарушением экспрессии, активности

и/или сигнализирования CD47, включают, без ограничения, гематологические раковые заболевания и/или твердые опухоли. Гематологические раковые заболевания включают, к примеру, лейкемию, лимфому и миелому. Некоторые формы лейкемии включают, без ограничения, острую лимфоцитарную лейкемию (ALL), острую миелоидную лейкемию (AML), хроническую лимфоцитарную лейкемию (CLL), хроническую миелогенную лейкемию (CML), миелопролиферативные заболевания/новообразования (MPDS) и синдром миелодисплазии. Некоторые формы лимфомы включают, без ограничения, лимфому Ходжкина, вялотекущую и агрессивную неходжкинскую лимфому, лимфому Беркитта и фолликулярную лимфому (мелкоклеточную и крупноклеточную). Некоторые формы миеломы включают, без ограничения, множественную миелому (MM), гигантоклеточную миелому, миелому тяжелых цепей или легких цепей и миелому Бенс-Джонса. Твердые опухоли включают, к примеру, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, рак поджелудочной железы, рак простаты, опухоли меланомы, колоректальный рак, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак пищевода, рак печени и рак почек.

Симптомы, связанные с раком и другими неопластическими состояниями, включают, к примеру, воспаление, жар, общее недомогание, лихорадку, боли, которые часто локализуются в зоне воспаления, потерю аппетита, потерю веса, отеки, головную боль, усталость, сыпь, анемию, мышечную слабость, усталость мышц и брюшные симптомы, такие, к примеру, как боль в животе, диарея или запор.

Терапевтически эффективное количество антитела по изобретению в общем означает количество, необходимое для достижения терапевтической цели. Как отмечалось выше, это может быть взаимодействие связывания между антителом и его антигеном-мишенью, которое в некоторых случаях нарушает функционирование мишени. Так что количество, необходимое для введения, будет зависеть от сродства связывания антитела со своим антигеном, а также от скорости, с которой вводимое антитело выводится из свободного объема того субъекта, которому оно вводится. Общий диапазон терапевтически эффективной дозировки антител или фрагментов антител по изобретению может составлять, без ограничения, от 0,1 мг/кг массы тела до 100 мг/кг массы тела. Общая частотность дозировки может составлять, к примеру, от двух раз в день до одного раза в неделю.

Эффективность лечения определяется в связи с каким-либо известным способом диагностики или лечения конкретного связанного с воспалением заболевания. Ослабление одного или нескольких симптомов связанного с воспалением заболевания означает, что антитело дает положительный клинический эффект.

Методы скрининга антител, обладающих требуемой специфичностью, включают,

без ограничения, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и другие иммунологические методы, известные в данной области.

В другом воплощении антитела против CD47 могут применяться в способах, известных в данной области и относящихся к локализации и/или количественному определению CD47 (например, для измерения уровня CD47 и/или как CD47, так и SIRP α в соответствующих физиологических образцах, для применения в методах диагностики, для применения при визуализации белка и пр.). В данном воплощении специфичные к CD47 антитела либо их производные, фрагменты, аналоги или гомологи, содержащие происходящий из антитела антиген-связывающий домен, применяются в качестве фармакологически активных соединений (которые в дальнейшем именуются “лекарственными средствами”).

В другом воплощении специфичные к CD47 антитела могут применяться для выделения полипептида CD47 стандартными методами типа иммуноаффинной хроматографии или иммунопреципитации. Антитела против белка CD47 (или его фрагмента) могут применяться в диагностике для мониторинга уровня белка в тканях как часть процедуры клинических анализов, к примеру, чтобы определить эффективность данного режима лечения. Детектирование может облегчаться путем соединения (то есть физического связывания) антитела с детектируемым веществом. Примеры детектируемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы и радиоактивные материалы. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу и ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламинфлуоресцеин, дансилхлорид и фикоэритрин; примеры люминесцентных материалов включают люминол; примеры биолюминесцентных материалов включают люциферазу, люциферин и экворин; а примеры подходящих радиоактивных материалов включают ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S и ^3H .

В еще одном воплощении антитела по изобретению могут применяться в качестве средства для обнаружения присутствия белка (или фрагмента белка) CD47 и/или и CD47, и SIRP α в образце. В некоторых воплощениях антитело содержит детектируемую метку. Антитела бывают поликлональными или, более предпочтительно, моноклональными. Применяются интактные антитела или их фрагменты (к примеру, Fab, scFv или F(ab') $_2$). Термин “меченый” в отношении зонда или антитела охватывает и прямое мечение зонда

или антитела путем соединения (то есть физического связывания) детектируемого вещества с зондом или антителом, и косвенное мечение зонда или антитела при реакции с другим реагентом, который непосредственно помечен. Примеры косвенного мечения включают детектирование первичного антитела с помощью флуоресцентно меченого вторичного антитела и концевое мечение ДНК зонда биотином с тем, что его можно было детектировать флуоресцентно меченым стрептавидином. Термин “биологический образец” охватывает ткани, клетки и биологические жидкости, выделенные из субъекта, а также ткани, клетки и жидкости, находящиеся в организме субъекта. Таким образом, применение термина “биологический образец” включает кровь и фракции или компоненты крови, включая сыворотку крови, плазму крови и лимфу. Иными словами, метод обнаружения по изобретению может применяться для обнаружения анализируемой мРНК, белка или геномной ДНК в биологическом образце как *in vitro*, так и *in vivo*. Например, методы обнаружения *in vitro* анализируемой мРНК включают Нозерн-гибридизацию и гибридизацию *in situ*. Методы обнаружения *in vitro* анализируемого белка включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), western-блот, иммунопреципитацию и иммунофлуоресценцию. Методы обнаружения *in vitro* анализируемой геномной ДНК включают Саузерн-гибридизацию. Процедуры проведения иммуноанализа описаны, к примеру, в “ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology”, Vol. 42, J.R. Crowther (Ed.) Humana Press, Totowa, NJ, 1995; “Immunoassay”, E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; и “Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”, P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Кроме того, методы обнаружения *in vivo* анализируемого белка включают введение субъекту меченого антитела против анализируемого белка. Например, антитело можно пометить радиоактивным маркером, присутствие и локализацию которого у субъекта можно детектировать стандартными методами визуализации.

Терапевтическое введение и композиции антител к CD47

Антитела по изобретению (также именуемые здесь как “активные соединения”) и их производные, фрагменты, аналоги и гомологи могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Принципы и соображения, действующие при получении таких композиций, а также рекомендации по выбору компонентов приведены, к примеру, в Remington’s Pharmaceutical Sciences: The Science and Practice of Pharmacy, 19th ed. (Alfonso R. Gennaro et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, and Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; и Peptide and Protein Drug Delivery (Advances in Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

Такие композиции обычно включают антитело и фармацевтически приемлемый носитель. При использовании фрагментов антител предпочтительны самые мелкие ингибиторные фрагменты, которые специфически связываются со связывающим доменом искомого белка. Например, исходя из последовательностей варибельной области антитела, можно разработать пептидные молекулы, сохраняющие способность к связыванию с последовательностью искомого белка. Такие пептиды можно синтезировать химически и/или получить по технологии рекомбинантной ДНК (например, см. Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)).

В настоящем описании термин “фармацевтически приемлемый носитель” охватывает всевозможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и задерживающие всасывание средства и т.п., совместимые с фармацевтическим применением. Подходящие носители описаны в последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартном справочнике в этой области, включенном сюда путем ссылки. Предпочтительные примеры таких носителей или разбавителей включают, без ограничения, воду, физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и 5% сывороточный альбумин человека. Также можно использовать липосомы и неводные носители типа нелетучих масел. Применение таких сред и веществ для фармацевтически активных соединений хорошо известно в данной области. За исключением тех случаев, когда обычная среда или вещество несовместимы с активным соединением, предусматривается их применение в композициях.

Композиции, предназначенные для ведения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко осуществляется фильтрованием через стерильные фильтрующие мембраны.

Фармацевтические композиции по изобретению составляются так, чтобы они были совместимы с предполагаемым способом их введения. Примеры способов введения включают парентеральное, например, внутривенное, внутрикожное, подкожное, пероральное (например, ингаляция), трансдермальное (т.е. местное), трансмукозальное и ректальное введение. Растворы или суспензии для парентерального, внутрикожного, подкожного применения могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель типа воды для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства типа бензилового спирта или метилпарабена; антиоксиданты типа аскорбиновой кислоты или бисульфита натрия; хелаторы типа этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА); буфера типа ацетатных, цитратных или фосфатных; и вещества для доведения тоничности типа хлорида натрия или декстрозы.

Значение pH можно доводить с помощью кислот или оснований типа соляной кислоты или гидроксида натрия. Парентеральные препараты могут быть заключены в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые пузырьки из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, пригодные для инъекций, включают стерильные водные растворы (когда они водорастворимы) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления *ex tempore* стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Для внутривенного введения подходящими носителями являются физиологический раствор, бактериостатическая вода, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой в такой степени, чтобы она легко входила в шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов типа бактерий и грибов. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, к примеру, воду, этанол, полиол (к примеру, глицерин, пропиленгликоль или жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящие смеси из них. Надлежащая текучесть может поддерживаться, к примеру, при помощи покрытия типа лецитина, поддержанием требуемого размера частиц в случае дисперсий и использованием поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов достигается с помощью различных антибактериальных и противогрибковых препаратов, к примеру, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях предпочтительно нужно включать в композиции изотонические средства, к примеру, сахара, многоатомные спирты типа маннита, сорбита, хлорид натрия. Пролонгированное всасывание композиций для инъекций осуществляется включением в композицию вещества, замедляющего всасывание, к примеру, моностеарата алюминия или желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены введением активного соединения в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают включением активного соединения в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций способы их получения составляют вакуумная сушка и лиофилизация, дающие порошок активного ингредиента вместе с любым другим желательным ингредиентом из предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

Пероральные композиции обычно включают инертный разбавитель или съедобный

носитель. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы или запрессованы в таблетки. Для перорального терапевтического введения активное соединение может быть включено с наполнителями для применения в виде таблеток, пастилок или капсул. Также можно приготовить пероральные композиции с помощью несущей жидкости в качестве жидкости для полоскания рта, при этом соединение в жидком носителе поступает перорально для полоскания и выплевывается либо проглатывается. В состав композиции могут входить фармацевтически совместимые связующие и/или вспомогательные вещества. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и пр. могут содержать любые из следующих ингредиентов или аналогичных соединений: связующее вещество типа микрокристаллической целлюлозы, смолы трагаканта или желатина; наполнитель типа крахмала или лактозы; дезинтегрирующее вещество типа альгиновой кислоты, Primogel или кукурузного крахмала; смазывающее вещество типа стеарата магния или Sterotes; вещество, способствующее скольжению, типа коллоидного диоксида кремния; подсластитель типа сахарозы или сахарина; или ароматизатор типа мяты перечной, метилсалицилата или апельсинового ароматизатора.

При введении путем ингаляции соединения вводятся в виде аэрозольного спрея из находящегося под давлением контейнера или дозатора, содержащего подходящий газ-вытеснитель, например, двуокись углерода, либо из пульверизатора.

Системное введение также может осуществляться трансмукозально (через слизистую) или трансдермально (через кожу). Для трансмукозального или трансдермального введения в композициях используют пенетранты, проникающие через соответствующий барьер. Такие проникающие вещества хорошо известны и включают, к примеру, для трансмукозального введения – детергенты, соли желчных кислот и производные фусидовой кислоты. Трансмуккозальное введение может осуществляться при помощи распылителей в нос или свечей. Для трансдермального введения активные соединения составляют в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, как это хорошо известно в данной области.

Соединения также готовят в виде свечей (например, на обычной основе для свечей типа масла какао и других глицеридов) или удерживающих клизм для ректального введения.

В одном воплощении активные соединения готовят с носителями, которые должны защищать соединение от быстрого выведения из организма, типа лекарственных форм с продолжительным/контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды,

полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэферы и полимолочная кислота. Способы получения таких форм должны быть известны специалистам.

Например, активные ингредиенты могут быть заключены в микрокапсулы, к примеру, приготовленные методом коацервации или путем межфазной полимеризации, к примеру, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы из поли(метилметакрилата), соответственно, в коллоидной системе доставки лекарств (к примеру, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии.

Можно получить препараты с продолжительным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с продолжительным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, причем матрица имеет вид формованного изделия, например, пленки или микрокапсул. Примеры матриц с продолжительным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (к примеру, поли(2-гидроксиэтил-метакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (U.S. Pat. No. 3,773,919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной и гликолевой кислоты типа LUPRON DEPOT™ (микросферы для инъекций, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислоты и лейпролида ацетата) и поли-D-(-)-3-оксимасляную кислоту. В то время, как полимеры типа этилен-винилацетата и сополимеры молочной и гликолевой кислоты способны высвобождать молекулы на протяжении более 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более короткого времени.

Материалы также можно получить коммерческим путем от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Также в качестве фармацевтически приемлемых носителей можно использовать суспензии липосом (в том числе направленных на инфицированные клетки с помощью моноклональных антител к вирусным антигенам). Их можно получить в соответствии с методами, известными специалистам, например, как описано в U.S. Patent No. 4,522,811.

Особенно предпочтительно составлять пероральные или парентеральные композиции в стандартной дозовой форме для простоты введения и однородности дозировки. Стандартная дозовая форма в настоящем описании означает физически дискретные единицы, пригодные в качестве единиц дозировки для подлежащего лечению субъекта; причем каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное на достижение требуемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для стандартных дозовых форм

по изобретению диктуется и непосредственно зависит от уникальных характеристик активного соединения и требуемого конкретного терапевтического эффекта, а также от существующих ограничений в области составления таких активных соединений для лечения физических лиц.

Фармацевтические композиции могут быть заключены в контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями по применению.

Лекарственная форма может содержать и более одного активного соединения, если это необходимого для подлежащего лечению конкретного показания, предпочтительно с дополняющей активностью, которые не оказывают отрицательного влияния друг на друга. С другой стороны, композиция может содержать вещество, усиливающее её функцию, такое, к примеру, как цитотоксическое средство, цитокин, химиотерапевтическое средство или средство, ингибирующее рост. Такие молекулы должны присутствовать в комбинации в таких количествах, которые эффективны для их предназначения.

В одном воплощении активные соединения вводятся в виде комбинированной терапии, т.е. в сочетании с другими средствами, например, терапевтическими средствами, которые являются полезными для лечения патологических состояний или расстройств, как-то различных форм рака, аутоиммунных заболеваний и воспалительных заболеваний. Термин “в комбинации” в данном контексте означает, что средства вводятся практически в одно время, либо одновременно, либо последовательно. При последовательном введении в начале введения второго соединения первое из двух соединений предпочтительно все еще обнаруживается в эффективной концентрации на месте лечения.

Например, комбинированная терапия может включать одно или несколько антител по изобретению, составленных вместе и/или вводимых вместе с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, например, одним или несколькими ингибиторами цитокинов и факторов роста, иммунодепрессантами, противовоспалительными средствами, метаболическими ингибиторами, ингибиторами ферментов и/или цитотоксическими или цитостатическими средствами, как описано более подробно ниже. При такой комбинированной терапии можно с выгодой использовать более низкие дозы вводимых терапевтических средств и тем самым избежать возможной токсичности или осложнений, связанных с различными монотерапиями.

Предпочтительными терапевтическими средствами, используемыми в комбинации с антителом по изобретению, являются такие средства, которые на различных стадиях препятствуют воспалительной реакции. В одном воплощении одно или несколько из описанных здесь антител можно составить вместе и/или вводить вместе с одним или несколькими другими средствами, как-то с другими антагонистами цитокинов или

факторов роста (например, растворимыми рецепторами, пептидными ингибиторами, небольшими молекулами, слитыми лигандами); либо с антителами или их антиген-связывающими фрагментами, которые связываются с другими мишенями (например, антителами, которые связываются с другими цитокинами или факторами роста, их рецепторами или другими молекулами клеточной поверхности); и противовоспалительными цитокинами или их агонистами.

В других воплощениях антитела по изобретению применяются как адъюванты вакцин против аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний и пр. Комбинирование адъювантов для лечения таких заболеваний подходит для применения в комбинации с широким спектром антигенов из числа аутоантигенов, т.е. аутоантигенов, участвующих в аутоиммунных заболеваниях, например, с основным белком миелина; воспалительных аутоантигенов, например, с белком амилоидных пептидов; или антигенов трансплантата, например, с аллоантигенами. Антиген может включать пептиды или полипептиды, происходящие из белков, а также фрагменты любого из следующих: сахаридов, белков, полинуклеотидов или олигонуклеотидов, аутоантигенов, белков амилоидных пептидов, антигенов трансплантата, аллергенов или других высокомолекулярных компонентов. В некоторых случаях в антигенные композиции входит более чем один антиген.

Разработка и получение других лекарств

В соответствии с настоящим изобретением и на основе активности антител, полученных и охарактеризованных в отношении CD47, облегчается разработка других терапевтических возможностей помимо молекул антител. Такие возможности включают, без ограничения, продвинутые терапевтические антитела типа биспецифичных антител, иммунотоксины и радиоактивно меченые препараты, получение пептидных лекарств, генная терапия, в частности интратела, антисмысловые лекарства и небольшие молекулы.

Например, в отношении биспецифичных антител, можно получить биспецифичные антитела, включающие: (i) два антитела, конъюгированные друг с другом, – одно со специфичностью к CD47, а другое ко второй молекуле, (ii) одно антитело, у которого одна цепь специфична к CD47, а вторая цепь специфична ко второй молекуле, или (iii) одноцепочечное антитело, обладающее специфичностью к CD47 и ко второй молекуле. Такие биспецифичные антитела создаются с помощью хорошо известных методов, к примеру, в связи с (i) и (ii) см., например, Fanger et al., *Immunol. Methods* 4:72-81 (1994); и Wright et al., *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992); а в связи с (iii) см., например, Traunecker et al., *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992).

В отношении иммунотоксинов, можно модифицировать антитела таким образом,

чтобы они действовали в качестве иммунотоксинов, с помощью хорошо известных методов, например, см. Vitetta, *Immunol. Today* 14:252 (1993). Также см. U.S. Patent No. 5,194,594. В отношении получения радиомеченых антител, такие модифицированные антитела также можно легко получить с помощью хорошо известных методов, например, см. Junghans et al. in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2nd edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). Также см. U.S. Patent Nos. 4,681,581, 4,735,210, 5,101,827, 5,102,990 (RE 35,500), 5,648,471 и 5,697,902. Каждые из иммунотоксинов и радиомеченых молекул будут уничтожать клетки, экспрессирующие CD47.

В отношении получения терапевтических пептидов, при помощи структурной информации, касающейся CD47 и антител к нему, как-то антител по изобретению, или скрининга библиотек пептидов можно получить терапевтические пептиды, направленные против CD47. Разработка и скрининг пептидных лекарств обсуждается в работах Houghten et al., *Biotechniques* 13:412-421 (1992); Houghten, *PNAS USA* 82:5131-5135 (1985); Pinalla et al., *Biotechniques* 13:901-905 (1992); Blake and Litz-Davis, *BioConjugate Chem.* 3:510-513 (1992). Иммунотоксины и радиомеченые молекулы также можно получить, аналогичным образом, в связи с молекулами пептидов, как описано выше в отношении антител. Если принять, что молекула CD47 (или такая форма, как сплайс-вариант или альтернативная форма) функционально активна в процессе болезни, то можно будет сконструировать ген и антисмысловые терапевтические средства к нему обычными методами. Такие возможности можно использовать для модулирования функции CD47. В связи с этим антитела настоящего изобретения облегчают разработку и применение связанных с ними функциональных анализов. Разработка и стратегия антисмысловых терапевтических средств подробно обсуждается в International Patent Application No. WO 94/29444. Схемы и стратегии генной терапии хорошо известны. Тем не менее, в частности, применение методов генной терапии, включающих интратела, может оказаться особенно выгодным. Например, см. Chen et al., *Human Gene Therapy* 5:595-601 (1994); и Marasco, *Gene Therapy* 4:11-15 (1997). Общая схема и соображения в связи с генной терапией также обсуждаются в International Patent Application No. WO 97/38137.

Знания, почерпнутые из структуры молекулы CD47 и её взаимодействия с другими молекулами по настоящему изобретению типа SIRP α и/или антител по изобретению, и другие можно использовать для рациональной разработки дополнительных терапевтических возможностей. В этой связи можно использовать рациональные методы разработки лекарственных средств, такие как рентгеновская кристаллография, компьютерное (или при содействии) молекулярное моделирование (CAMM), количественная или качественная взаимозависимость структура-активность (QSAR) и

тому подобные технологии, чтобы сосредоточить усилия на поиске лекарств. Рациональный дизайн позволяет предсказывать структуру белков или синтетических структур, способных взаимодействовать с молекулой или её специфическими формами, которые можно использовать для изменения или модулирования активности IL-6Rc. Такие структуры можно синтезировать химически или экспрессировать в биологических системах. Этот подход рассматривался в Capsey et al., *Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs* (Stockton Press, NY (1988)). Кроме того, можно разработать и синтезировать комбинаторные библиотеки и использовать их в программах скрининга типа программ высокопроизводительного скрининга.

Способы скрининга

Изобретением предусмотрены способы (также именуемые здесь как “методы скрининга”) идентификации модуляторов, т.е. кандидатов или тестируемых соединений или средств (к примеру, пептидов, пептидомиметиков, небольших молекул или других препаратов), модулирующих или иным образом нарушающих связывание CD47 с SIRP α , либо кандидатов или тестируемых соединений или средств, модулирующих или иным образом нарушающих сигнальную функцию CD47 и/или CD47-SIRP α . Также предусмотрены способы идентификации соединений, применимых для лечения заболеваний, связанных с нарушением экспрессии, активности и/или сигнализирования CD47 и/или CD47-SIRP α . Способы скрининга могут включать известные или используемые методы либо те, что описаны здесь. Например, можно иммобилизовать CD47 на микропланшете и инкубировать с кандидатом или тестируемым соединением, например, антителом к CD47, в присутствии SIRP α . После этого можно детектировать связавшийся SIRP α с помощью вторичного антитела и измерить поглощение на считывающем устройстве.

Также предусмотрены способы идентификации соединений, способных усиливать фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами. Эти способы могут включать известные или используемые методы либо те, что описаны здесь. Например, макрофаги инкубируют с мечеными опухолевыми клетками в присутствии соединения-кандидата, к примеру, антитела к CD47. Через некоторое время можно исследовать макрофаги на интернализацию опухолевой метки, чтобы определить фагоцитоз. Дополнительные подробности касательно этих методов, к примеру, анализ блокирования SIRP α и анализ фагоцитоза, приведены в Примерах.

Изобретение также включает соединения, указанные в описанных здесь способах скрининга.

В одном воплощении изобретением предусмотрены способы скрининга кандидатов

или тестируемых соединений, модулирующих сигнальную функцию CD47. Тестируемые соединения по изобретению могут быть получены по любому из различных подходов в методах комбинаторных библиотек, известных в данной области, включая: биологические библиотеки; пространственно адресуемые параллельные твердофазные или жидкофазные библиотеки; методы синтетических библиотек, требующие деконволюции; метод библиотек типа “одна бусина - одно соединение”; и методы синтетических библиотек с использованием аффинной хроматографии для отбора. Метод биологических библиотек ограничивается библиотеками пептидов, тогда как другие четыре подхода применимы к библиотекам соединений пептидов, непептидных олигомеров или небольших молекул (например, см. Lam, 1997, *Anticancer Drug Design* 12: 145).

“Небольшие молекулы” в настоящем описании относятся к таким соединениям, у которых молекулярная масса составляет менее 5 кД и наиболее предпочтительно менее 4 кД. Небольшие молекулы могут представлять собой, к примеру, нуклеиновые кислоты, пептиды, полипептиды, пептидомиметики, углеводы, липиды и другие органические или неорганические молекулы. В данной области известны библиотеки химических и/или биологических смесей типа экстрактов грибов, бактерий или водорослей, которые можно подвергать скринингу любым из способов по изобретению.

Примеры методов синтеза молекулярных библиотек можно найти, к примеру, в: DeWitt et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909; Erb et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422; Zuckermann et al., 1994, *J. Med. Chem.* 37: 2678; Cho et al., 1993, *Science* 261: 1303; Carrell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; и Gallop et al., 1994, *J. Med. Chem.* 37: 1233.

Библиотеки соединений могут быть представлены в растворе (например, см. Houghten, 1992, *Biotechniques* 13: 412-421) или на шариках (см. Lam, 1991, *Nature* 354: 82-84), на чипах (см. Fodor, 1993, *Nature* 364: 555-556), бактериях (см. U.S. Patent No. 5,223,409), спорах (см. U.S. Patent 5,233,409), плаزمидах (см. Cull et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869) или фагах (см. Scott and Smith, 1990, *Science* 249: 386-390; Devlin, 1990, *Science* 249: 404-406; Cwirla et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6378-6382; Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 301-310; и U.S. Patent No. 5,233,409).

В одном воплощении в комплекс антитело-антиген вносится соединение-кандидат и определяется, будет ли соединение-кандидат разрушать комплекс антитело-антиген, причем разрушение этого комплекса означает, что соединение-кандидат модулирует сигнальную функцию CD47 и/или взаимодействие CD47 с SIRP α . В другом воплощении вносится растворимый CD47 и/или CD47 и белок SIRP α по изобретению и проводится обработка по меньшей мере одним нейтрализующим моноклональным антителом.

Детектируется образование комплекса антитело-антиген и к этому комплексу вносится одно или несколько соединений-кандидатов. Если комплекс антитело-антиген разрушается после внесения одного или нескольких соединений-кандидатов, то соединения-кандидаты применимы для лечения расстройств, связанных с нарушением сигнализирования CD47 и/или CD47-SIRP α .

Определение способности тестируемого соединения нарушать или разрушать комплекс антитело-антиген может осуществляться, к примеру, путем конъюгирования тестируемого соединения с радиоизотопной или ферментной меткой таким образом, чтобы можно было определить связывание тестируемого соединения с антигеном или его биологически активной частью путем выявления меченого соединения в комплексе. Например, можно пометить тестируемые соединения ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C или ^3H , прямо или косвенно, и детектировать радиоизотоп путем прямого измерения радиоизлучения или на сцинтилляционном счетчике. С другой стороны, можно пометить тестируемые соединения ферментом, к примеру, пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой, люциферазой, и детектировать ферментную метку по превращению соответствующего субстрата в продукт.

В одном воплощении способ анализа включает контактирование комплекса антитело-антиген с тестируемым соединением и определение способности тестируемого соединения взаимодействовать с антигеном или иным образом разрушать существующий комплекс антитело-антиген. В этом воплощении определение способности тестируемого соединения взаимодействовать с антигеном и/или разрушать комплекс антитело-антиген включает определение способности тестируемого соединения к предпочтительному связыванию с антигеном или его биологически активной частью по сравнению с антителом.

В другом воплощении способ анализа включает контактирование комплекса антитело-антиген с тестируемым соединением и определение способности тестируемого соединения модулировать комплекс антитело-антиген. Определение способности тестируемого соединения модулировать комплекс антитело-антиген может осуществляться, к примеру, по способности антигена к связыванию или взаимодействию с антителом в присутствии тестируемого соединения.

Специалистам должно быть понятно, что в любом из изложенных здесь способов скрининга антитело может быть нейтрализующим антителом, которое модулирует или иным образом нарушает активность и/или сигнализирование CD47.

Изложенные здесь способы скрининга могут выполняться в виде клеточного метода или бесклеточного метода анализа. В бесклеточных методах по изобретению

можно использовать CD47 и его фрагменты как в растворимой форме, так и в мембраносвязанной форме. В случае бесклеточного метода с использованием мембраносвязанной формы CD47 для поддержания мембраносвязанной формы белка в растворе может понадобиться солюбилизирующее средство. Примеры таких солюбилизирующих средств включают неионные детергенты, такие как N-октилглюкозид, N-додецилглюкозид, N-додецилмальтозид, октаноил-N-метилглюкамид, деканоил-N-метилглюкамид, Triton[®] X-100, Triton[®] X-114, Thesit[®], изотридецилполи(этиленгликолевый эфир)_n, N-додецил-N,N-диметил-3-аммоний-1-пропансульфонат, 3-(3-холамидопропил)диметиламмоний-1-сульфонат (CHAPS) или 3-(3-холамидопропил)диметиламмоний-2 гидроксид-1-сульфонат (CHAPSO).

Более чем в одном воплощении может потребоваться иммобилизовать либо антитело, либо антиген, чтобы облегчить отделение комплексированных форм от некомплексированных форм одного из них или обоих после внесения соединения-кандидата, а также для удобства автоматизации анализа. Наблюдение за комплексом антитело-антиген в присутствии и в отсутствие соединения-кандидата может осуществляться в любом сосуде, подходящем для содержания реагентов. Примеры таких сосудов включают микропланшеты, пробирки и микроцентрифужные пробирки. В одном воплощении может быть представлен слитый белок, в котором добавлен домен, позволяющий одному или обоим белкам связываться с матриксом. Например, можно адсорбировать слитые белки GST-антитело или GST-антиген на бусинах глутатион-сефарозы (Sigma Chemical, St. Louis, MO) или дериватизированных глутатионом микропланшетах, в которые затем вносится тестируемое соединение, а смесь инкубируется в условиях, способствующих образованию комплекса (например, при физиологических условиях для соли и pH). После инкубации бусины или лунки микропланшета промывают для удаления несвязанных компонентов, иммобилизуют матрикс в случае бусин и определяют комплекс прямо или косвенно. С другой стороны, можно отделить комплексы от матрикса и определить степень образования комплекса антитело-антиген по стандартной методике.

В способах скрининга по изобретению можно использовать и другие методы иммобилизации белков на матриксе. Например, можно иммобилизовать антитело (например, антитело 2A1 или антитело, у которого переменная область тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO: 5-30 и переменная область легкой цепи выбрана из SEQ ID NO: 31-47) либо антиген (например, белок CD47) посредством конъюгации биотина и стрептавидина. Биотинилированные молекулы антитела или антигена можно получить из биотина-NHS (N-гидроксисукцинимид) по хорошо известным методикам (например, с

помощью набора для биотинилирования, Pierce Chemicals, Rockford, IL) и иммобилизовать в покрытых стрептавидином лунках 96-луночного планшета (Pierce Chemical). С другой стороны, в лунках планшета можно фиксировать другое антитело, реагирующее с данным антителом или антигеном, но не мешающее образованию нужного комплекса антитело-антиген, а несвязавшееся антитело или антиген остается в лунках при конъюгации с антителом. Методы определения таких комплексов, наряду с описанными выше для GST-иммобилизованных комплексов, включают иммунодетектирование комплексов с помощью таких других антител, реагирующих с антителом или антигеном.

Изобретение также имеет отношение к новым средствам, идентифицированным с помощью любого из вышеприведенных способов скрининга, а также к применению их для лечения, как описано здесь.

Препараты для диагностики и профилактики

Моноклональные антитела к CD47 по изобретению применяются в препаратах для диагностики и профилактики. В одном воплощении моноклональные антитела к CD47 по изобретению вводятся пациентам, подверженным риску возникновения одного или нескольких из вышеприведенных заболеваний, таких, к примеру, но без ограничения, как рак или другие неопластические состояния. Предрасположенность пациента или органа к одному или нескольким из вышеприведенных раковых заболеваний или других неопластических состояний можно определить с помощью генотипических, серологических или биохимических маркеров.

В другом воплощении изобретения антитела к CD47 вводятся лицам при диагностике клинических показателей, связанных с одним или несколькими из вышеприведенных заболеваний, таких, к примеру, но без ограничения, как рак или другие неопластические состояния. После постановки диагноза антитела к CD47 вводятся для того, чтобы ослабить или обратить эффекты клинических показаний, связанных с одним или несколькими из вышеприведенных заболеваний.

Антитела по изобретению также могут применяться при детектировании CD47 и/или SIRP α в образцах пациентов, соответственно, они применимы в качестве средств диагностики. Например, антитела к CD47 по изобретению применимы при *анализах in vitro*, например, методом ELISA, для определения уровня CD47 и/или SIRP α в образцах пациентов.

В одном воплощении антитело к CD47 по изобретению фиксируют на твердом носителе (например, в лунках микропланшета). Иммобилизованное антитело работает в качестве захватывающего антитела для того CD47 и/или SIRP α , который может присутствовать в исследуемом образце. Перед контактированием иммобилизованного

антитела с образцом пациента твердый носитель промывают и обрабатывают блокирующим агентом типа молочного белка или альбумина, чтобы предотвратить неспецифическую адсорбцию анализируемого вещества.

После этого в лунки вносят исследуемые образцы, предположительно содержащие антиген, или растворы, содержащие стандартное количество антигена. Такие образцы, например, образцы сыворотки от субъектов, у которых предполагается такой уровень циркулирующего антигена, который считается признаком патологии. После отмывания от исследуемого образца или стандарта твердый носитель обрабатывают вторым антителом, содержащим детектируемую метку. Меченое второе антитело служит детектирующим антителом. Измеряется уровень детектируемой метки и определяется концентрация CD47 и/или SIRPα в исследуемом образце при сравнении со стандартной кривой, составленной по стандартным образцам.

Следует иметь в виду, что на основе результатов, полученных с помощью антител к CD47 по изобретению при диагностике *in vitro*, можно определить стадию заболевания (например, клинический показатель, связанный с ишемией, аутоиммунным или воспалительным заболеванием) у субъекта, исходя из уровня экспрессии CD47 и/или SIRPα. При данном заболевании берутся образцы крови у субъектов с диагнозом на разных стадиях течения заболевания и/или в различных точках при терапевтическом лечении болезни. Используя популяцию образцов, дающую статистически значимые результаты для каждой стадии течения заболевания или терапии, составляются диапазоны концентраций антигена, которые можно считать характерными для каждой стадии.

Все публикации и патентные документы, цитируемые здесь, включены сюда путем ссылки, как если бы каждая такая публикация или документ были конкретно и индивидуально указаны как включенные сюда путем ссылки. Цитирование публикаций и патентных документов не означает признания того, что они относятся к предшествующему уровню техники, а также не содержит никаких допущений относительно их содержания или даты. После изложения настоящего изобретения в виде письменного описания специалистам должно быть понятно, что изобретение может применяться на практике в различных воплощениях, а предшествующее описание и приведенные ниже примеры представлены для иллюстрации, а не для ограничения формулы изобретения, которая следует далее.

ПРИМЕРЫ

Нижеследующие примеры, включая проведенные эксперименты и полученные результаты, приводятся только для иллюстрации и не должны восприниматься как

налагающие ограничения на настоящее изобретение.

Пример 1. Получение и отбор антител к CD47

Антитела к CD47 получали при иммунизации мышей рекомбинантным белком, представляющим собой CD47-IgV (типа варибельного домена иммуноглобулина), по модифицированной стратегии быстрой иммунизации по нескольким участкам (Kilpatrick et al. (1997) Rapid development of affinity matured monoclonal antibodies using RIMMS. *Hybridoma* 16, 381-389). Кроме того, половина мышей в иммунизированной группе получала однократную инъекцию антитела-агониста против G1TR мыши – DTA-1. После процедуры иммунизации у всех мышей (получавших и не получавших DTA-1) извлекали и разделяли лимфатические узлы, после чего выделяли В-клетки и проводили слияние их с клетками миеломной линии мыши. Супернатанты гибридом подвергали скринингу на связывание с CD47 методом ELISA и методом проточной цитометрии на клетках Daudi (ATCC# CCL-213) (фиг. 1A). Супернатанты гибридом также подвергали анализу на их способность блокировать взаимодействие CD47-SIRP α (фиг. 1B). На микропланшетах Medisorp (NUNC) фиксировали рекомбинантный CD47, а затем инкубировали с супернатантами гибридом в присутствии рекомбинантного SIRP α -ECD человека, слитого с Fc-доменом IgG человека. Связавшийся SIRP α детектировали с помощью конъюгированного с HRP специфичного к Fc вторичного антитела против IgG человека (Jackson ImmunoResearch), измеряя поглощение при 650 нм на считывающем устройстве.

Пример 2. Характеристика антител к CD47

Типичные мышьи антитела к CD47 по настоящему изобретению представлены на фиг. 2. Ранжирование блокирующих SIRP α антител по сродству к CD47 проводили методом проточной цитометрии на клетках Raji (ATCC# CCL-86) (фиг. 2A) и CCRF-CEM (ATCC# CCL-119) (фиг. 2B). Связавшиеся антитела к CD47 детектировали с помощью конъюгированного с FITC вторичного антитела против IgG мыши (Jackson ImmunoResearch). В качестве положительного контроля включали известное антитело к CD47 – B6H12 (например, см. U.S. Patent 5,057,604). На фиг. 2B представлено сравнение B6H12 и коммерческого не блокирующего SIRP α антитела – 2D3 с полученными нами антителами. Антитела настоящего изобретения проявляют большее сродство к эндогенной форме CD47 (на клеточной поверхности), чем антитела B6H12 и 2D3.

Пример 3. Блокирование SIRP α антителами к CD47

Активность блокирования SIRP α антителами к CD47 измеряли методом ELISA, при этом на микропланшетах Medisorp фиксировали рекомбинантный CD47-IgV с His-тегом. Детектировали связывание рекомбинантного SIRP α , слитого с Fc-доменом IgG человека, в присутствии возрастающих количеств антител к CD47. Связавшийся SIRP α определяли с

помощью конъюгированного с HRP вторичного антитела (специфичного к Fc) против IgG человека (Jackson ImmunoResearch). Антитела настоящего изобретения проявляют большую активность блокирования SIRP α , чем антитело В6Н12. Репрезентативные данные по блокированию SIRP α методом ELISA представлены на фиг. 3А.

Антитела к CD47 подвергали анализу методом проточной цитометрии на их способность блокировать связывание рекомбинантного SIRP α с CD47 на поверхности клеток. В качестве источника CD47 при анализе использовали клетки CCRF-CEM (ATCC# CCL-119) и определяли связывание рекомбинантного SIRP α , слитого с Fc-доменом IgG человека, в присутствии возрастающих количеств антител к CD47. Связавшийся SIRP α определяли с помощью конъюгированного с APC вторичного антитела (специфичного к Fc) против IgG человека (Jackson ImmunoResearch) (фиг. 3В). В качестве положительного и отрицательного контроля использовали В6Н12 и коммерческое не блокирующее SIRP α антитело 2D3 к CD47, соответственно.

Пример 4. Опосредованные антителами к CD47 гомотипические взаимодействия

Блокирующие SIRP α антитела к CD47 подвергали анализу на их способность вызывать агрегацию клеток, что известно как гомотипические взаимодействия между CD47-положительными клетками. В качестве пробных экспрессирующих CD47 линий клеток использовали клетки Daudi и Raji. Из всех исследованных антител только антитело 2A1 по настоящему изобретению было единственным блокирующим SIRP α антителом, не вызывавшим гомотипических взаимодействий между экспрессирующими CD47 клетками.

Пример 5. Гемагглютинирующая активность антител к CD47

Одним из примеров гомотипических взаимодействий является гемагглютинация, которая проявляется в виде агрегации эритроцитов (RBC). Антитела к CD47 подвергали скринингу на агглютинацию RBC, которую отмечали по способности антител предотвращать оседание RBC человека. Вне ожидания, антитело 2A1 оказалось уникальным среди других антител к CD47 по его неспособности вызывать гемагглютинацию, хотя оно и обладает высоким сродством и способностью блокировать SIRP α . Другие антитела, которые проявляли пониженную гемагглютинацию, не блокировали связывание SIRP α с CD47.

Для оценки гемагглютинирующей способности антител к CD47 эритроциты (RBC) человека разводили до 10% в PBS и инкубировали при 37°C в течение 2-6 часов с титрованием антител к CD47 на круглом 96-луночном планшете. Гемагглютинация проявляется наличием не оседающих RBCs, что выглядит как помутнение в отличие от красных пятнышек у неагглютинированных RBCs. Вне ожидания, как видно из фиг. 4А,

антитела к CD47 по изобретению, в особенности антитело, которое здесь именуется как 2A1, не проявляли гемагглютинирующей активности. На графике представлено количественное определение гемагглютинации в виде “индекса гемагглютинации”, который определяется по измерению площади осадка RBC в присутствии антитела относительно таковой в отсутствие антитела.

Мышиное антитело 9E4 вызывало самую сильную гемагглютинацию при всех исследованных концентрациях. Антитело 9E4 связывается с CD47 и блокирует взаимодействие CD47 с SIRP α ; тем не менее, оно вызывает сильную гемагглютинацию.

Ниже представлена область V_H антитела 9E4:

EVQLRQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYMYWVKQSRVRS_{LAWIGRINPYTGATGYDQNFKDKASLIVDKSSS}
TAYMELRSLTSEDSAVYYCARGRNR_{YDGFAYWGQGLVTV} (SEQ ID NO: 78) .

Ниже представлена область V_L антитела 9E4:

EQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYT_{SRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISN}
LDQEDIATYFCQQGNALPPTFGGGTNLEIK (SEQ ID NO: 79) .

Контрольное антитело B6H12 вызывало гемагглютинацию, как и следует ожидать от блокирующих SIRP α антител к CD47.

Для того чтобы исследовать уникальность отсутствия гемагглютинирующей активности у антитела 2A1, различные другие антитела к CD47 подвергали скринингу на гемагглютинацию RBC (фиг. 4B). При этом включали химерный вариант антитела 2A1 (2A1-xi), состоящий из мышинной вариабельной области тяжелой цепи 2A1, мышинной вариабельной области легкой цепи 2A1, модифицированной по аминокислоте 106 (т.е. M106I), и константных областей IgG1 и каппа-цепи Ig человека. Последовательности участков V_H и V_L антитела 2A1 и антитела 2A1-xi представлены в табл. 1. Антитела тестировали при 12,5, 25, 50 и 100 нМ. Вне ожидания, 2A1 оказалось уникальным среди исследованных антител к CD47 на фиг. 4B в том, что это было единственное антитело на фиг. 4B с отсутствием или с пониженной гемагглютинирующей активностью. Из фиг. 4E видно, что 2A1, химерное антитело 2A1 (2A1-xi) и гуманизированные варианты не вызывают гемагглютинации.

На фиг. 4C представлены результаты скрининга других антител к CD47 на гемагглютинацию RBC. Как видно из фиг. 4C, коммерческое моноклональное антитело 2D3 к CD47, которое не блокирует SIRP α , не вызывало гемагглютинации. Однако другие коммерческие антитела к CD47 (например, CC2C6, BRC126 и B6H12), которые блокируют SIRP α , вызывали гемагглютинацию (фиг. 4C). Таким образом, существовавшие до настоящего изобретения антитела, блокирующие SIRP α , вызывают гемагглютинацию,

тогда как существующие антитела типа 2D3, не блокирующие SIRP α , не вызывают гемагглютинации. Итак, антитела по изобретению (например, антитело 2A1 и его гуманизированные производные) уникальны среди существующих антител к CD47 по своей способности блокировать SIRP α , но неспособности вызывать гемагглютинации.

Отдельные антитела к CD47 тестировали еще раз на гемагглютинацию в диапазоне высоких концентраций (фиг. 4D). При этом у B6H12 и 9E4 проявлялся эффект прозоны, при котором гемагглютинация уменьшалась при самых высоких и самых низких концентрациях исследуемого диапазона. При нанесении на график индекса гемагглютинации также проявляется эффект прозоны. Эффект прозоны также виден на фиг. 4C и 4E. Важно отметить, что мышиное антитело 2A1 и химерное антитело 2A1 к CD47 не обладали гемагглютинирующей активностью при всех концентрациях.

Как видно из фиг. 4E, мышиное антитело 1B4 проявляло гемагглютинацию в узком диапазоне.

Ниже представлена область V_H антитела 1B4:

QIQQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTF^TFDYYIH^WVKQ^RPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNERFKGKATLTVATSSS
TAYMQLSSLTSEDTAVYFCARREEDYFDYWGQGLTVTV (SEQ ID NO: 80).

Ниже представлена область V_L антитела 1B4:

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLTWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF
TLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 81).

Тестировали гемагглютинирующую активность гуманизированных антител, полученных из мышиное 2A1, как описано выше. Важно, что репрезентативное гуманизированное антитело AB6.12 в различных изотипах IgG человека (IgG1, IgG4-S228P и IgG4-S228P/L235E) совсем не вызывало гемагглютинации RBC. В качестве контроля для не вызывающих гемагглютинации антитела включали 2A1 и 2A1-xi, а в качестве положительного контроля на гемагглютинацию включали B6H12 и 9E4 (фиг. 4F).

Пример 6. Связывание с CD47 яванской макаки

Исследовали способность мышиное 2A1 к связыванию с CD47 яванской макаки (суно). Ранее сообщалось, что антитело B6H12 перекрестно реагирует с CD47 макаки и использовалось в качестве положительного контроля на присутствие CD47 макаки при определении. Эксперимент по измерению связывания 2A1 с CD47 яванской макаки заключался в сравнении связывания 2A1 с CD47 на В-клетках яванской макаки и клетках человека, причем в качестве CD47-положительных клеток человека использовали клетки линии Raji. Из цельной крови макаки выделяли мононуклеары периферической крови (PBMCs) макаки центрифугированием в градиенте Ficoll-раque. В-клетки макаки и

человека (Raji) метили с помощью антитела офатумумаб (Arzerra) к CD20 человека при 10 мкг/мл и инкубировали с серийными разведениями мышиноного антитела 2A1 или B6H12 к CD47. Помеченные антителом к CD20 человека В-клетки детектировали с помощью поликлонального антитела против IgG человека, конъюгированного с DyLite 649, а мышинные антитела к CD47 детектировали с помощью поликлонального антитела против IgG мыши, конъюгированного с DyLite 488. Клетки анализировали методом проточной цитометрии, сначала засекая живые клетки по FSC и SSC, а затем клетки, положительные по FL4 (положительные по CD20), после чего измеряли промежуточную FL1 (положительные по CD47). Данные нормализовали путем деления сигнала при каждой концентрации на максимальный сигнал для каждого антитела по каждой популяции клеток. Нормализованные результаты, приведенные на фиг. 5, свидетельствуют, что 2A1 дает перекрестную реакцию с CD47 макаки и обладает таким же сродством, как и к CD47 человека. В согласии с вышеприведенными результатами, антитело B6H12 обладало меньшим сродством к CD47 на клеточной поверхности у клеток Raji и В-клеток макаки по сравнению с антителами настоящего изобретения.

Пример 7. Создание химерных антител

Для того чтобы установить последовательности переменных областей тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей мышиноного антитела 2A1, выделяли рибонуклеиновую кислоту (RNA) из гибридомы и использовали её при полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) (набор Phusion RT-PCR Kit, Thermo Scientific) для получения первой нити кДНК. При ПЦР использовали набор вырожденных праймеров, охватывающих весь репертуар лидерных последовательностей V_H и V_L мышинных антител, а в качестве матрицы служила первая нить кДНК.

Ниже приведены прямые праймеры (для лидеров IgG мыши).

Название	Последовательность
VH1-1	CACTGCAGGTRTCCACTCC (SEQ ID NO: 82)
VH1-2	CATAGCAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 83)
VH1-3	CRCTACAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 84)
VH1-4	GCYACAGMTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 85)
VH1-5	CACTGCAGGTGTCCWMTCC (SEQ ID NO: 86)
VH1-6	CRCTRCAGGTGTKCACTCC (SEQ ID NO: 87)
VH1-7	GCTAWMGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 88)
VH1-8	CSTCAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 89)
VH1-9	GCTACAGGTGCTCACTCC (SEQ ID NO: 90)
VH1-10	CACTGCAGGTGTCSSTCTCT (SEQ ID NO: 91)
VH1-11	CAVTGCAGGTGTCCAYTGC (SEQ ID NO: 92)

VH1-12 GCTAMMGGTGTCCACTTC (SEQ ID NO: 93)
 VH1-13 CTCCTGTCAKTAACKCAGGT (SEQ ID NO: 94)
 VH1-14 CAACTGCAGGTGTCTCTCT (SEQ ID NO: 95)
 VH1-15 CRCTRCAGGYGTCCACTCT (SEQ ID NO: 96)
 VH2-1 CCAAGCTGTATCCTTTCC (SEQ ID NO: 97)
 VH2-2 CCAAGCTGTGTCCTRTCC (SEQ ID NO: 98)
 VH3-1 CTTGACAGYCVTTCCGGT (SEQ ID NO: 99)
 VH3-2 CTTACAGCCTTTCCCTGGT (SEQ ID NO: 100)
 VH4 CTTAAAAGGGGTCCAGTGT (SEQ ID NO: 101)
 VH5-1 CAYTTTAAAARGTGTTCMAGTGT (SEQ ID NO: 102)
 VH5-2 GTTTTAAAAGGTGTCCTGTG (SEQ ID NO: 103)
 VH6 CTYTTAAAAGGKGTCCAGWG (SEQ ID NO: 104)
 VH7-1 CYTTTAMATGGTATCCAGTGT (SEQ ID NO: 105)
 VH7-2 CTTTTACATGGTTTCAAGTGT (SEQ ID NO: 106)
 VH8 GTCCCTGCATATGTCYT (SEQ ID NO: 107)
 VH9 GATGGCAGCWGCYCAAAG (SEQ ID NO: 108)
 VH10 STATCAAGGTGTGCATTGT (SEQ ID NO: 109)
 VH11 CTTTTAAAAGWTGTCCAGKGT (SEQ ID NO: 110)
 VH12 GTGACAGTCCTTCCTGGTAG (SEQ ID NO: 111)
 VH14 CTTCCCTGATGGCAGTGGTT (SEQ ID NO: 112)
 VH15 GCTACAGGTATCCAATCC (SEQ ID NO: 113)

Ниже приведен обратный праймер (для константной области IgG мыши).

Название	Последовательность
HC-Rev	GCGTCTAGAAAYCTCCACACACAGRRCCAGTGGATAGAC (SEQ ID NO: 114)

Ниже приведены прямые праймеры (для лидеров каппа-цепи Ig мыши).

Название	Последовательность
VK1-1	CTGWTGTTCTGGATTCCTG (SEQ ID NO: 115)
VK1-2	GGTCAGACAGTCAGCAGT (SEQ ID NO: 116)
VK2	GTGCTCTGGATTCGGGAA (SEQ ID NO: 117)
VK4/5-1	CAGCTTCYTGCTAATCAGTG (SEQ ID NO: 118)
VK4/5-2	СТААТCAGTGCTTCAGGA (SEQ ID NO: 119)
VK8-1	GTGGGTATCTGGTRCSTGTG (SEQ ID NO: 120)
VK8-2	GGAAATTTAAAAGTACCTGTGGG (SEQ ID NO: 121)
VK9A/9B-1	GGTTTCMAGGTRCCAGATGT (SEQ ID NO: 122)
VK9A/9B-2	CTCTGGTTYCCAGGTATC (SEQ ID NO: 123)
VK10	CTGTTTTCAAGGTRCCAGATGT (SEQ ID NO: 124)

VK11	GTTGTAATGTCCAGAGGA (SEQ ID NO: 125)
VK12/13-1	CTTACAGGTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 126)
VK12/13-2	CTCAATTGTAGRTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 127)
VK12/13-3	CACAGTAGGTGTCAGATGT (SEQ ID NO: 128)
VK12/13-4	GTCGTAGTTGTCAGATGT (SEQ ID NO: 129)
VK12/13-5	CCTCCTTCTTGGCCAAGA (SEQ ID NO: 130)
VK19/28-1	CTTATATGGAGCTGATGGG (SEQ ID NO: 131)
VK19/28-2	GTGTCTGGTGCTCATGGG (SEQ ID NO: 132)
VK19/28-3	CTSTGGTTGTCTGGTGTGA (SEQ ID NO: 133)
VK20	GTCTCTGATTCTAGGGCA (SEQ ID NO: 134)
VK21-1	CTKCKCTGGGTTCCAG (SEQ ID NO: 135)
VK21-2	GCAGGTGTTGACGGA (SEQ ID NO: 136)
VK22-1	CAGGTGCCTCGTGAC (SEQ ID NO: 137)
VK22-2	CTCTGGTGCCTGTGCA (SEQ ID NO: 138)
VK23	CTGGAYTYCAGCCTCCAGA (SEQ ID NO: 139)
VK24/25-1	GWTCTCTRGAGTCAGTGGG (SEQ ID NO: 140)
VK24/25-2	CTGGATCCCTGGAKCYACT (SEQ ID NO: 141)
VK32	GTTCTGCTTTTGTAGGTGTG (SEQ ID NO: 142)
VK33/34	GATCCCAGGCATGATATGT (SEQ ID NO: 143)
VK31/38C	CTTCATGGTGCTCAGTGT (SEQ ID NO: 144)
VKRF	CCATATCAGGTGCCAGTGT (SEQ ID NO: 145)

Ниже приведен обратный праймер (для константной области каппа-цепи Ig мыши).

Название	Последовательность
LC-Rev	GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG (SEQ ID NO: 146)

После амплификации V_H and V_L клонировали в одной рамке считывания в вектора, содержащие соответствующие последовательности секретиции антител и константные области IgG1 и каппа-цепи Ig человека, соответственно, получая химерные конструкции из ДНК мыши:человека. Этими конструкциями совместно трансфецировали клетки 293 Freestyle (Life Technologies) и очищали полученные антитела из супернатантов культур клеток методом хроматографии с белком А. Для проверки того, что были установлены правильные последовательности V_H и V_L , химерное антитело 2A1 (обозначенное 2A1-хi) сравнивали с исходным мышинным антителом 2A1 по связыванию с CD47 методом проточной цитометрии на клетках Raji (фиг. 6). При этом в качестве положительного контроля также включали B6H12. Связавшееся антитело 2A1-хi детектировали с помощью конъюгированного с FITC вторичного антитела против IgG человека. Связавшиеся

антитела 2A1 и B6H12 детектировали с помощью конъюгированного с FITC вторичного антитела против IgG мыши. Кажущееся сродство определяли посредством нелинейной аппроксимации (программа Prism Graphpad) по усредненной интенсивности флуоресценции при различных концентрациях антител (табл. 2). Антитело 2A1- χ i обладало таким же сродством к CD47 на клеточной поверхности, что и мышинное антитело 2A1, свидетельствуя о том, что последовательности V_H и V_L были установлены правильно.

Таблица 2

	K_D (кажущаяся) (нМ)	Станд. ошибка	R^2
2A1-mIgG1	93,6	$\pm 10,1$	0,9977
2A1- χ i	78,0	$\pm 14,9$	0,9922
B6H12	3786	± 310	0,9998

Пример 8. Гуманизация антител

Мышиное антитело 2A1 к CD47 подвергали гуманизации, чтобы уменьшить возможную иммуногенность при введении больным людям. Последовательности областей V_H и V_L в 2A1 сравнивали с последовательностями антител человека в банке данных IMGT. После этого создавали структурную модель областей V_H и V_L в 2A1, используя структуры наиболее близких гуманизированных и человеческих антител в Банке данных по белкам (PDB). В тяжелых и легких цепях антитела 2A1 фиксировали 3 определяющих комплементарность участка (CDR), а каркасные участки мыши заменяли на различные каркасные участки человека, обладающие наибольшей вероятностью сохранения правильной ориентации участков CDR. Методом синтеза генов создавали конструкции, соответствующие каждому из гуманизированных вариантов 2A1, и клонировали их в одной рамке считывания в вектора, содержащие соответствующие последовательности секрети и константные области IgG1 и каппа-цепи Ig человека. Различные комбинации гуманизированных тяжелых и легких цепей подвергали совместной трансфекции в клетки 293 Freestyle (Life Technologies) и очищали полученные антитела из супернатантов клеточных культур методом хроматографии с белком А.

Гуманизированные антитела тестировали на их способность связываться с клетками Raji методом проточной цитометрии (фиг. 7). При этом в качестве контроля по большей части использовали антитело 2A1- χ i, служившее эталоном при определении сродства связывания. Гуманизированные антитела подвергали дальнейшей оптимизации для усиления экспрессии и уменьшения проблемных сайтов, в том числе потенциальных сайтов изомеризации и дезамидирования. Одно из оптимизированных гуманизированных антител, происходящих из мышинного антитела 2A1, обозначено как антитело AB6.12, которое проявляет очень близкое сродство связывания, как у антитела 2A1- χ i (фиг. 7H;

табл. 3). Кажущееся сродство определяли посредством нелинейной аппроксимации (программа Prism Graphpad) по усредненной интенсивности флуоресценции при различных концентрациях антител.

Таблица 3

	K_D (кажущаяся) (пМ)	Станд. ошибка	R²
2A1-xi	36,4	±8,54	0,9908
AB6.12	39,9	±5,54	0,9964

Антитело AB6.12 впоследствии преобразовывали из изогиа IgG1 в другие изогиа IgG человека путем замены константного домена тяжелой цепи. Как видно из фиг. 7I, изменение изогиа IgG на стабилизированный по шарнирному участку вариант IgG4 (IgG4P: S228P) и на стабилизированный по шарниру вариант IgG4 с ослабленным связыванием с Fc-рецептором (IgG4PE: S228P/L235E) не вызывало изменения сродства связывания гуманизированных антител с CD47 на клеточной поверхности (фиг. 7I; табл. 4). Кажущееся сродство определяли посредством нелинейной аппроксимации (программа Prism Graphpad) по усредненной интенсивности флуоресценции при различных концентрациях антител.

Таблица 4

	K_D (кажущаяся) (пМ)	Станд. ошибка	R²
AB6.12-IgG1	38,6	±10,5	0,9798
AB6.12-IgG4P	35,7	±8,4	0,9841
AB6.12-IgG4PE	34,6	±10,9	0,9727

В процессе гуманизации антитела к CD47 тестировали, проверяя, сохраняется ли у них способность к блокированию SIRPα. Как видно из фиг. 7J, несколько изогиа IgG гуманизированного антитела AB6.12 блокировали взаимодействие SIRPα:CD47 при анализе методом проточной цитометрии, описанным выше в Примере 3. Примеры антител к CD47 и соответствующих областей V_H и V_L у них включают антитела, представленные в табл. 1.

В процессе гуманизации было установлено, что в некоторых воплощениях у описанных здесь антител к CD47 для связывания важен аминокислотный мотив "NA" в начале участка CDR3 V_H (SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 77). В некоторых воплощениях, в отсутствие аминокислотных остатков "NA" в начале участка CDR3 V_H (SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 77) антитела к CD47 по изобретению не связываются со своей мишенью или связываются с мишенью с меньшим сродством, чем в присутствии аминокислотных остатков "NA". Например, когда мотив "NA" заменяли на более канонический мотив

“AR” или “AT,” то связывание значительно уменьшалось (т.е. более чем в 10 раз). В других воплощениях, в отсутствие аминокислотных остатков “NA” в начале участка CDR3 V_H (SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 77) антитела к CD47 по изобретению связываются со своей мишенью с эквивалентным сродством, как при связывании в присутствии аминокислотных остатков “NA”.

Специалистам должно быть известно, что можно без излишнего экспериментирования определить, может ли аминокислотная замена в последовательности антител по изобретению дать антитело с практически такой же функцией, например, антитело к CD47 со способностью блокировать SIRP α и не вызывающее существенной гемагглютинации.

На фиг. 8A приведен снимок записи при эксклюзионной хроматографии на установке АКТА FLPC с колонкой Superdex 200. Представлены варианты антитела AB6.12 типа IgG1, IgG4P и IgGPE. Все три варианта мономерны более чем на 98%. На фиг. 8B представлена фотография окрашенного Coomassie Blue геля при SDS-PAGE различных гуманизированных вариантов 2A1 в восстановительных (R) и невосстановительных (NR) условиях.

Пример 9. Антитела к CD47 усиливают фагоцитоз клеток опухолевых линий

CD47 представляет собой рецептор на клеточной поверхности, который подвергается повышающей регуляции на опухолевых клетках, а также способствует иммунному избеганию посредством взаимодействия со своим природным лигандом SIRP α . Связывание CD47 с SIRP α на макрофагах приводит к снижению активности фагоцитоза. Как подробно описано ниже, было установлено, что при связывании CD47 и блокировании SIRP α антителом 2A1 и его вариантами усиливается фагоцитоз опухолевых клеток в присутствии макрофагов человека.

Из крови человека выделяли PBMCs, а моноциты подвергали дифференцировке в макрофаги путем инкубации их в среде AIM-V (Life Technologies) в течение 7 дней. Эти происходящие из моноцитов макрофаги (MDMs) прикрепляются, что позволяет смыть другие клетки. MDMs соскребали, пересеивали на 12-луночные чашки и оставляли для прикрепления на 24 часа. В качестве клеток мишени была выбрана линия опухолевых клеток CCRF-CEM человека из-за высокого уровня экспрессии в них CD47. Клетки CCRF-CEM метили при 0,3 мкМ CFSE при 37°C в течение 15 мин, затем отмывали и добавляли к MDMs в соотношении 4 раковые клетки на 1 фагоцит, а затем добавляли антитела к CD47 при различных концентрациях. Проводили фагоцитоз клеток мишени в течение 3 часов. После этого не подвергшиеся фагоцитозу клетки мишени смывали с помощью PBS. Оставшиеся фагоциты соскребали, проводили окрашивание с помощью

конъюгированного с DyLite 649 (Biolegend) антитела к маркеру макрофагов CD14 и анализировали методом проточной цитометрии. Фагоцитоз измеряли, засекая живые клетки, положительные по FL4 (CD14+), а затем определяли процент положительных по FL1 (CFSE+) клеток.

Из фиг. 9 видно, что антитело 2A1 к CD47 и его гуманизированные варианты проявляли дозозависимое усиление фагоцитоза клетками MDMs. Антитело 2A1 и его гуманизированный вариант AB2.05 оказались уникальными по своей способности вызывать фагоцитоз опухолевых клеток при 66,7 пМ, тогда как B6H12 не обладало активностью при этой концентрации (фиг. 9A). Из фиг. 9B видно, что 2A1 и гуманизированные варианты AB2.05, AB6.12-IgG1, AB6.12-IgG4P и AB6.12-IgG4PE все вызывают максимальный уровень фагоцитоза при 0,3 мкг/мл или 2 нМ, тогда как для B6H12 требуются более высокие концентрации. Эти данные свидетельствуют о том, что антитело 2A1 к CD47 (и полученные из него гуманизированные варианты) вызывают опосредованный макрофагами фагоцитоз CD47-положительных опухолевых клеток. В этом примере в качестве CD47-положительных клеток мишени использовались клетки CCFR-CEM.

Пример 10. Противоопухолевая активность антител к CD47

Противоопухолевую активность мышиных антител к CD47 оценивали на модели лимфомы Raji. Клетки Raji имплантировали подкожно мышам NOD/SCID, которых случайным образом разбивали на 5 групп (по 10 мышей на группу, день 0). Группа 1: носитель (только буфер); группа 2: B6H12 (положительный контроль); группа 3: 1B4; группа 4: 2A1; и группа 5: 9E4. Обработку каждым антителом или носителем (только буфером) начинали тогда, когда уже прощупывались опухоли (50 мм³, день 13), и мышей подвергали эвтаназии, когда объем опухолей достигал ~1500 мм³. Объемы опухолей измеряли 3 раза в неделю. Антитела вводили внутривенно (iv) по 200 мкг 3 раза в неделю на протяжении 3 недель (в общей сложности 9 доз на 1 мышь). Обработку начинали в день 13 и заканчивали в день 32.

Как видно из фиг. 10A, антитела к CD47 по изобретению, особенно антитело 2A1, проявляли противоопухолевую активность на этой модели лимфомы у животных. Для достижения объема опухолей в 1500 мм³ группе 1 (только носитель) требовалось ~25 дней; группе 2 (B6H12.2) требовалось ~45 дней; группе 3 (1B4) требовалось ~37 дней; группе 4 (2A1) требовалось ~85 дней; и группе 5 (9E4) требовалось ~40 дней для достижения объема опухолей ~1500 мм³. Эти данные свидетельствуют, что антитело 2A1 было значительно более сильным, чем все исследованные антитела, связывающие CD47, включая B6H12, которое связывает CD47, блокирует взаимодействие CD47 с SIRPα и

подавляет возникновение опухолей на моделях рака человека у мышей. Вне ожидания, активность подавления опухолей у этих антител к CD47 не коррелировала с их активностью по связыванию CD47 или блокированию взаимодействия CD47 с SIRP α , чего следовало бы ожидать, исходя из опубликованных данных.

Как описано в примерах 2 и 3, антитела 2A1, 1B4 и 9E4 обладали близким сродством к CD47 и сходной активностью при блокировании взаимодействия CD47 с SIRP α . Кроме того, повышенная эффективность 2A1 не может объясняться отличиями в Fc-домене у описанных антител, так как все антитела, использовавшиеся в этом исследовании, состояли из одинаковых доменов IgG1 мыши. Таким образом, наряду с уникальным составом материала, антитело 2A1 обладает неожиданными и уникальными характеристиками, включая неспособность вызывать гомотипические взаимодействия между экспрессирующими CD47 клетками, например, эритроцитами, и повышенная активность подавления опухолей, которая не может объясняться усилением связывания с CD47 или усилением способности блокировать взаимодействие CD47 с SIRP α .

Для подтверждения того, что гуманизированные антитела 2A1 сохраняют свою противоопухолевую активность, проводили аналогичное исследование на опухолях Raji. Схема исследования была такой же, как описано выше. Клетки Raji имплантировали подкожно мышам NOD/SCID, которых случайным образом разбивали на 5 групп (по 10 мышей на группу, день 0). При этом антитела вводили внутривенно (ip) по 200 мкг 3 раза в неделю на протяжении 3 недель (в общей сложности 9 доз на 1 мышь) и измеряли объемы опухолей 3 раза в неделю. Однако в этом исследовании сравнивали мышиное антитело 2A1 типа IgG1 (группа 2) с гуманизированным производным – AB6.12. Для этого AB6.12 преобразовывали (как описано в Примере 8) в изотип IgG1 человека (группа 3), IgG4P человека (группа 4) и IgG4PE человека (группа 4). Таким образом, данный эксперимент должен был ответить на вопрос о влиянии гуманизации 2A1 на его активность подавления опухолей и возможную роль эффекторной функции Fc-домена, которая, как известно, вносит вклад в противоопухолевую активность многих антител. Хорошо установлено, что IgG1 человека обладает значительно большими эффекторными функциями, чем IgG4P человека. IgG4PE и был разработан для еще большего ослабления эффекторных функций. Как видно из фиг. 10B, гуманизация 2A1 не уменьшала противоопухолевую активность 2A1, а скорее даже усиливала её. AB6.12-hIgG1, AB6.12-hIgG4P и AB6.12-hIgG4PE все проявляли близкую противоопухолевую активность, которая была существенно большей, чем у мышиного 2A1 (2A1mIgG). Этот результат был неожиданным, так как 2A1mIgG1, AB6.12-hIgG1, AB6.12-hIgG4P и AB6.12-hIgG4PE обладают близкими активностями связывания CD47 и блокирования SIRP α . Кроме того,

поскольку АВ6.12-hIgG1, АВ6.12-hIgG4Р и АВ6.12-hIgG4РЕ обладают близкими противоопухолевыми активностями, то эффекторная функция действительно играет роль в эффективности АВ6.12 – гуманизированного антитела 2А1.

Пример 11. Совместная с CD47 кристаллизация антител к CD47

CD47 представляет собой 5-раз пересекающий мембрану трансмембранный белок с единственным внеклеточным доменом IgV (типа варибельной области иммуноглобулина), который сильно гликозилирован по 6 сайтам. Структура CD47-IgV домена была решена в комплексе с IgV-доменом SIRP α , его природного лиганда (кодировый № 2JJS в Банке данных по белкам (PDB); Hatherley et al., 2008 Mol Cell, 25, 31(2): 266-77 (фиг. 11А)). Структура показывает связывание SIRP α -IgV с CD47-IgV на апикальном эпитопе, включающем N-концевой пироглутамат CD47. Эта структура вполне объясняет, как эти два трансмембранных белка могут продуктивно взаимодействовать на клеточной поверхности из соседних клеток в ориентации голова-к-голове. На фиг. 11В представлена рентгеноструктурная кристаллография CD47-IgV в комплексе с Fab-фрагментом В6Н12. Для ясности на рисунке не показаны константные области Fab (C_{H1} и C_L), а представлен только Fv-фрагмент (V_H и V_L). При этом проявляется апикальный сайт связывания, который ориентирует это антитело на поверхности чрезвычайно далеко от клеточной мембраны (фиг. 11В). Из этой структуры виден механизм блокирования SIRP α антителом В6Н12. Для ориентации на фиг. 11 относительное положение клеточной мембраны представлено штрихом.

Для того чтобы определить искомый эпитоп антител настоящего изобретения, проводили рентгеноструктурную кристаллографию совместного комплекса CD47-IgV домена с Fab-фрагментом 2А1-х_i (химерного антитела с доменами C_{H1} и C_L человека) (фиг. 11С). Для ясности на рисунке не показаны константные области Fab (C_{H1} и C_L), а представлен только Fv-фрагмент (V_H и V_L). В отличие от ранее установленной структуры связывания CD47 с SIRP α в ориентации голова-к-голове (фиг. 11А) и апикального расположения антитела В6Н12 подальше от мембраны (фиг. 11В), структура 2А1 в комплексе с CD47 показывает связывание антитела с CD47 вблизи от мембраны в неожиданной и уникальной ориентации голова-к-боку (фиг. 11С). Эпитоп 2А1 на CD47 является прерывистым и включает остатки Y37, K39, K41, петлю KGRD (SEQ ID NO: 56) (остатки 43-46), D51, H90, N93, E97, T99, E104 и E106 в CD47 при нумерации в соответствии с SEQ ID NO: 147 (т.е. SEQ ID NO: 48 без сигнальной последовательности (аминокислоты 1-18)). Структура 2А1, связанного с CD47, также показывает, что V_H главным образом участвует в связывании с петлей KGRD (SEQ ID NO: 56) в CD47, тогда

как домен V_K взаимодействует с апикальными остатками, включая Y37, T102 и E104, которые участвуют в связывании SIRP α . Следовательно, именно домен V_K главным образом препятствует физическому связыванию SIRP α с CD47. Эти структурные исследования свидетельствуют, что уникальный эпитоп, с которым связывается 2A1, находится на боковой стороне CD47. В отличие от известных антител к CD47, ориентация области V_H 2A1 в проксимальном положении к мембране является важнейшим свойством этого антитела, предотвращающим существенную гемагглютинацию эритроцитов, удерживая антитело таким образом, что оно не может образовывать мостики с молекулами CD47 на соседних клетках.

14-1408

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> InhibRx LLC

<120> CD47 Antibodies and Methods of Use Thereof

<130> 42967-506001WO

<140> PCT/US2013/024995

<141> 2013-02-06

<150> US 61/595,216

<151> 2012-02-06

<150> US 61/659,752

<151> 2012-06-14

<160> 147

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1

5

10

15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20

25

30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 2

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr

65

70

75

80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85

90

95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100

105

110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

115

120

125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

130

135

140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

145

150

155

160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165

170

175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

180

185

190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

195

200

205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 3

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 4
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

245

250

255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

260

265

270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

275

280

285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

290

295

300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

305

310

315

320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 5

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 7

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 9

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 10

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 10

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 11

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 12

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 12

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Tyr Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 13

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 13

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Ser Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 14

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Ala Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 15

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Thr Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 16

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 16

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 17

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 17

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 18

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Tyr Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 19

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 19

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Tyr Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 20

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 20

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Tyr Tyr
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr

35

40

45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 22

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 22

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 23

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 24

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 24

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Asp Tyr

20

25

30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 25

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 26

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 26

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 27

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 27

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 28

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 28

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 29

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe

20

25

30

Tyr Leu His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 31

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Tyr Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Ile Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr

65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys

100 105

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 32

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Ile Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 33
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr

20

25

30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35

40

45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 35

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 37

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 38

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Gly Phe Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 39

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 40

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 41

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Ile Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 42

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 43

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr

20

25

30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Ile Leu Ile

35

40

45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

35

40

45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 46

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr

20

25

30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 47

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly
1 5 10 15

Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
20 25 30

Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
35 40 45

Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp
50 55 60

Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp
65 70 75 80

Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
85 90 95

Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
100 105 110

Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
115 120 125

Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu
130 135 140

Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe
145 150 155 160

Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr
165 170 175

Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val
180 185 190

Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr
195 200 205

Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His
210 215 220

Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala
225 230 235 240

Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu
245 250 255

Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile
260 265 270

Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr
275 280 285

Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys
290 295 300

Ala Val Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met
305 310 315 320

Asn Asp Glu

<210> 49

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn
1 5 10 15

Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn
20 25 30

Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr
35 40 45

Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser
50 55 60

Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu
65 70 75 80

Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys
85 90 95

Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys
100 105 110

Tyr Arg Val Val
115

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 50

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VH CDR2

<400> 51

Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VH CDR3

<400> 52

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

1 5

<210> 56
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

Lys Gly Arg Asp

1

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 57

Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 58

Gly Phe Thr Phe Thr Tyr Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 59

Gly Tyr Asn Phe Thr Tyr Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 60

Gly Tyr Thr Ile Thr Tyr Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<220>

<223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 63

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 64

Gly Phe Thr Ile Thr Asp Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 65

Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 66

Gly Phe Thr Phe Lys Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VL CDR1

<400> 67

Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VL CDR1

<400> 68

Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VL CDR2

<400> 69

Arg Ala Asn Arg Leu Gln Ser

1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VL CDR2

<400> 70

Arg Ala Asn Arg Arg Ala Thr

1 5

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VL CDR2

<400> 71

Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser

1 5

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 72

Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu

1 5 10

<210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 73

Trp Ile Asp Pro Asp Tyr Gly Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 74
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 74

Trp Ile Asp Pro Asp Ser Gly Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 75

Trp Ile Asp Pro Asp Asn Ala Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 76

Trp Ile Asp Pro Asp Asn Thr Asp Thr Glu
1 5 10

<210> 77

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amino acid sequence of VH CDR3

<400> 77

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Pro Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 78

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> VH chain region of the 9E4 antibody

<400> 78

Glu Val Gln Leu Arg Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser Arg Val Arg Ser Leu Ala Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Thr Gly Ala Thr Gly Tyr Asp Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ser Leu Ile Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Arg Asn Arg Tyr Asp Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val
115

<210> 79

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL chain region of the 9E4 antibody

<400> 79

Glu Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Asp Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Ala Leu Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 80

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> VH chain region of the 1B4 antibody

<400> 80

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Glu Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val
115

<210> 81

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL chain region of the 1B4 antibody

<400> 81

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 82

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 82

cactgcaggt rtccactcc

19

<210> 83

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 83

catagcaggt gtccactcc

19

<210> 84

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 84

crctacaggt gtccactcc

19

<210> 85

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 85

gcyacagmtg tccactcc

18

<210> 86

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 86

cactgcaggt gtccwmtcc

19

<210> 87

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 87

crctrcaggt gtkcactcc

19

<210> 88

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 88

gctawmggtg tccactcc

18

<210> 89

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 89

cctcaggtgt ccactcc

17

<210> 90

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 90

gctacaggtg ctactcc

18

<210> 91

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 91

cactgcaggt gtcctctct

19

<210> 92

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 92

caytgcaggt gtccaytgc

19

<210> 93

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 93
gctammggtg tccacttc 18

<210> 94
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 94
ctcctgtcak taactkcagg t 21

<210> 95
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 95
caactgcagg tgtctctct 19

<210> 96
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 96

crctrcaggy gtccactct

19

<210> 97

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 97

ccaagctgta tcctttcc

18

<210> 98

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 98

ccaagctgtg tcctrtcc

18

<210> 99

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 99

cttgacagyc vttcckggt

19

<210> 100

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 100

cttcacagcc tttcctggt

19

<210> 101

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 101

cttaaaaggg gtccagtg

19

<210> 102

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 102

caytttaaaa rgtgtcmagt gt

22

<210> 103

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 103

gttttaaaag gtgtcctgtg

20

<210> 104

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 104

ctytttaaaag gkgtcagwg

20

<210> 105

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 105

cytttamatg gtatccagtg t

21

<210> 106

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 106

cttttacatg gtttcaagtg t

21

<210> 107

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 107

gtccctgcat atgtcyt

17

<210> 108

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 108

gatggcagcw gcycaaag

18

<210> 109

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 109

ctatcaaggt gtgcattgt

19

<210> 110

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 110
cttttaaaag wtgtccagkg t 21

<210> 111
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 111
gtgacagtcc ttctggtag 20

<210> 112
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 112
cttcctgatg gcagtggtt 19

<210> 113
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 113

gctacagga tccaatcc

18

<210> 114

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 114

gcgtctaga yctccacaca caggrccag tggatagac

39

<210> 115

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 115

ctgwtgttct ggattcctg

19

<210> 116

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 116

ggtcagacag tcagcagt

18

<210> 117

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 117

gtgctctgga ttcgggaa

18

<210> 118

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 118

cagcttctyg ctaatcagtg

20

<210> 119

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 119

ctaatcagtg cttcagga

18

<210> 120

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 120

gtgggtatct ggtrcstgtg

20

<210> 121

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 121

ggaaatttaa aagtacctgt ggg

23

<210> 122

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 122

ggtttcmagg trccagatgt

20

<210> 123

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 123

ctctggttyc caggtatc

18

<210> 124

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 124

ctgttttcaa ggtrccagat gt

22

<210> 125

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 125

gttgtaatgt ccagagga

18

<210> 126

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 126

cttacaggtg ccagatgt

18

<210> 127

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 127
ctcaattgta grtgccagat gt 22

<210> 128
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 128
cacagtaggt gtcagatgt 19

<210> 129
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 129
gtcgtagttg tcagatgt 18

<210> 130
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 130

cctccttctt ggccaaga

18

<210> 131

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 131

cttatatgga gctgatggg

19

<210> 132

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 132

gtgtctggtg ctcattggg

18

<210> 133

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 133

ctstggttgt ctggtgttga

20

<210> 134

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 134

gtctctgatt ctagggca

18

<210> 135

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 135

ctkckctggg ttccag

16

<210> 136

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 136

gcaggtggtg acgga

15

<210> 137

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 137

caggtgcctc gtgcac

16

<210> 138

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 138

ctctggtgcc tgtgca

16

<210> 139

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 139

ctggaytyca gcctccaga

19

<210> 140

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 140

gwtctctrga gtcagtggg

19

<210> 141

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 141

ctggatccct ggакcyact

19

<210> 142

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 142

gttctgcttt ttaggtgtg

19

<210> 143

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 143

gatcccaggc atgatatgt

19

<210> 144

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 144
cttcatggtg ctcagtgt 18

<210> 145
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 145
ccatatcagg tgcccagtgt 20

<210> 146
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 146
gcgtctagaa ctggatggtg ggaagatgg 29

<210> 147
<211> 305
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 147

Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn
1 5 10 15

Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn
20 25 30

Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr
35 40 45

Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser
50 55 60

Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu
65 70 75 80

Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys
85 90 95

Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys
100 105 110

Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu Ile Val
115 120 125

Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe Gly Ile

Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys Ala Val
275 280 285

Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met Asn Asp
290 295 300

Glu
305

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с CD47 или его иммунологически активный фрагмент, причем антитело не вызывает существенной агглютинации клеток после введения.

2. Антитело по п. 1, при этом антитело является химерным, гуманизованным или полностью человеческим.

3. Антитело по п. 1, при этом CD47 представлен CD47 человека.

4. Антитело по п. 1, при этом антитело или его иммунологически активный фрагмент предотвращает взаимодействие CD47 с регулирующим сигналы белком α (SIRP α).

5. Антитело по п. 4, при этом антитело или его иммунологически активный фрагмент усиливает опосредованный макрофагами фагоцитоз экспрессирующих CD47 клеток.

6. Антитело по п. 1, при этом антитело или его иммунологически активный фрагмент относится к изотипу IgG, выбранному из группы, состоящей из изотипа IgG1, изотипа IgG2, изотипа IgG3 и изотипа IgG4.

7. Антитело по п. 1, при этом антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 5-30.

8. Антитело по п. 1, при этом антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит переменную область легкой цепи (V_L), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 31-47.

9. Антитело по п. 1, при этом антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит область V_H , приведенную в любой из SEQ ID NOs: 5-30, и область V_L , приведенную в любой из SEQ ID NOs: 31-47.

10. Антитело по п. 9, при этом антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит область V_H , приведенную в любой из SEQ ID NOs: 5, 7, 8, 11, 12, 15-17, 20-22 и 27-30, вместе с областью V_L , приведенной в любой из SEQ ID NOs: 31, 32, 35, 40, 41, 42, 43, 44 и 47.

11. Антитело по п. 9, при этом антитело содержит комбинацию из области V_H и области V_L , выбранную из комбинаций, перечисленных в табл. 1.

12. Антитело по п. 1, при этом антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит определяющий комплементарность участок 1 (CDR1) из V_H , последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ

ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 66, участок V_H CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 или SEQ ID NO: 76, участок V_H CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 77, участок V_L CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 68, участок V_L CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71, и участок V_L CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 55.

13. Антитело по п. 12, при этом антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит V_H CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 50, V_H CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 51, V_H CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 52, V_L CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 53, V_L CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 54, и V_L CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 55.

14. Антитело по п. 12, при этом антитело или его иммунологически активный фрагмент содержит V_H CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 50, V_H CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 72, V_H CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 52, V_L CDR1, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 53, V_L CDR2, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 71, и V_L CDR3, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 55.

15. Антитело по п. 1, при этом антитело связывается с CD47 в ориентации головка-к-боку, так что тяжелая цепь антитела располагается возле мембраны клетки, экспрессирующей CD47, а легкая цепь антитела перекрывает сайт связывания SIRP α на CD47.

16. Антитело по п. 1, при этом антитело связывается с CD47 в ориентации головка-к-боку так, что легкая цепь антитела располагается возле мембраны клетки, экспрессирующей CD47, а тяжелая цепь антитела перекрывает сайт связывания SIRP α на CD47.

17. Антитело по п. 1, при этом антитело связывается с прерывистым эпитопом на CD47.

18. Антитело по п. 17, при этом антитело связывается с петлей CD47, включающей SEQ ID NO: 56.

19. Антитело по п. 17, при этом прерывистый эпитоп включает аминокислотные

остатки Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104 или E106 в CD47 при нумерации их в соответствии с SEQ ID NO: 147.

20. Антитело по п. 1, при этом антитело не вызывает существенной гемагглютинации эритроцитов после введения.

21. Антитело по п. 1, при этом антитело или его иммунологически активный фрагмент относится к изотипу IgG, выбранному из IgG4P и IgGPE.

22. Выделенное антитело или его иммунологически активный фрагмент, причем антитело конкурирует с антителом по любому из предыдущих пунктов за предотвращение взаимодействия CD47 с SIRP α .

23. Полипептид, содержащий аминокислотные остатки Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104 и E106 из CD47 при нумерации их в соответствии с SEQ ID NO: 147.

24. Фармацевтическая композиция, включающая антитело по п. 1 или его иммунологически активный фрагмент и носитель.

25. Способ ослабления симптома рака или другого неопластического состояния, который включает введение нуждающемуся в этом субъекту антитела по п. 1 или его иммунологически активного фрагмента в количестве, достаточном для ослабления симптома рака или другого неопластического состояния у субъекта.

26. Способ по п. 25, при этом субъектом является человек.

27. Способ по п. 25, при этом антитело является химерным, гуманизованным или полностью человеческим.

28. Способ по п. 25, при этом CD47 представлен CD47 человека.

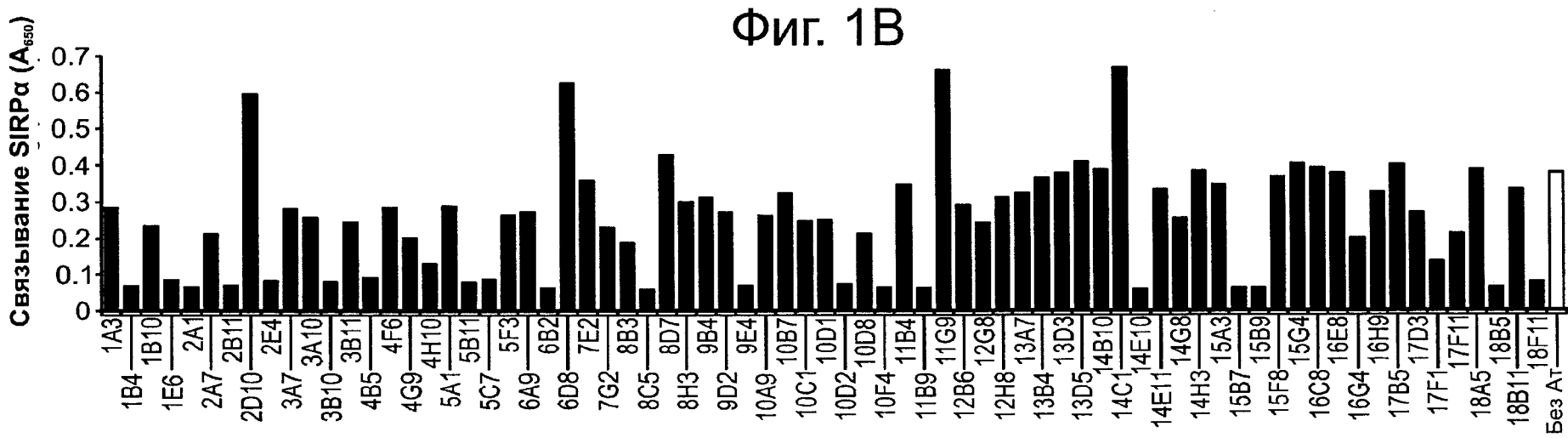
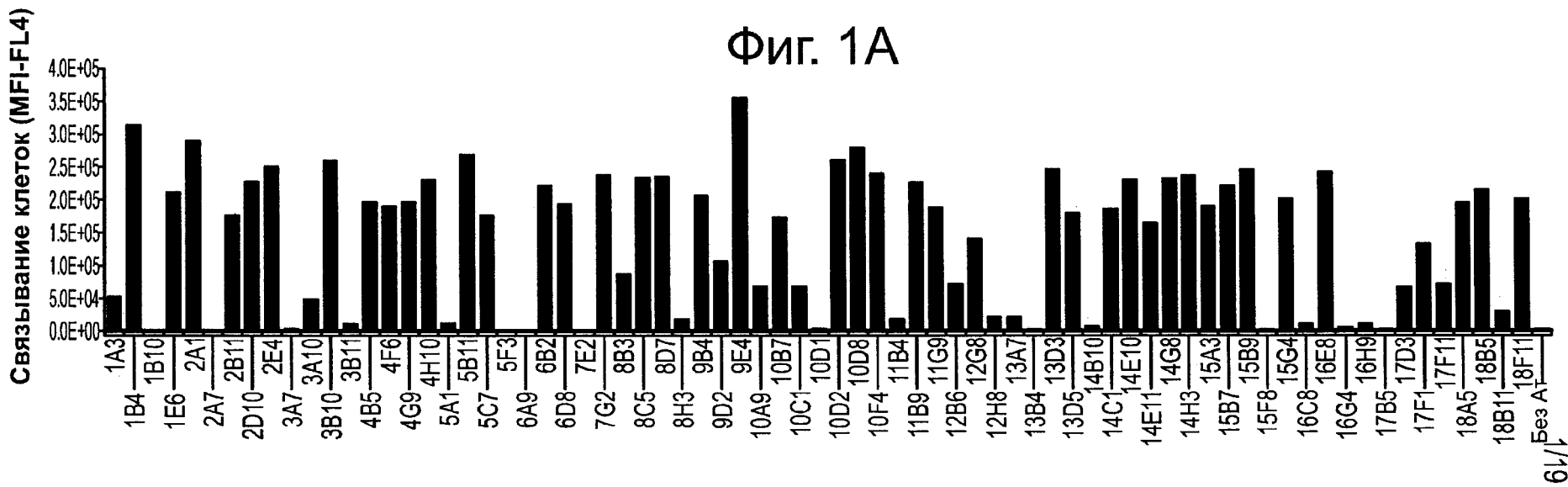
29. Способ по п. 25, при этом антитело или его иммунологически активный фрагмент предотвращает взаимодействие CD47 с SIRP α .

30. Способ по п. 25, при этом антитело или его иммунологически активный фрагмент относится к изотипу IgG, выбранному из группы, состоящей из изотипа IgG1, изотипа IgG2, изотипа IgG3 и изотипа IgG4.

31. Способ по п. 25, при этом антитело или его иммунологически активный фрагмент относится к изотипу IgG, выбранному из IgG4P и IgGPE.

32. Способ по п. 25, дополнительно включающий применение химиотерапии.

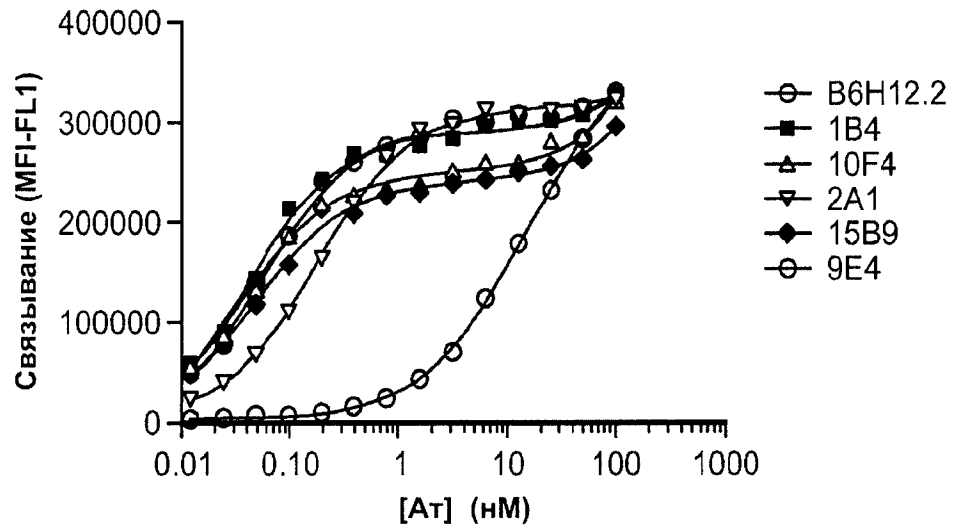
33. Способ по п. 32, при этом химиотерапия представлена радиотерапией.



827/17
14/11/28

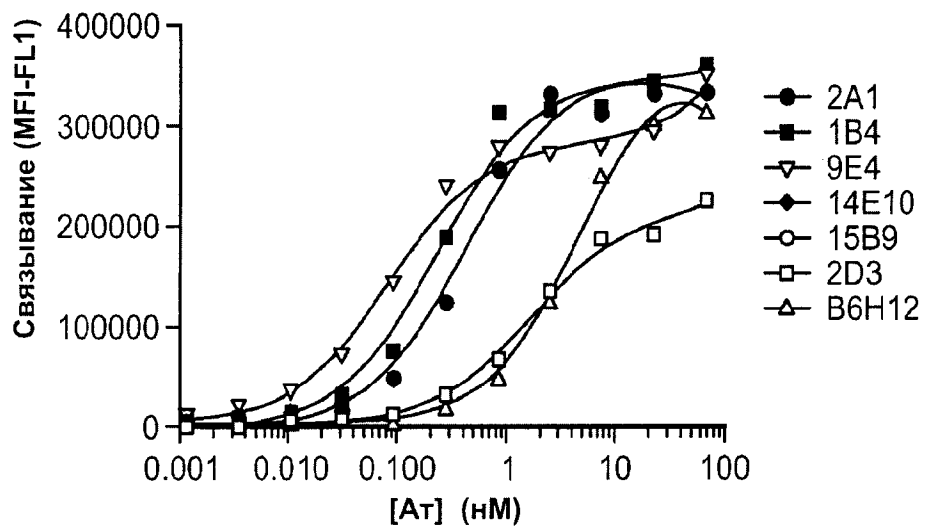
Фиг. 2А

FACS: мышинные МАТ к CD47, клетки Raji

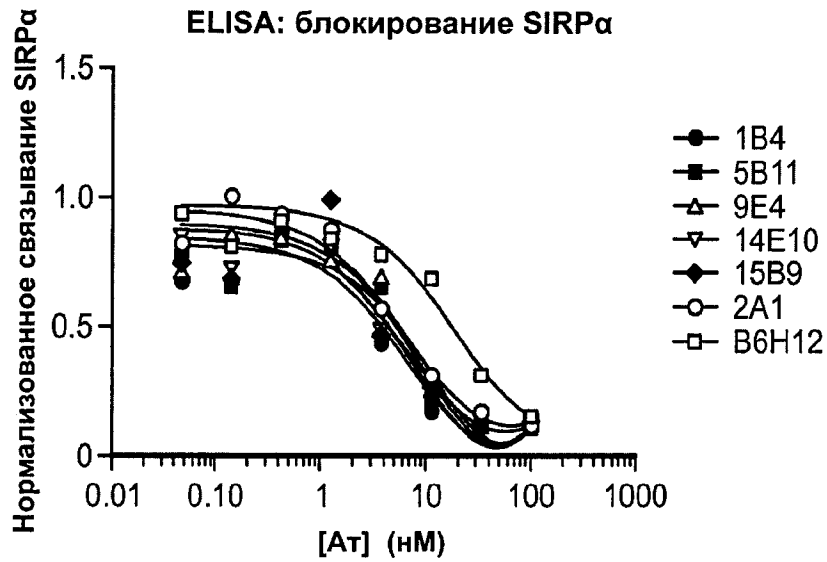


Фиг. 2В

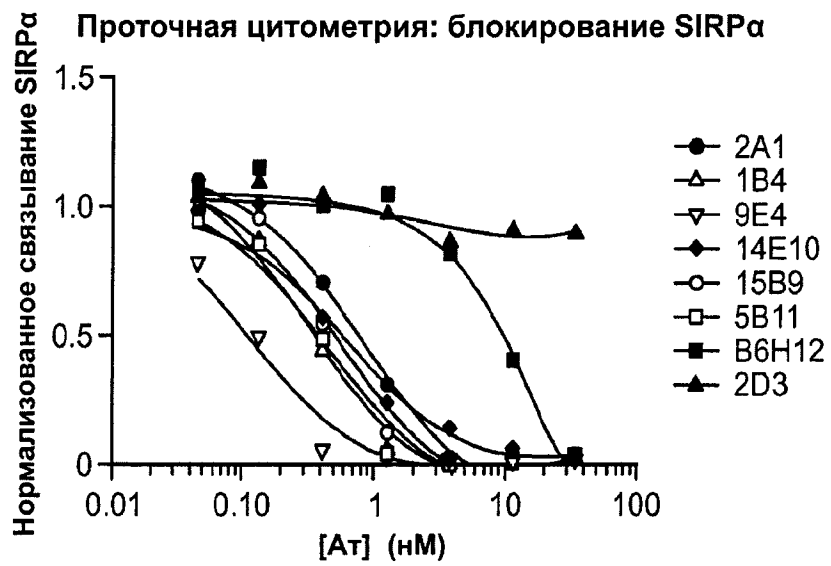
FACS: мышинные МАТ к CD47, клетки CCRF-CEM



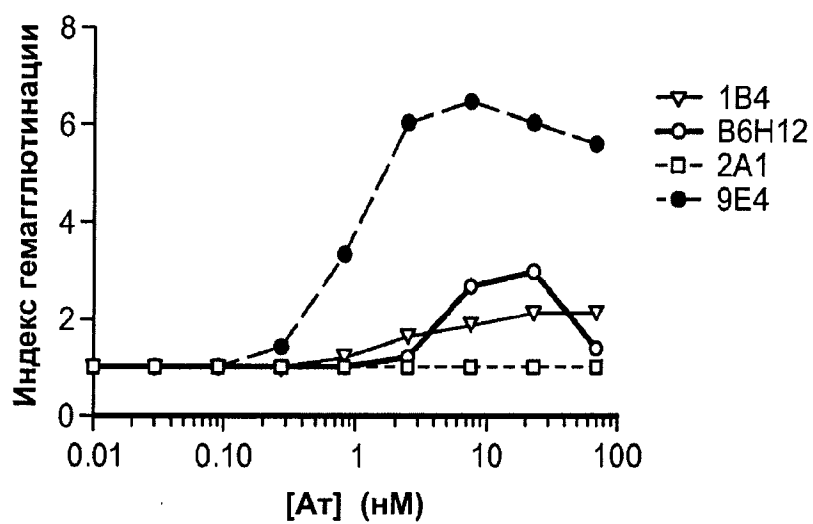
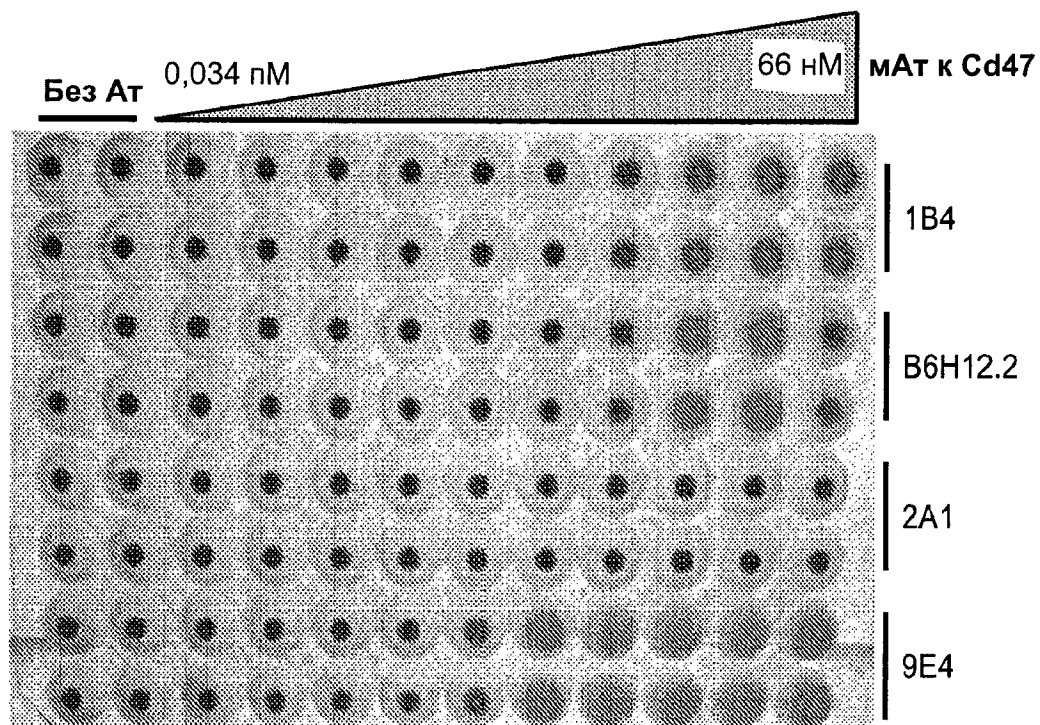
Фиг. 3А



Фиг. 3В

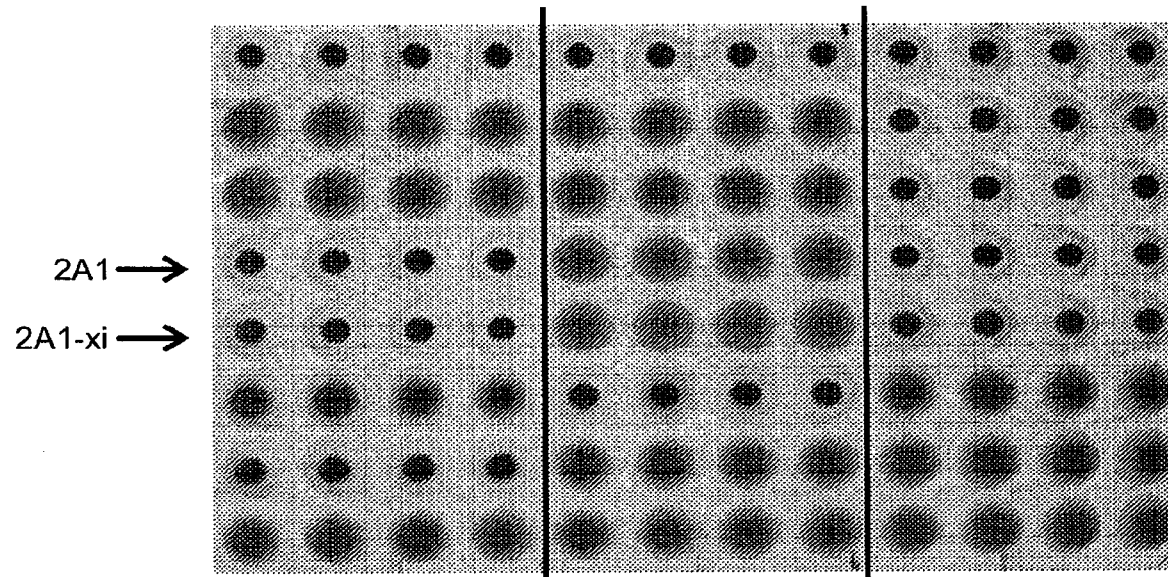


Фиг. 4А

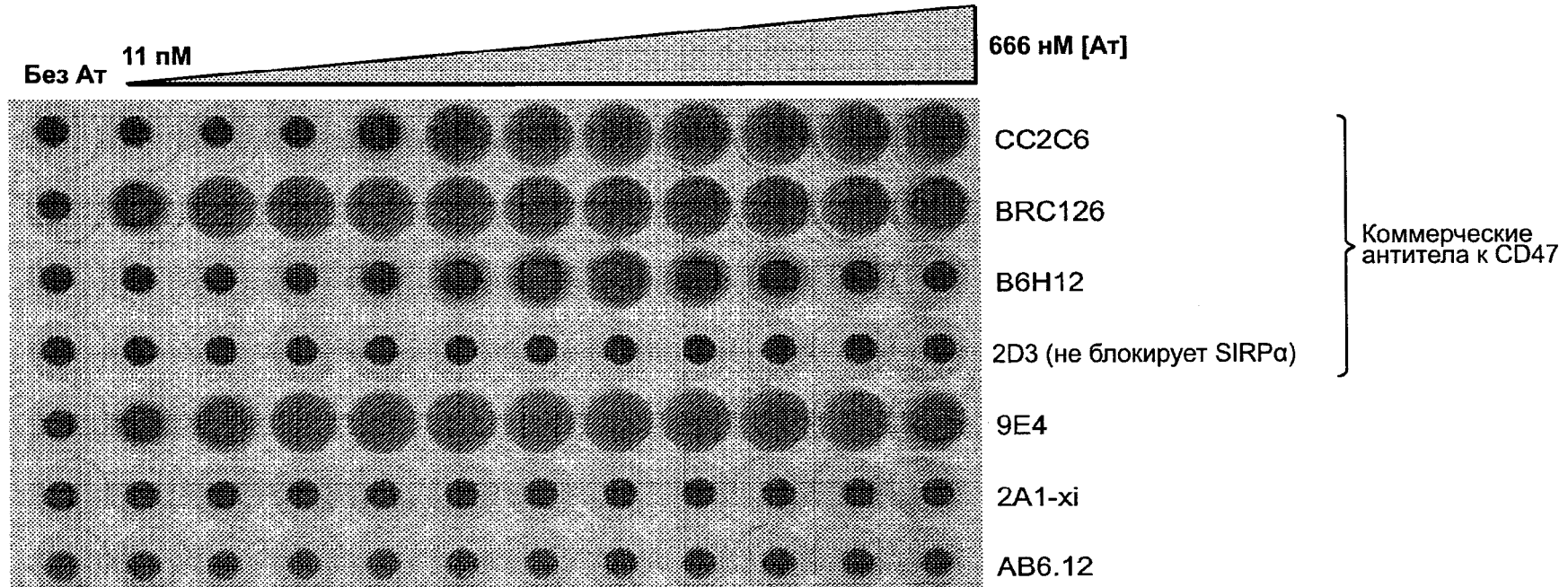


Фиг. 4В

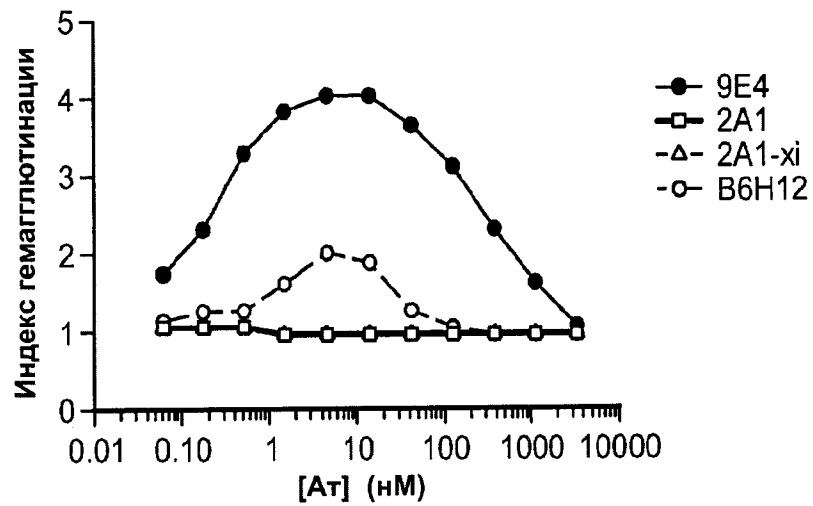
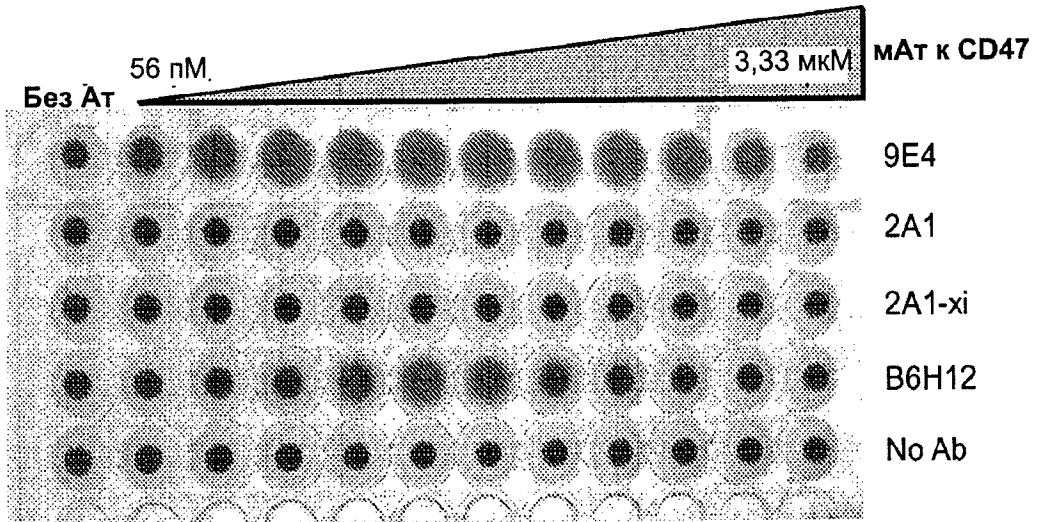
[A _T] (нМ)	100	50	25	12.5	100	50	25	12.5	100	50	25	12.5
A	9E4	9E4	9E4	9E4	11B9	11B9	11B9	11B9	15B9	15B9	15B9	15B9
B	холостая проба	холостая проба	холостая проба	холостая проба	10F4	10F4	10F4	10F4	18F11	18F11	18F11	18F11
C	B6H12	B6H12	B6H12	B6H12	холостая проба	холостая проба	холостая проба	холостая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



Фиг. 4С

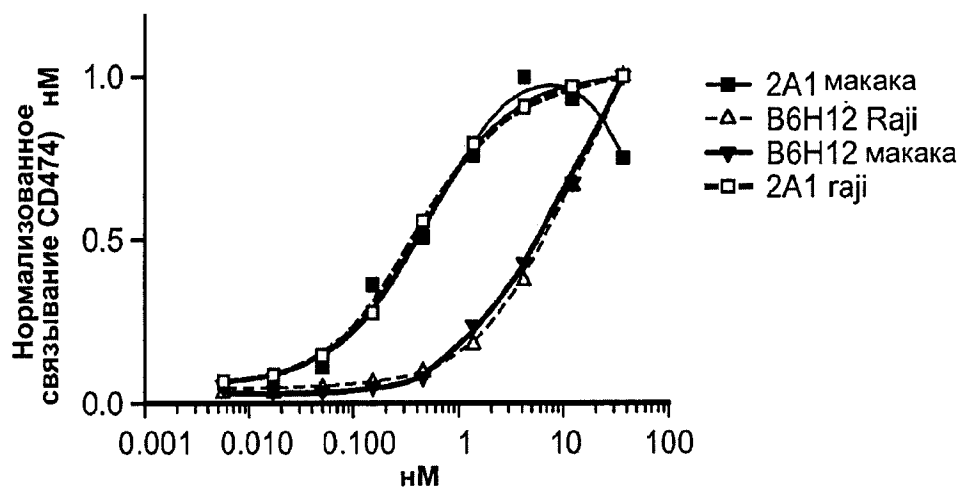


Фиг. 4D



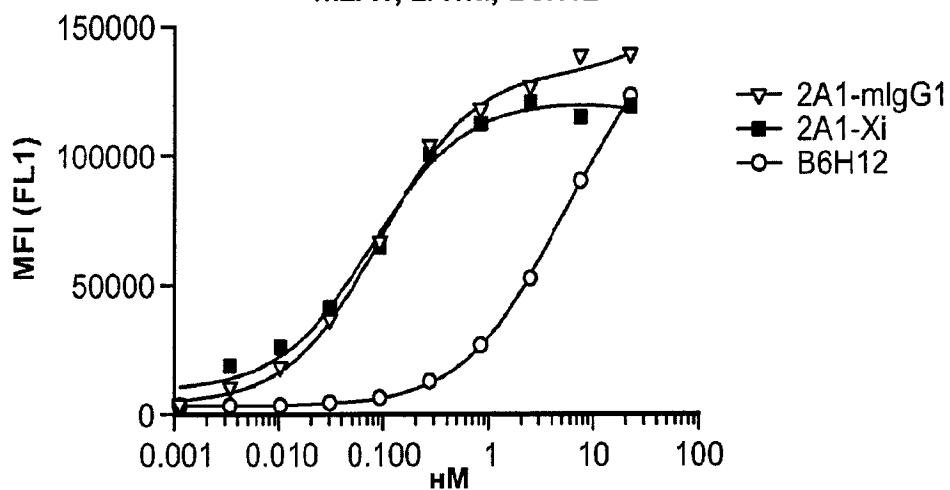
Фиг. 5

2A1 и B6H12, связывание, человек и макака

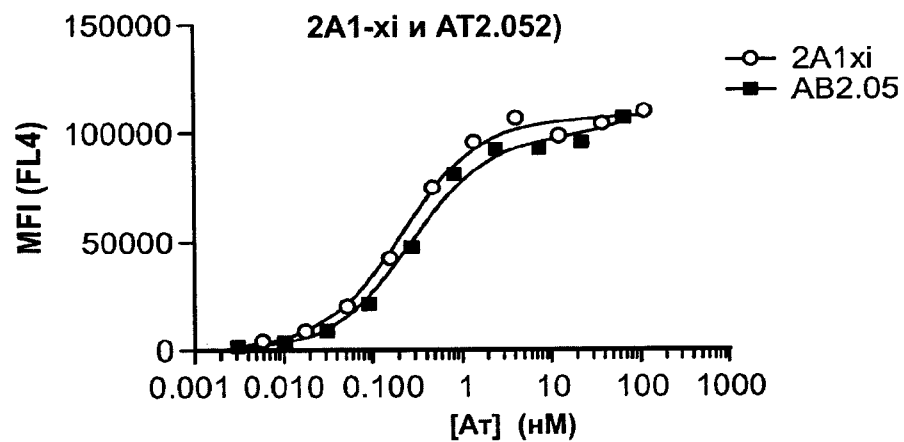


Фиг. 6

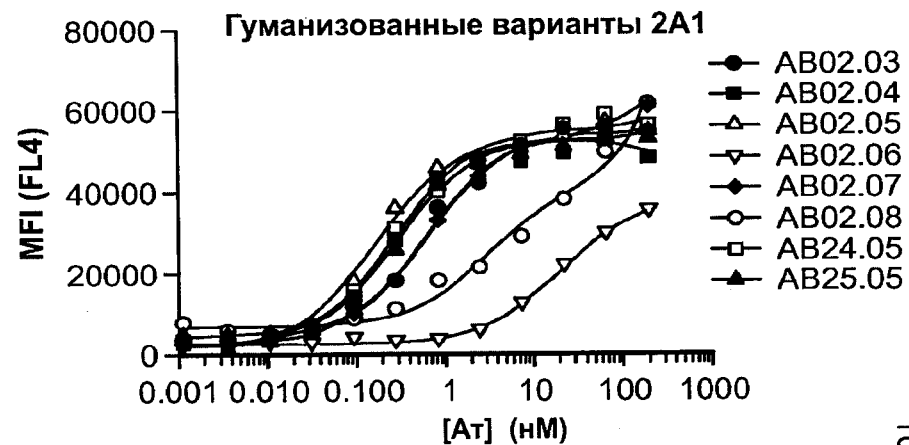
m2A1, 2A1xi, B6H12



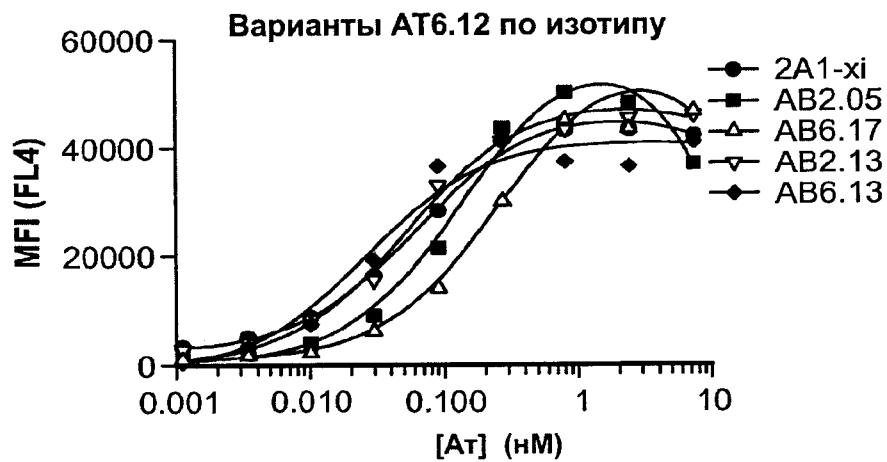
Фиг. 7А



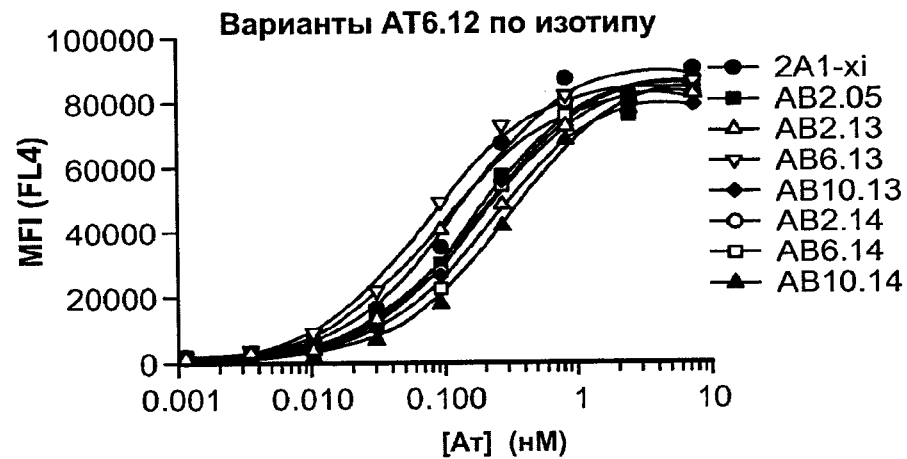
Фиг. 7В



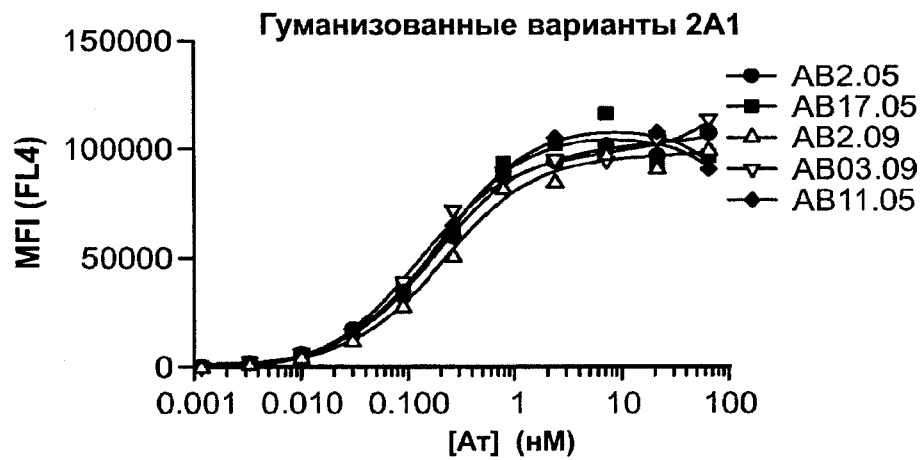
Фиг. 7С



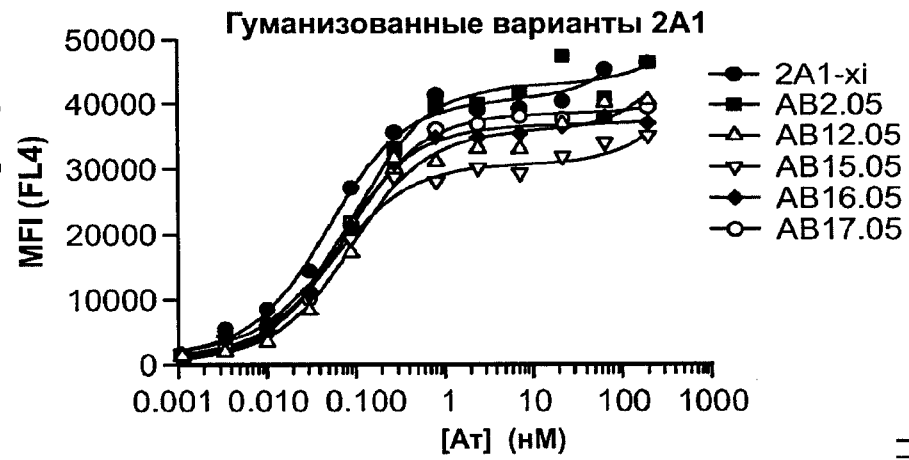
Фиг. 7D



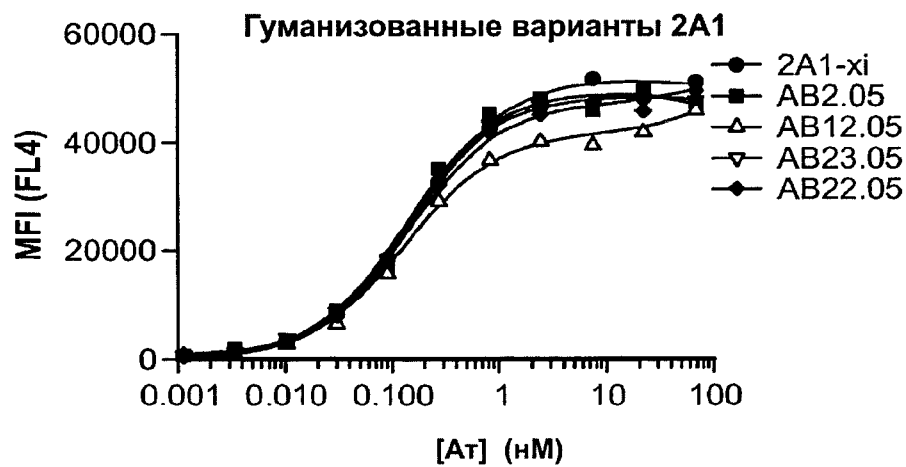
Фиг. 7Е



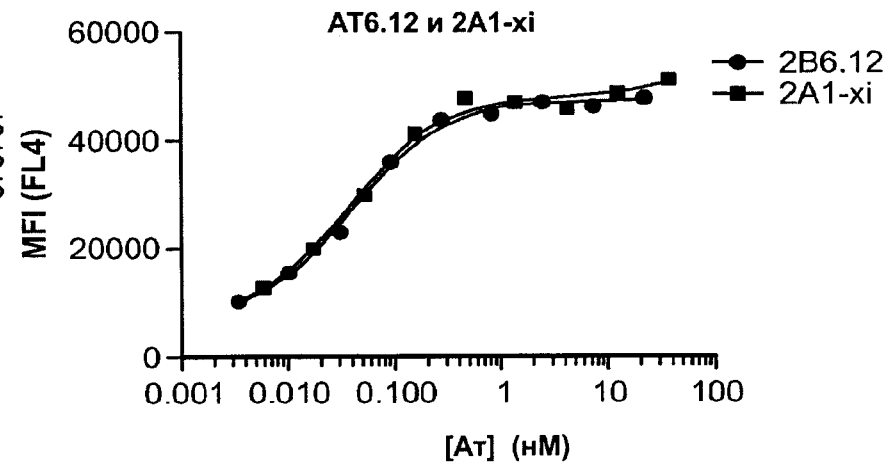
Фиг. 7F



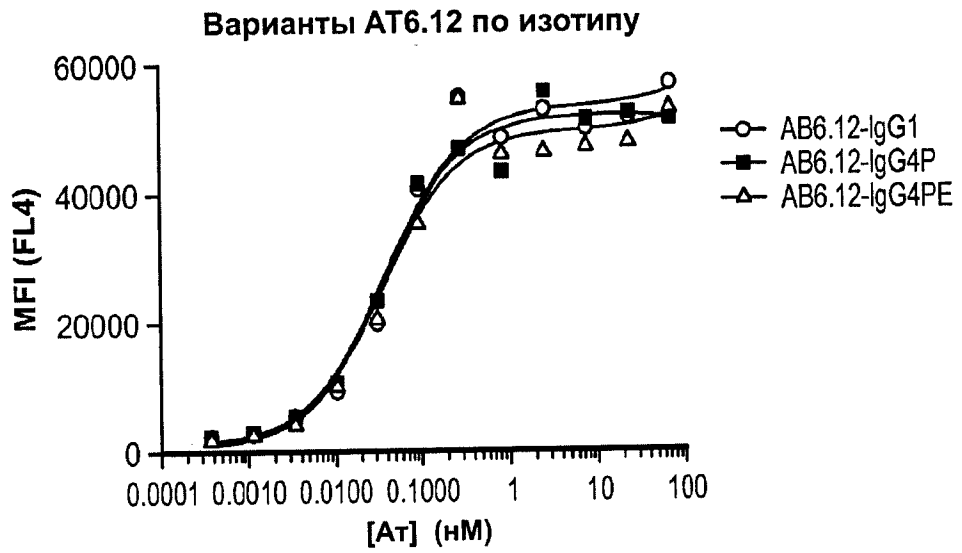
Фиг. 7G



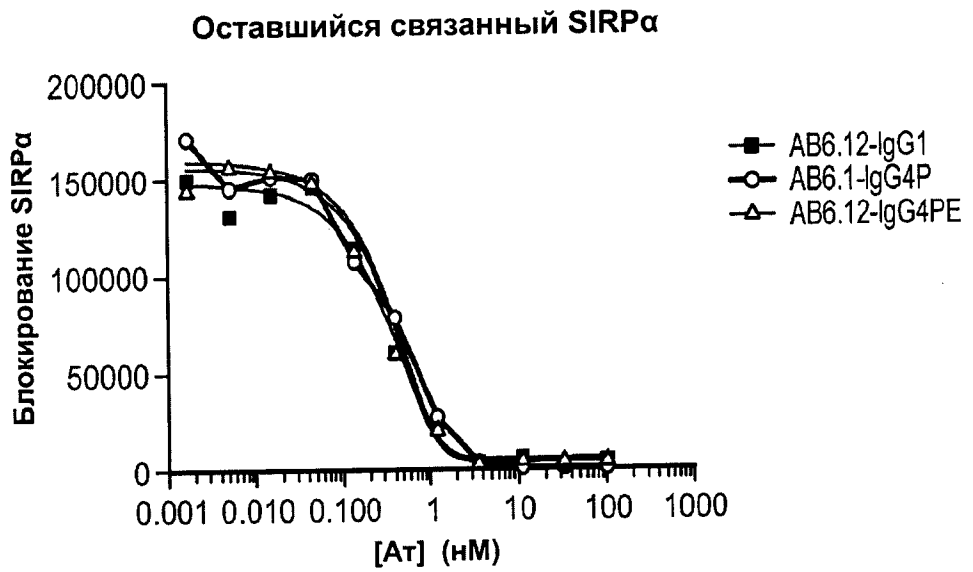
Фиг. 7H



Фиг. 7I

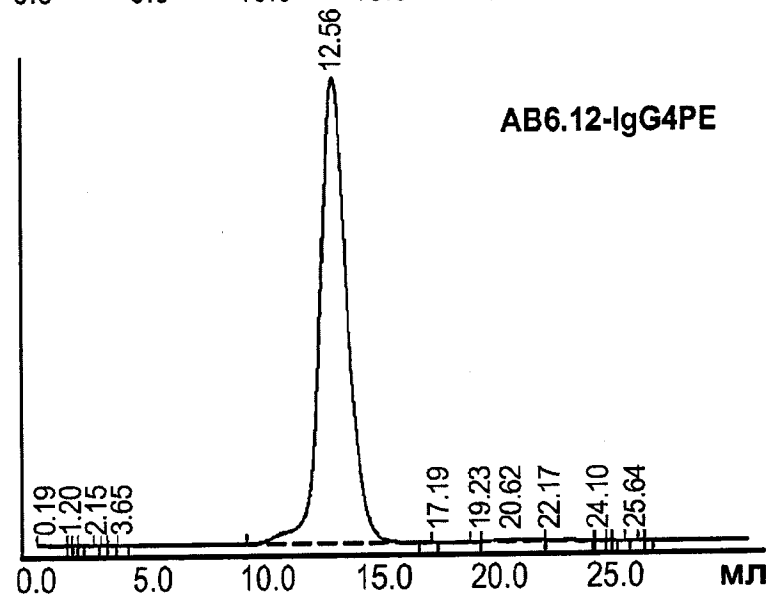
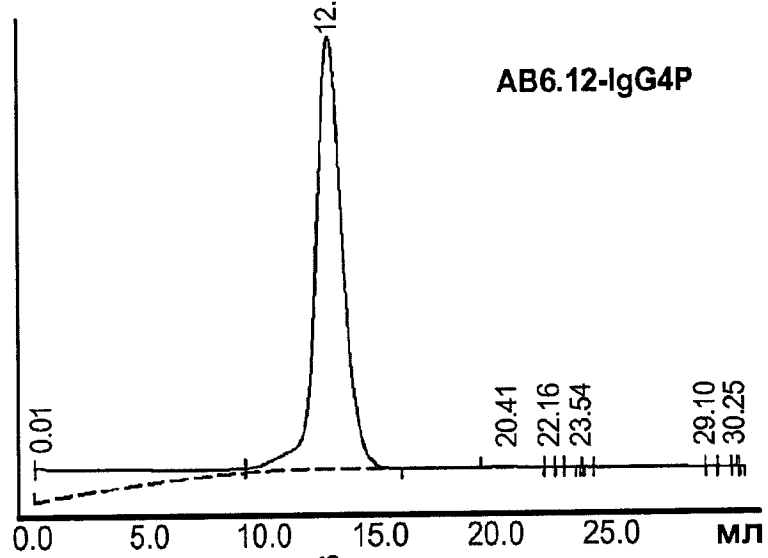
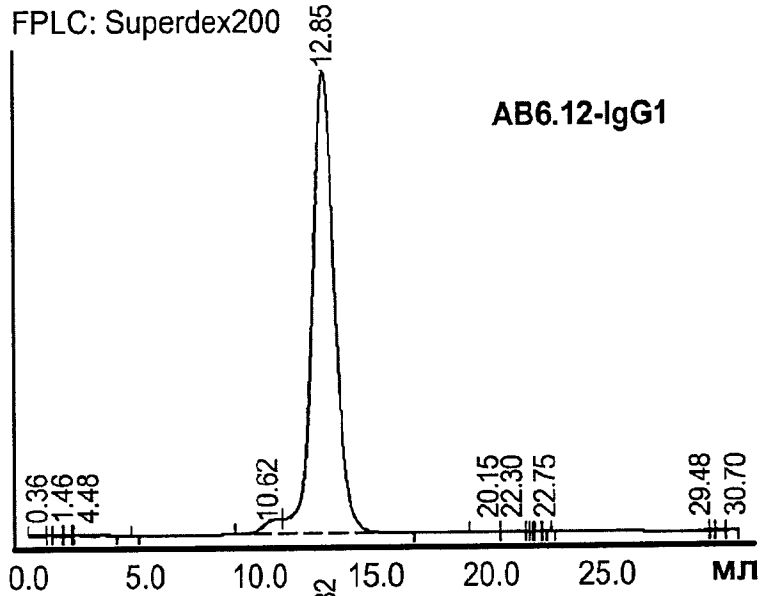


Фиг. 7J



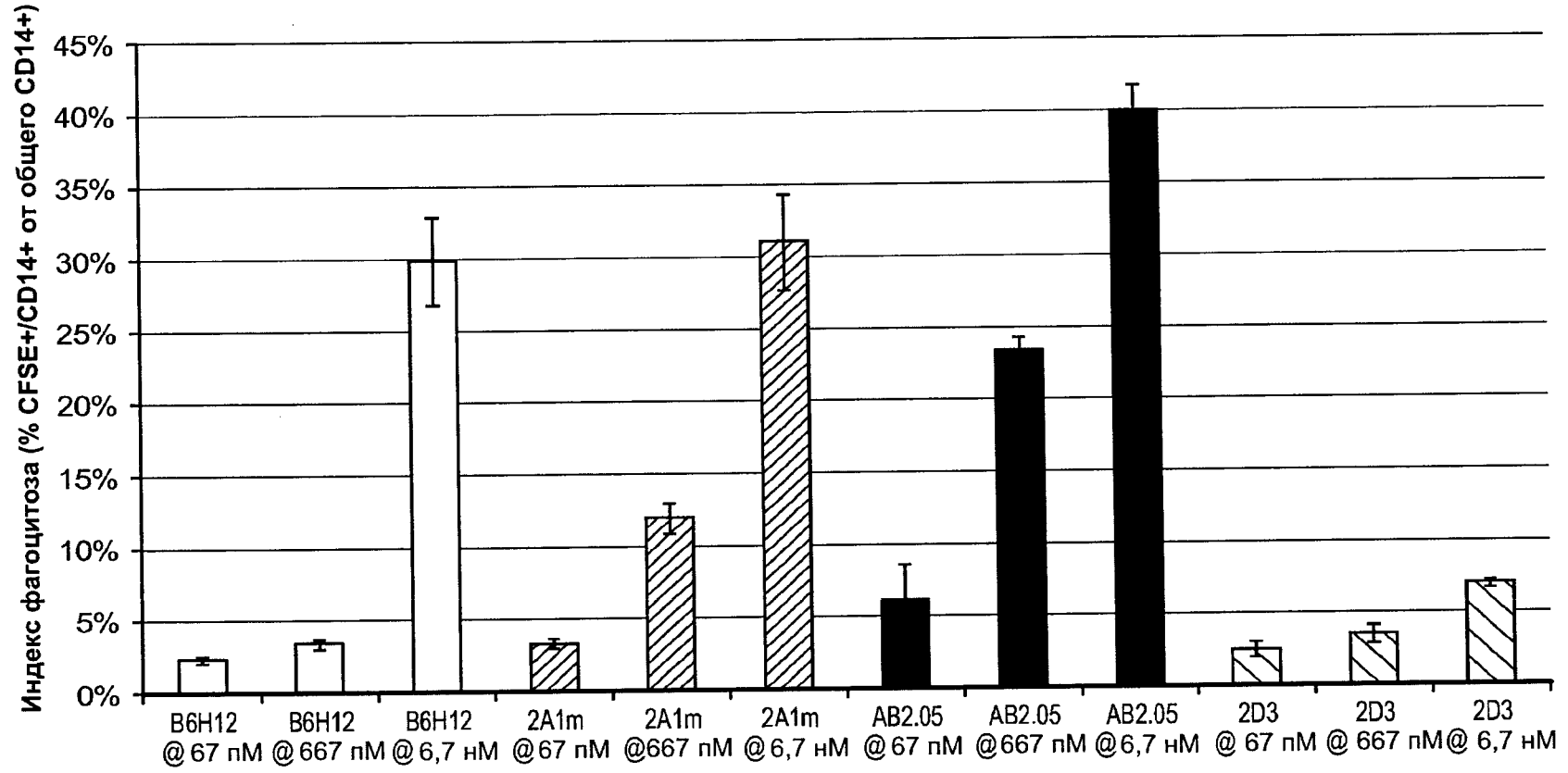
Фиг. 8А

13/19



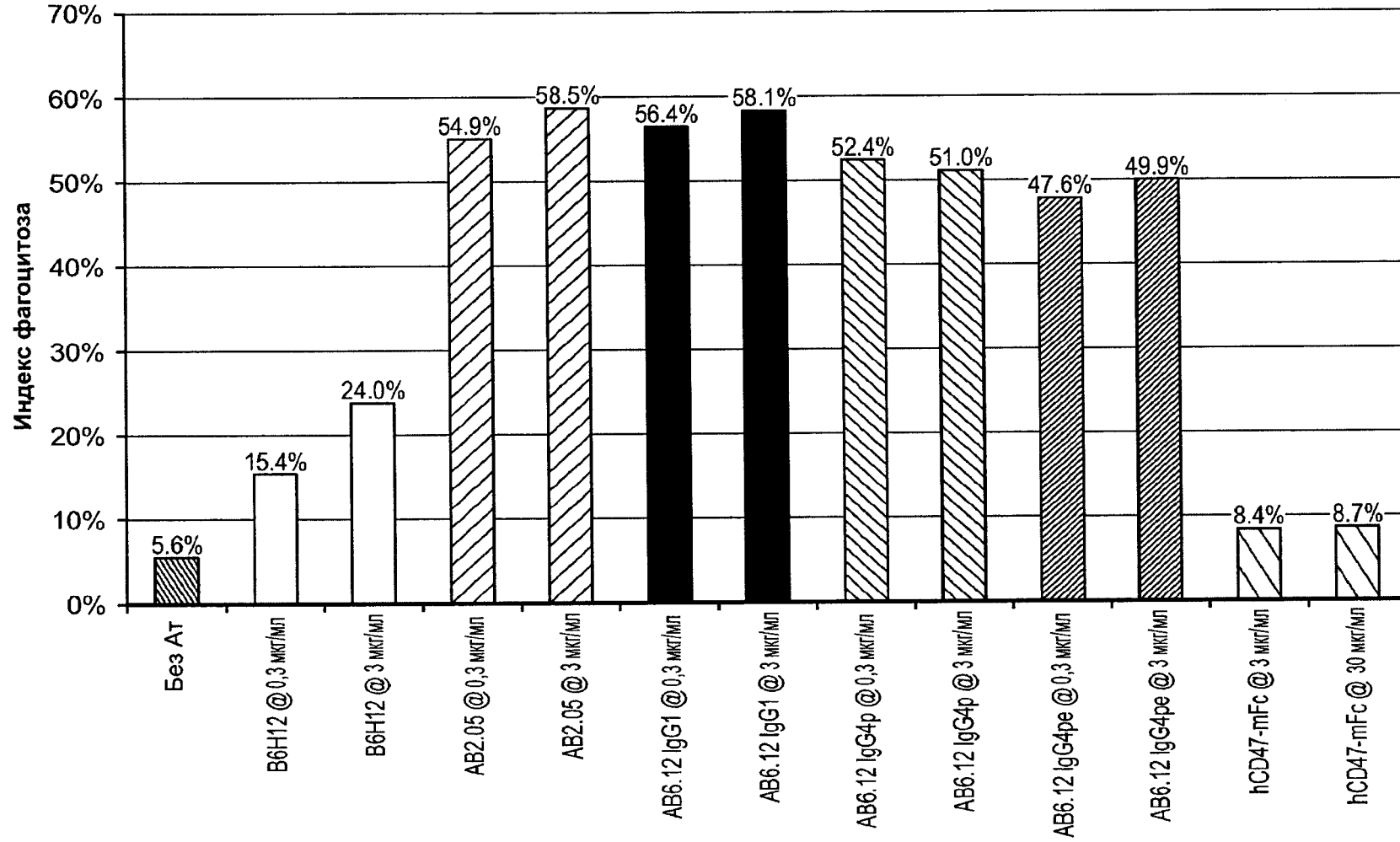
Фиг. 9А

Фагоцитоз клеток CCRF-SEM первичными макрофагами MDM



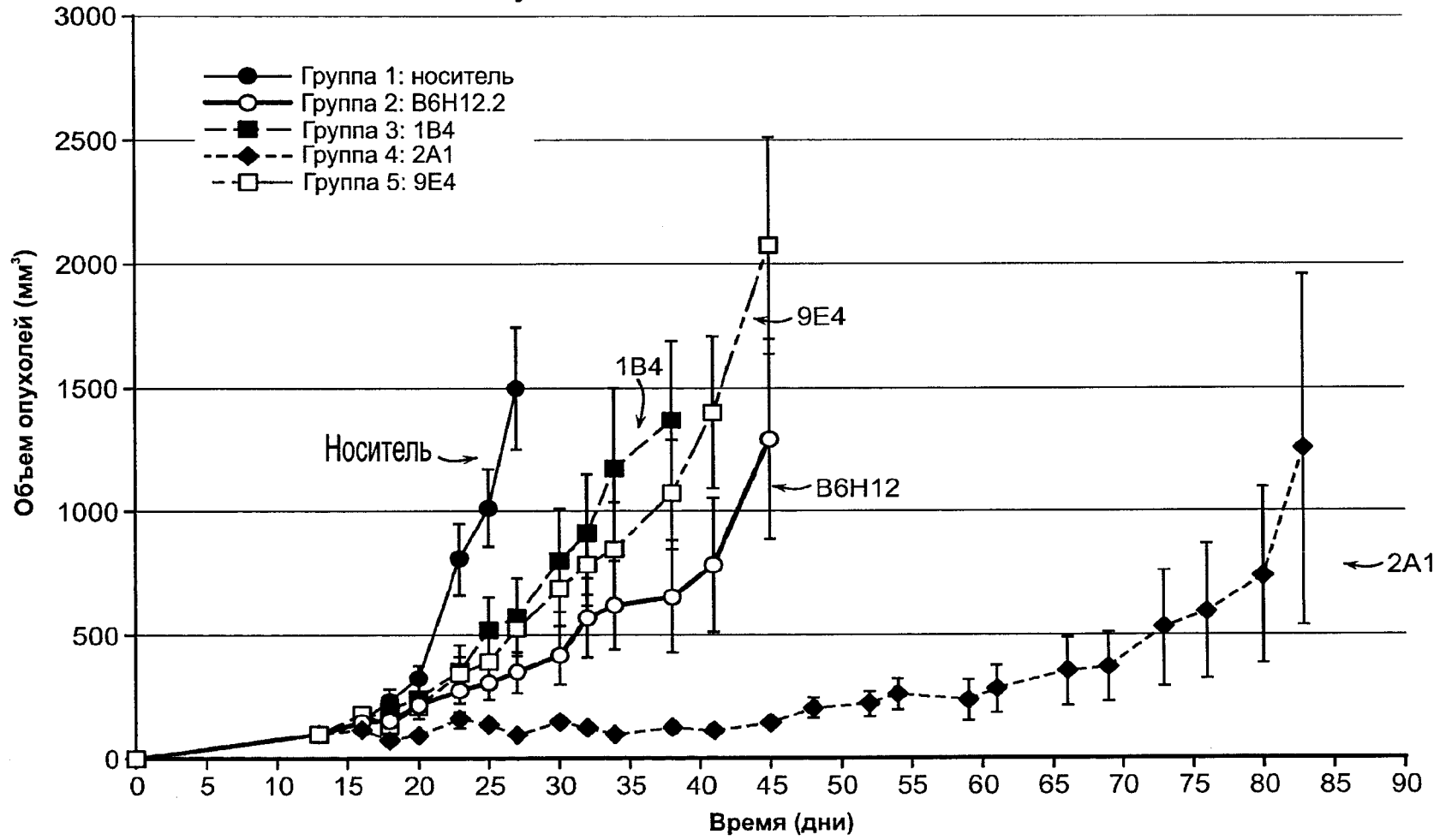
Фиг. 9В

Фагоцитоз клеток CCRF-CEM макрофагами MDM человека

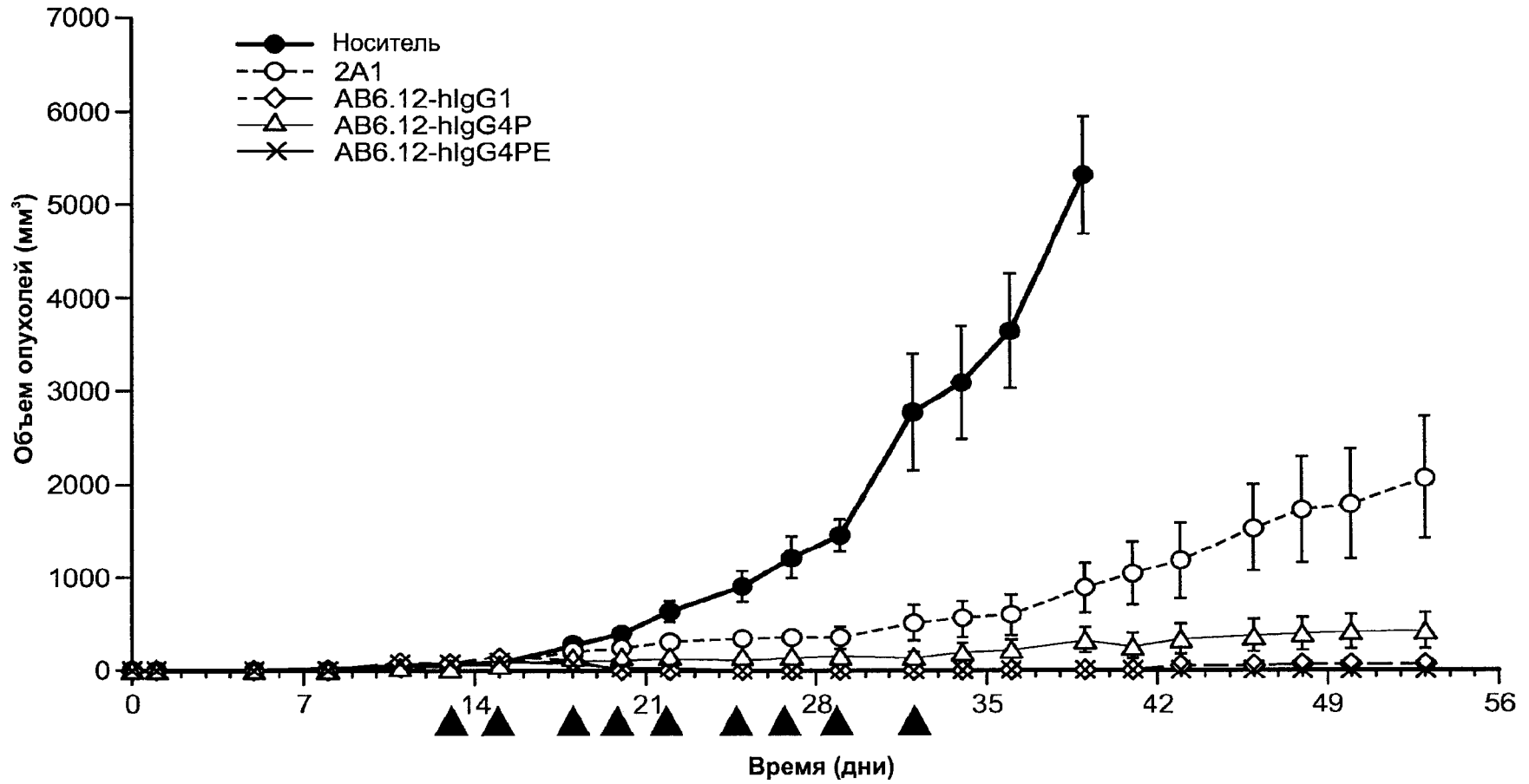


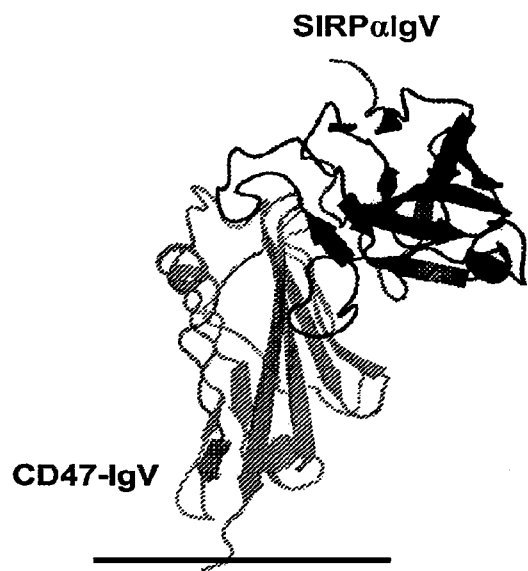
Фиг. 10А

Модель опухолей Раји: мышинные антитела к CD47

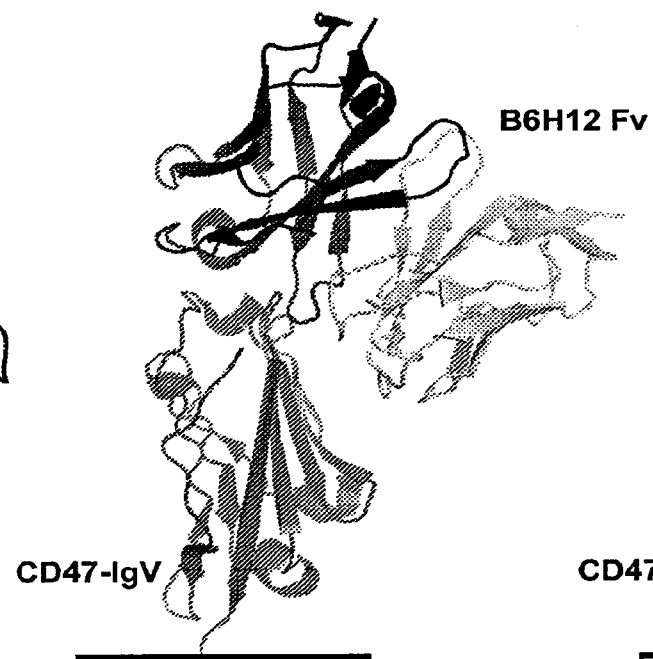


Фиг. 10В

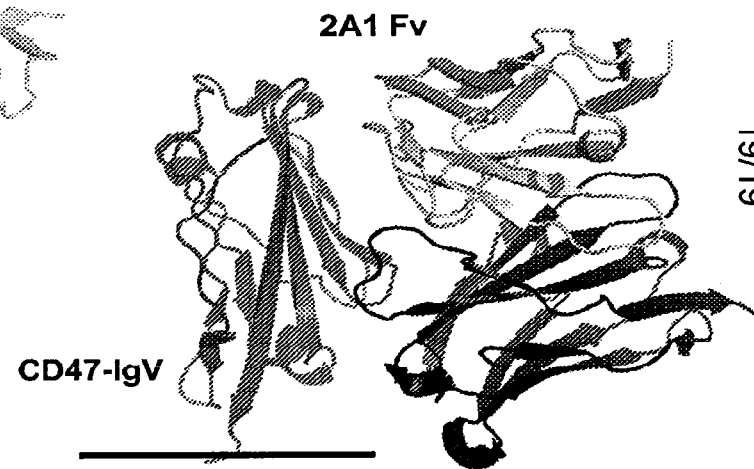




Фиг. 11А



Фиг. 11В



Фиг. 11С