



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/28 (2023.08); C07K 16/2803 (2023.08); A61K 39/3955 (2023.08); A61P 35/00 (2023.08); C12N 15/63 (2023.08); A61K 2039/505 (2023.08); C07K 2317/24 (2023.08); C07K 2317/33 (2023.08); C07K 2317/56 (2023.08); C07K 2317/565 (2023.08); C07K 2317/567 (2023.08); C07K 2317/71 (2023.08); C07K 2317/92 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2021116831, 15.11.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.11.2019

Дата регистрации:
25.01.2024

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
15.11.2018 EP 18206594.6

(43) Дата публикации заявки: 15.12.2022 Бюл. № 35

(45) Опубликовано: 25.01.2024 Бюл. № 3

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 15.06.2021

(86) Заявка РСТ:
EP 2019/081523 (15.11.2019)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2020/099653 (22.05.2020)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ВЕРХЕЙДЕН, Гейсбертус Франсискус
Мария (NL)

(73) Патентообладатель(и):
БАЙОНДИС Б.В. (NL)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2013056352 A1, 25.04.2013. US
2017073414 A1, 16.03.2017. LIU Y. et al.,
Functional Elements on SIRPa IgV Domain
Mediate Cell Surface Binding to CD47,
JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 2006,
vol. 365, no. 3, pp. 680 - 693. РАТНИКОВА Н.М.
и др., Рецептор CD47 как приоритетная
мишень для противораковой терапии,
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2017, Том
51, (см. прод.)

(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИ-SIRPα АНТИТЕЛА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложены гуманизированное антитело против SIRPα или его антигенсвязывающий фрагмент. Также предложены кодирующая антитело молекула нуклеиновой кислоты, клетка-хозяин для получения антитела, содержащая указанную молекулу нуклеиновой кислоты. Изобретение также относится к использованию

гуманизированных анти-SIRPα антител в лечении солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека, необязательно, в сочетании с дополнительными противораковыми терапевтическими средствами. Изобретение может быть использовано в противораковой терапии. 5 н. и 16 з.п. ф-лы, 14 ил., 17 табл.

(56) (продолжение):
Номер 2, стр.251-261.

R U 2 8 1 2 1 9 9 C 2

R U 2 8 1 2 1 9 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07K 16/28 (2023.08); *C07K 16/2803* (2023.08); *A61K 39/3955* (2023.08); *A61P 35/00* (2023.08); *C12N 15/63* (2023.08); *A61K 2039/505* (2023.08); *C07K 2317/24* (2023.08); *C07K 2317/33* (2023.08); *C07K 2317/56* (2023.08); *C07K 2317/565* (2023.08); *C07K 2317/567* (2023.08); *C07K 2317/71* (2023.08); *C07K 2317/92* (2023.08)

(21)(22) Application: **2021116831, 15.11.2019**(24) Effective date for property rights:
15.11.2019Registration date:
25.01.2024

Priority:

(30) Convention priority:
15.11.2018 EP 18206594.6(43) Application published: **15.12.2022 Bull. № 35**(45) Date of publication: **25.01.2024 Bull. № 3**(85) Commencement of national phase: **15.06.2021**(86) PCT application:
EP 2019/081523 (15.11.2019)(87) PCT publication:
WO 2020/099653 (22.05.2020)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**VERHEIJDEN, Gijsbertus Franciscus Maria
(NL)**

(73) Proprietor(s):

BYONDIS B.V. (NL)**(54) HUMANIZED ANTI-SIRP α ANTIBODIES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: humanized antibody against SIRP α or an antigen-binding fragment thereof are proposed. A nucleic acid molecule encoding the antibody and a host cell for producing the antibody containing said nucleic acid molecule are also proposed. The invention also relates to the use of humanized antibodies against

SIRP α in treatment of solid tumours and hematologic malignancies in humans, optionally in combination with additional anticancer therapeutic agents.

EFFECT: invention can be used in anticancer therapy.

21 cl, 14 dwg, 17 tbl

Область техники, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ изобретение

Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам против SIRP α и использованию этих антител в лечении рака, необязательно, в сочетании с противораковыми терапевтическими средствами.

5 ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

С конца 1990-х годов терапевтические антитела, которые узнают антигены на опухолевых клетках, доступны для лечения рака. Эти терапевтические антитела могут действовать против злокачественных клеток разными способами. Сигнальные пути, иницируемые связыванием антитела с его мишенью на злокачественных клетках, приводят к ингибированию клеточной пролиферации или к апоптозу. Fc-область терапевтического антитела может иницировать комплементзависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). Другим возможным механизмом может быть зависящая от антитела индукция Т-клеточного (CD8⁺ и/или CD4⁺) противоопухолевого ответа (антителозависимое представление антигена (ADAP); DiLillo and Ravetch *Cell* 2015, 161(5), 1035-1045; Bournazos and Ravetch *Immunity* 2017, 47(2), 224-233). Это происходит через Fc-рецепторы, экспрессируемые на антигенпредставляющих клетках, таких как, например, дендритные клетки. Однако терапевтические антитела часто недостаточно эффективны в виде монотерапии. Одна из возможностей повышения эффективности терапевтических антител связана с усилением ADCC и/или ADCP. Например, это было выполнено путем повышения аффинности Fc-области для Fc γ -рецепторов, например, за счет аминокислотных замен (Richards *et al. Mol. Cancer Ther.* 2008, 7(8), 2517-2527) или за счет изменения гликозилирования Fc-области (Hayes *et al. J. Inflamm. Res.* 2016, 9, 209-219).

Другим способом усиления ADCC и/или ADCP терапевтического антитела является объединение терапевтического антитела с антагонистическим антителом против сигнального регуляторного белка α (SIRP α) или анти-CD47 антителом (WO2009/131453). Когда CD47 - экспрессия которого, как установлено, повышена в, и/или на, человеческих опухолях по меньшей мере нескольких видов - связывается с ингибирующим иммунорецептором SIRP α , экспрессируемым на моноцитах, макрофагах, дендритных клетках и нейтрофилах, SIRP α передает ингибирующий сигнал, который предотвращает разрушение раковых клеток путем фагоцитоза или другого зависящего от Fc-рецептора механизма разрушения клеток, присущего иммунным эффекторным клеткам. Один из механизмов, посредством которого анти-CD47 или анти-SIRP α антитела предположительно действуют, включает блокирование ингибирующей сигнализации, создаваемой по оси CD47-SIRP α , что приводит к усилению ADCC и/или ADCP, и/или ADAP (Tjeng *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 2013, 110(27), 11103-11108; Liu *et al. Nature Med.* 2015, 21(10), 1209-1215).

Большинство клинических исследований, относящихся к взаимодействию CD47-SIRP α , были сосредоточены на анти-CD47 антителах в качестве как монотерапии, так и терапии в сочетании с терапевтическим антителом (Weiskopf. *Eur. J. Cancer* 2017, 76, 100-109; Advani *et al. N. Engl. J. Med.* 2018, 379(18), 1711-1721). Количество исследований, посвященных анти-CD47 антителам в качестве противораковых лекарственных средств, растет, несмотря на тот факт, что CD47 широко экспрессируется на поверхности клеток в большинстве нормальных тканей.

Ни одно клиническое исследование не было посвящено противораковой монотерапии или комбинированной терапии с использованием анти-SIRP α антител. Большинство исследований анти-SIRP α антител представляют собой механистические исследования

взаимодействия CD47-SIRP α и были проведены с использованием мышинных анти-SIRP α антител; например, мышинные 12C4 и 1.23A, по сообщениям, приводят к усилению опосредованной нейтрофилами ADCC трастузумаб-опсонизированных клеток SKBR3 (Zhao *et al. PNAS* 2011, 108(45), 18342-18347). В WO2015/138600 описано мышинное антитело против человеческого SIRP α KWAR23 и его химерный Fab-фрагмент, которые, как сообщалось, приводят к усилению опосредованного цетуксимабом фагоцитоза *in vitro*. Гуманизированное KWAR23 с Fc-фрагментом человеческого IgG1, имеющим мутацию N297A, описано в WO2018/026600. В WO2013/056352 описано IgG4 29AM4-5 и другие IgG4 антитела против человеческого SIRP α . IgG4 29AM4-5, вводимое три раза в неделю в течение четырех недель в дозе 8 мг/кг, приводило к уменьшению лейкозного приживления первичных человеческих клеток острого миелоидного лейкоза (AML), введенных инъекций в правое бедро мышам NOD scid гамма (NSG). В WO2017/178653 описано химерное анти-SIRP α антитело HEFLB, которое связывает SIRP α_1 и SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$, но не SIRP γ . Однако, хотя антитело сохраняет связывание с SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ при гуманизации, оно перестает связывать SIRP α_1 . Поскольку, например, 51,3% представителей белой европеоидной расы имеют по меньшей мере 1 аллель SIRP α_1 , их иммунные клетки (по меньшей мере частично в случае гетерозиготности) не реагируют на антитело, связывающее только SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ (Treffers *et al. Eur J Immunol.* 2018, 48(2), 344-354). В WO2018/057669 описаны гуманизированные куриные анти-SIRP α антитела против домена 1 человеческого SIRP α_1 и/или человеческого SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$. В WO2018/107058 описано, что мышинные анти-SIRP α антитела 3F9 и 9C2 не связывают SIRP $\beta_{1\text{V}1}$, и сделан вывод о том, что, следовательно, эти антитела являются SIRP α -специфическими, с равновесными константами связывания $1,0 \times 10^{-8}$ и $8,0 \times 10^{-8}$ М, соответственно. В WO2018/190719 описаны гуманизированные анти-SIRP α антитела, которые также связывают человеческий SIRP γ , но не связывают человеческий SIRP β_1 .

Человеческий SIRP α является в высокой степени полиморфным в его NH₂-концевом лиганд-связывающем домене (Takenaka *et al. Nature Immun.* 2007, 8(12), 1313-1323): SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ (v1) и SIRP α_1 (v2) являются двумя наиболее распространенными и наиболее различающимися (различаются 13 остатков) полиморфными формами, и показатели их аффинности для CD47 являются очень схожими (Hatherley *et al. J. Biol. Chem.* 2014, 289(14), 10024-10028; Treffers *et al. Eur J Immunol.* 2018, 48(2), 344-354). Другими биохимически охарактеризованными представителями семейства человеческого SIRP являются SIRP β_1 , который не связывает CD47 и имеет по меньшей мере два полиморфных варианта (SIRP $\beta_{1\text{V}1}$ и SIRP $\beta_{1\text{V}2}$), и SIRP γ , который экспрессируется на Т-клетках и активированных NK-клетках и связывает CD47 с примерно в 10 раз более низкой аффинностью, чем SIRP α (van Beek *et al. J Immunol.* 2005, 175(12), 7781-7). Взаимодействие CD47-SIRP γ вовлечено в контакт между антигенпредставляющими клетками и Т-клетками, соответственно, с костимуляцией Т-клеточной активации и стимуляцией Т-клеточной пролиферации (Piccio *et al. Blood* 2005, 105, 2421-2427). Кроме того, взаимодействия CD47-SIRP γ играют определенную роль в трансэндотелиальной миграции Т-клеток (Stefanidakis *et al. Blood* 2008, 112, 1280-1289).

Недостатком анти-SIRP α антител, известных в данной области, является то, что они либо (i) не специфичны для человеческого SIRP α , поскольку они связываются с другими представителями семейства человеческого SIRP, такими как человеческий SIRP γ , что может приводить к нежелательным побочным эффектам, либо (ii) они слишком

ограничены в своей специфичности, связывая лишь один из аллельных вариантов $SIRP\alpha$ - например, $SIRP\alpha_{BIT}$ или $SIRP\alpha_1$ - что делает их менее подходящими для моно- или комбинированной терапии, поскольку часть популяции людей имеет аллельный вариант $SIRP\alpha$, который анти- $SIRP\alpha$ антитело не связывает. Например, антитела предшествующего уровня техники KWAR23, SE5A5, 29AM4-5 и 12C4 являются неспецифическими, поскольку они также связывают человеческий $SIRP\gamma$, что может отрицательно влиять на Т-клеточную пролиферацию и рекрутинг. И наоборот, мАт 1.23А, например, является слишком специфическим и узнает только полиморфный вариант $SIRP\alpha_1$ человеческого $SIRP\alpha$, но не вариант $SIRP\alpha_{BIT}$, который является преобладающим по меньшей мере в популяции людей белой европеоидной расы (Zhao *et al. PNAS* 2011, 108(45), 18342-18347; Treffers *et al. Eur J Immunol.* 2018, 48(2), 344-354). Кроме того, гуманизованное антитело HEFLB, описанное в WO2017/178653, является слишком специфическим, поскольку данное антитело не связывает $SIRP\alpha_1$ (измерения методом ППП; смотри раздел «Примеры») и не стимулирует противоопухолевую активность иммунных эффекторных клеток от носителей $SIRP\alpha_1$, даже в случае присутствия одного аллеля $SIRP\alpha_{BIT}$ (Фигура 3).

Только в опубликованном позже WO2018/210793 описано несколько антагонистических химерных анти- $SIRP\alpha$ антител, которые демонстрируют специфическое связывание с двумя преобладающими полиморфными вариантами $SIRP\alpha$, $SIRP\alpha_{BIT}$ и $SIRP\alpha_1$, которые не связывают $SIRP\gamma$ и которые приводят к усилению ADCC терапевтических антител (антитела 2-9). В Таблице 1 в WO2018/210793 приведены гуманизованные варианты для двух из химерных антител (антитела 10-16).

В заключение, в данной области все-еще сохраняется потребность в новых и усовершенствованных анти- $SIRP\alpha$ антителах, которые полезны в противораковой терапии, либо отдельно, либо в сочетании с дополнительным терапевтическим противораковым антителом. Более конкретно, сохраняется потребность в антагонистических анти- $SIRP\alpha$ антителах, которые не имеют, имеют низкое или пониженное связывание с человеческим $SIRP\gamma$, что уменьшает риск нежелательных побочных эффектов, и в анти- $SIRP\alpha$ антителах, которые связывают как человеческий $SIRP\alpha_1$, так и человеческий $SIRP\alpha_{BIT}$, полиморфные варианты, что делает их подходящими для большей части популяции людей, которые имеют гетерозиготы $SIRP\alpha_1/SIRP\alpha_{BIT}$, гомозиготы $SIRP\alpha_{BIT}$ и гомозиготы $SIRP\alpha_1$. Существует потребность в анти- $SIRP\alpha$ антителах с такими характеристиками, которые также уменьшают ингибирующую, то есть, SHP-1 и/или SHP-2-опосредованную сигнализацию $SIRP\alpha$. Такие антитела подходят для использования в противораковой терапии, либо отдельно, либо, предпочтительно, в сочетании с терапевтическим противораковым антителом.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к гуманизованным антителам против $SIRP\alpha$, которые подходят для использования в противораковой терапии отдельно или, предпочтительно, в сочетании с таким видом противораковой терапии, как терапевтическое противораковое антитело.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к гуманизованному анти- $SIRP\alpha$ антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит:

- a. HCDR1, содержащую SEQ ID NO:36;
- b. HCDR2, содержащую SEQ ID NO:44;
- c. HCDR3, содержащую SEQ ID NO:45;
- d. LCDR1, содержащую SEQ ID NO:39;
- 5 e. LCDR2, содержащую SEQ ID NO:40; и
- f. LCDR3, содержащую SEQ ID NO:41.

В предпочтительном варианте осуществления анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, имеет одно или более свойств из группы, состоящей из следующего: (a) анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывает человеческий SIRP α_1 с аффинностью связывания, составляющей по меньшей мере 10^{-10} М, предпочтительно по меньшей мере 10^{-11} М, в анализе поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (предпочтительно BiaCore™) при 25°C с использованием внеклеточного домена человеческого SIRP α_1 , приведенного в SEQ ID NO:51; (b) анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывает человеческий SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ с аффинностью связывания, составляющей по меньшей мере 10^{-10} М, предпочтительно по меньшей мере 10^{-11} М, в анализе ППР (предпочтительно BiaCore™) при 25°C с использованием внеклеточного домена человеческого SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$, приведенного в SEQ ID NO:52; (c) анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывает SIRP α яванского макака с аффинностью связывания, составляющей по меньшей мере 10^{-8} М, предпочтительно по меньшей мере 10^{-9} М, в анализе ППР (предпочтительно BiaCore™) при 25°C с использованием внеклеточного домена SIRP α яванского макака, приведенного в SEQ ID NO:56; (d) анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, не связывает человеческий SIRP γ при измерении методом Т-клеточного связывания с использованием проточной цитометрии, предпочтительно с использованием окрашивания и активированной флуоресценцией сортировки клеток (FACS); (e) анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, не связывает человеческий SIRP γ в анализе ППР (предпочтительно BiaCore™) при 25°C с использованием внеклеточного домена человеческого SIRP γ , приведенного в SEQ ID NO:55; и (f) анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, не является иммуногенным при определении IL-2 методом иммуноферментных пятен (ELISpot) и/или в анализе Т-клеточной пролиферации.

В предпочтительном варианте осуществления гуманизованное анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент: (a) связывает человеческий SIRP α_1 с аффинностью связывания, составляющей по меньшей мере 10^{-10} М, предпочтительно по меньшей мере 10^{-11} М, в анализе ППР (предпочтительно BiaCore™) при 25°C с использованием внеклеточного домена человеческого SIRP α_1 , приведенного в SEQ ID NO:51; (b) связывает человеческий SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ с аффинностью связывания, составляющей по меньшей мере 10^{-10} М, предпочтительно по меньшей мере 10^{-11} М, в анализе ППР (предпочтительно BiaCore™) при 25°C с использованием внеклеточного домена человеческого SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$, приведенного в SEQ ID NO:52; (c) блокирует связывание CD47 с SIRP α_1 и SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$, предпочтительно в анализе диссоциации от иммобилизованного CD47 методом ППР (предпочтительно BiaCore™), более предпочтительно как описано в Примере 6; и (d) не связывает человеческий SIRP γ при измерении в анализе окрашивания и проточной цитометрии Т-клеток, предпочтительно при окрашивании

с активированной флуоресценцией сортировкой клеток (FACS).

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к гуманизированному анти-SIRP α антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, в котором: (а) переменный домен тяжелой цепи антитела содержит 4 каркасные области тяжелой цепи, HFR1-HFR4, и 3 определяющие комплементарность области HCDR1-HCDR3, которые функционально связаны в следующем порядке HFR1-HCDR1-HFR2-HCDR2-HFR3-HCDR3-HFR4, где каждая из каркасных областей тяжелой цепи имеет по меньшей мере 90% аминокислотную идентичность с аминокислотной последовательностью каркаса SEQ ID NO:8, или где HFR1-HFR4 отличаются от SEQ ID NO:8 одной или более аминокислотными заменами, как указано в Таблицах 8-11; и (б) переменный домен легкой цепи антитела содержит 4 каркасные области легкой цепи, LFR1-LFR4, и 3 определяющие комплементарность области LCDR1-LCDR3, которые функционально связаны в следующем порядке LFR1-LCDR1-LFR2-LCDR2-LFR3-LCDR3-LFR4, где каждая из каркасных областей легкой цепи имеет по меньшей мере 90% аминокислотную идентичность с аминокислотной последовательностью каркаса SEQ ID NO:9, или где LFR1, LFR2 и/или LFR4 отличаются от SEQ ID NO:9 одной или более аминокислотными заменами, как указано в Таблицах 12-14.

В предпочтительном варианте осуществления гуманизированное анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по изобретению, содержит аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи (HCVR) и переменной области легкой цепи (LCVR), где анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID NO:8 и аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO:9.

В предпочтительном варианте осуществления гуманизированное анти-SIRP α антитело по изобретению содержит модифицированную Fc-область, которая проявляет пониженное связывание с человеческим Fc α или Fc γ -рецептором в сравнении с таким же анти-SIRP α антителом, содержащим Fc-область дикого типа, предпочтительно, с понижением по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%, или понижением на 100%. В предпочтительном варианте осуществления модифицированная Fc-область человеческого IgG1 имеет аминокислотную замену в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из L234, L235, G237, D265, D270, N297, A327, P328 и P329 в соответствии с нумерацией Eu. Более предпочтительно, модифицированная Fc-область человеческого IgG1 имеет аминокислотные замены: L234A и L235A; L234E и L235A; L234A, L235A и P329A; или L234A, L235A и P329G. Более предпочтительно, антитело имеет аминокислотные замены L234A и L235A или L234E и L235A. Наиболее предпочтительно, антитело имеет аминокислотные замены L234A и L235A. В предпочтительном варианте осуществления Fc-область человеческого IgG не имеет другие аминокислотные замены.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей гуманизированное анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по изобретению и фармацевтически приемлемый эксципиент.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-SIRP α антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для использования в качестве лекарственного препарата.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-SIRP α антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для использования в лечении рака, где

лечение также включает введение терапевтического антитела, где рак предпочтительно представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование человека. Предпочтительно, терапевтическое антитело направлено против связанной с мембраной мишени на поверхности опухолевых клеток и содержит человеческую Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках.

В предпочтительном варианте осуществления солидную опухоль человека выбирают из группы, состоящей из (HER2-положительного) рака молочной железы, (EGFR-положительной) карциномы толстой кишки, (GD2-положительной) нейробластомы, меланомы, остеосаркомы, (CD20-положительных) В-клеточных лимфом, (CD38-положительной) множественной миеломы, (CD52-положительной) лимфомы, (CD33-положительного) острого миелоидного лейкоза (AML), хронического миелоидного лейкоза (CML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), неходжжеской лимфомы (NHL), включая фолликулярную лимфому (FL) и диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), печеночно-клеточной карциномы, множественной миеломы (MM), рака мочевого пузыря, рака желудка, рака яичника, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, почечной карциномы, рака предстательной железы, печеночно-клеточной карциномы и рака легкого. В предпочтительном варианте лечение включает введение дополнительного противоракового терапевтического средства, такого как, например, направленное терапевтическое средство, предпочтительно иммунотерапевтическое средство.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую гуманизированное анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по изобретению, где, предпочтительно, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере одну из HCVR и LCVR антитела, и где, предпочтительно, кодирующая нуклеотидная последовательность функционально связана с регуляторными последовательностями для экспрессии кодирующей нуклеотидной последовательности в клетке-хозяине.

В шестом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Связывание антител с экспрессирующими SIRP γ человеческими CD3⁺ Т-клетками методом проточной цитометрии. Данные представлены в виде средней интенсивности флуоресценции (СИФ) (Фигура 1a) и процентного содержания (%) положительных клеток (Фигура 1b). Символы представляют результаты измерения для двух здоровых индивидуумов.

Фигура 2. Сравнение ADCC, измеренной в % цитотоксичности только трастузумаба (Tmab), трастузумаба в сочетании с мышинным анти-SIRP α антителом 12C4 (mu12C4), трастузумаба в сочетании с антителом, в котором переменные области мышинового 12C4 привиты на константную область человеческого IgG1 (12C4huIgG1), и трастузумаба в сочетании с антителом, в котором переменные области мышинового 12C4 привиты на константную область человеческого IgG1, имеющую аминокислотные замены L234A и L235A (12C4huIgG1LALA; в настоящем документе также обозначаемым 12C4-LALA), с использованием клеток SKBR3 HER2-положительного рака молочной железы в качестве клеток-мишеней и человеческих нейтрофилов в качестве эффекторных клеток. Нейтрофилы получали от людей-доноров, имеющих два аллеля SIRP α _{WT}. Использовали возрастающие концентрации трастузумаба: 0, 0,05, 0,5 и 5 мкг/мл, соответственно, а

также возрастающие концентрации каждого анти-SIRP α антитела (0,2, 2 и 20 мкг/мл, соответственно).

5 Фигура 3. Опосредованная нейтрофилами ADCC в отношении трастузумаб-опсонизированных (Tmab; 10 мкг/мл) клеток SKBR3 в сочетании с анти-SIRP α антителами предшествующего уровня техники в разных концентрациях (мкг/мл; кривые доза-ответ). Нейтрофилы получали от гетерозиготных доноров-людей, имеющих один аллель SIRP α_1 и один аллель SIRP α_{WT} . Каждый отдельный донор нейтрофилов обозначен символом. Колонки представляют собой средние значения для всех доноров. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные 10 мкг/мл раствором трастузумаба. Данные нормализованы к ответу на трастузумаб (принятому за 100%). Эксперимент проводили с нейтрофилами, стимулированными O/N с G-CSF и IFN γ . Цитотоксичность измеряли в анализе цитотоксичности DELFIA.

10 Фигура 4. Опосредованная нейтрофилами ADCC в отношении трастузумаб-опсонизированных (Tmab; 10 мкг/мл) клеток SKBR3 в сочетании с анти-SIRP α антителами 1-6 по изобретению, имеющими константную область человеческого IgG1, имеющую аминокислотные замены L234A и L235A, в разных концентрациях (мкг/мл; кривые доза-ответ). Нейтрофилы получали от людей-доноров, имеющих один аллель SIRP α_1 и один аллель SIRP α_{WT} . Каждый отдельный донор нейтрофилов обозначен символом. Колонки представляют собой средние значения для всех доноров. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные 10 мкг/мл раствором трастузумаба. Данные нормализованы к ответу на трастузумаб (принятому за 100%). Эксперимент проводили с нейтрофилами, стимулированными O/N с G-CSF и IFN γ . Цитотоксичность измеряли в анализе цитотоксичности DELFIA.

20 Фигура 5. Опосредованная нейтрофилами ADCC в отношении трастузумаб-опсонизированных (Tmab; 10 мкг/мл) клеток SKBR3 в сочетании с анти-SIRP α антителами 7-13 по изобретению, имеющими константную область человеческого IgG1, имеющую аминокислотные замены L234A и L235A, в разных концентрациях (мкг/мл; кривые доза-ответ). Нейтрофилы получали от людей-доноров, имеющих один аллель SIRP α_1 и один аллель SIRP α_{WT} . Каждый отдельный донор нейтрофилов обозначен символом. Колонки представляют собой средние значения для всех доноров. Данные нормализованы к ответу на трастузумаб (принятому за 100%). Эксперимент проводили с нейтрофилами, стимулированными O/N с G-CSF и IFN γ . Цитотоксичность измеряли в анализе цитотоксичности DELFIA.

25 Фигура 6. Опосредованная нейтрофилами ADCC в отношении трастузумаб-опсонизированных (Tmab; 10 мкг/мл) клеток SKBR3 в сочетании с анти-SIRP α антителами предшествующего уровня техники в разных концентрациях (мкг/мл; кривые доза-ответ). Нейтрофилы получали от людей-доноров, имеющих два аллеля SIRP α_1 . Каждый отдельный донор нейтрофилов обозначен символом. Колонки представляют собой средние значения для всех доноров. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные 10 мкг/мл раствором трастузумаба. Данные нормализованы к ответу на трастузумаб (принятому за 100%). Эксперимент проводили с нейтрофилами, стимулированными в течение 100 мин GM-CSF, и цитотоксичность измеряли в анализе высвобождения ^{51}Cr .

40 Фигура 7. Опосредованная нейтрофилами ADCC в отношении трастузумаб-опсонизированных (Tmab; 10 мкг/мл) клеток SKBR3 в сочетании с анти-SIRP α антителами 7-13 по изобретению, имеющими константную область человеческого IgG1, имеющую аминокислотные замены L234A и L235A, в разных концентрациях (мкг/мл;

кривые доза-ответ). Нейтрофилы получали от людей-доноров, имеющих два аллеля $SIRP\alpha_1$. Каждый отдельный донор нейтрофилов обозначен символом. Колонки представляют собой средние значения для всех доноров. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные 10 мкг/мл раствором трастузумаба. Данные нормализованы к ответу на трастузумаб (принятому за 100%). Эксперимент проводили с нейтрофилами, стимулированными в течение 100 мин GM-CSF, и цитотоксичность измеряли в анализе высвобождения ^{51}Cr .

Фигура 8. Опосредованная нейтрофилами ADCC в отношении трастузумаб-опсонизированных (Tmab; 10 мкг/мл) клеток SKBR3 в сочетании с анти- $SIRP\alpha$ антителами предшествующего уровня техники в разных концентрациях (мкг/мл; кривые доза-ответ). Нейтрофилы получали от людей-доноров, имеющих два аллеля $SIRP\alpha_{\text{WT}}$. Каждый отдельный донор нейтрофилов обозначен символом. Колонки представляют собой средние значения для всех доноров. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные 10 мкг/мл раствором трастузумаба. Данные нормализованы к ответу на трастузумаб (принятому за 100%). Эксперимент проводили с нейтрофилами, стимулированными в течение 100 мин GM-CSF, и цитотоксичность измеряли в анализе высвобождения ^{51}Cr .

Фигура 9. Опосредованная нейтрофилами ADCC в отношении трастузумаб-опсонизированных (Tmab; 10 мкг/мл) клеток SKBR3 в сочетании с анти- $SIRP\alpha$ антителами 1-6 по изобретению, имеющими константную область человеческого IgG1, имеющую аминокислотные замены L234A и L235A, в разных концентрациях (мкг/мл; кривые доза-ответ). Нейтрофилы получали от людей-доноров, имеющих два аллеля $SIRP\alpha_{\text{WT}}$. Каждый отдельный донор нейтрофилов обозначен символом. Колонки представляют собой средние значения для всех доноров. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные 10 мкг/мл раствором трастузумаба. Данные нормализованы к ответу на трастузумаб (принятому за 100%). Эксперимент проводили с нейтрофилами, стимулированными в течение 100 мин GM-CSF, и цитотоксичность измеряли в анализе высвобождения ^{51}Cr .

Фигура 10a-d. Связывание указанных анти- $SIRP\alpha$ антител с гранулоцитами (левые панели), $CD14^+$ моноцитами (средние панели) и $CD3^+$ Т-клетками (правые панели) при определении методом проточной цитометрии в цельной крови репрезентативного здорового гетерозиготного $SIRP\alpha_1/SIRP\alpha_{\text{WT}}$ донора. Соответствующий контроль по изотипу для каждого анти- $SIRP\alpha$ антитела приведен в каждой графе. Данные представлены в виде средней интенсивности флуоресценции (СИФ).

Фигура 11. Связывание указанных анти- $SIRP\alpha$ антител с экспрессирующими $SIRP\gamma$ человеческими $CD3^+$ Т-клетками, выделенными из лейкоцитарных пленок здорового донора, при определении методом проточной цитометрии. Соответствующий контроль по изотипу для каждого анти- $SIRP\alpha$ антитела приведен в каждой графе. Данные представлены в виде средней интенсивности флуоресценции (СИФ).

Фигура 12a. Рекрутинг SHP-1 к $SIRP\alpha$, измеренный в виде относительных единиц люминесценции (ОЕЛ), с использованием клеток Jurkat с сигнализацией $SIRP\alpha_{\text{WT}}$ и клеток Jurkat Е6.1 в качестве клеток с лигандом CD47, в отсутствие или в присутствии антитела 6 в диапазоне концентраций или контроля по изотипу. % максимального сигнала определяли следующим образом: (ОЕЛ/ОЕЛ максимальной стимуляции (без антитела) * 100). Результаты представлены в виде средних значений \pm SEM из двух

независимых экспериментов.

Фигура 12b. Уровни эффективности указанных анти-SIRP α антител в концентрации 3,3 мкг/мл при ингибировании сигнализации SIRP α _{ВГТ}, измеренные с использованием клеток Jurkat с сигнализацией SIRP α _{ВГТ} и клеток Jurkat E6.1 в качестве клеток с лигандом CD47. Уровни эффективности рассчитывали следующим образом: 100% - значение «% максимального сигнала» соединения в концентрации 3,3 мкг/мл. Результаты представлены в виде средних значений \pm SEM из двух независимых экспериментов.

Фигура 13a-b. Опосредованная нейтрофилами ADCC в отношении трастузумаб-опсонизированных (10 мкг/мл) клеток SKBR3 в сочетании с анти-SIRP α антителом 6 по изобретению и указанными контрольными антителами. Нейтрофилы получали от людей-доноров, имеющих два аллеля SIRP α _{ВГТ}, имеющих два аллеля SIRP α ₁ или имеющих один аллель SIRP α _{ВГТ} и один аллель SIRP α ₁. Колонки представляют собой средние значения для всех доноров \pm SEM. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные 10 мкг/мл раствором трастузумаба. Для каждого антитела строили кривые доза-ответ, используя концентрации 10, 1, 0,1 и 0,01 мкг/мл (слева направо). Антитело 6 и контрольные антитела показаны на панели (a); контроли по изотипу показаны на панели (b). Данные нормализованы к ответу на трастузумаб (принятому за 100%). Эксперимент проводили, как указано в экспериментальном разделе 10.

Фигура 14a-b. Опосредованная нейтрофилами ADCC в отношении цетуксимаб-опсонизированных (5 мкг/мл) клеток A431 в сочетании с анти-SIRP α антителом 6 по изобретению и указанными контрольными антителами. Нейтрофилы получали от людей-доноров, имеющих два аллеля SIRP α _{ВГТ}, имеющих два аллеля SIRP α ₁ или имеющих один аллель SIRP α _{ВГТ} и один аллель SIRP α ₁. Колонки представляют собой средние значения для всех доноров. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные 5 мкг/мл раствором цетуксимаба. Для каждого антитела строили кривые доза-ответ, используя концентрации 10, 1, 0,1 и 0,01 мкг/мл (слева направо). Антитело 6 и контрольные антитела показаны на панели (a); контроли по изотипу показаны на панели (b). Данные нормализованы к ответу на цетуксимаб (принятому за 100%). Эксперимент проводили, как указано в экспериментальном разделе 10.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Используемый в настоящей спецификации термин «антитело» относится к моноклональному антителу (mAb), содержащему две тяжелые цепи и две легкие цепи. Антитела могут иметь любой изотип, например, IgA, IgE, IgG или IgM антитела. Антитела также могут иметь перекрестный изотип IgGA (Kelton *et al. Chemistry and Biology*, 2014, 21, 1603-1609). Предпочтительно, антитело представляет собой IgG антитело, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 антитело, более предпочтительно IgG1 или IgG2 антитело. В настоящем документе термин «иммуноглобулин» (Ig) используют взаимозаменяемо с термином «антитело». Антитело по изобретению предпочтительно представляет собой гуманизированное или человеческое антитело.

Базовое 4-цепочечное антитело представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей (IgM антитело состоит из 5 базовых гетеротетрамерных единиц наряду с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, и, таким образом, имеет 10 антигенсвязывающих сайтов, в то время как секретируемые IgA антитела могут полимеризоваться, с

образованием поливалентных структур, содержащих 2-5 базовых 4-цепочечных единиц наряду с J-цепью). В случае IgG 4-цепочечная единица, как правило, имеет молекулярную массу примерно 150000 Дальтон. Каждая L-цепь связана с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, где две H-цепи связаны друг с другом одной или более дисульфидными связями в зависимости от изоформа H-цепи. Однако IgG могут быть лишены одной или более из дисульфидных связей, сохраняя где свою функцию. Каждая H и L-цепь также имеет регулярно разнесенные в пространстве внутрицепочечные дисульфидные связи. Каждая H-цепь имеет N-конец, переменный домен (VH), за которым следуют три константных домена (CH) для каждой из α и γ -цепей, и четыре CH-домена для изоформ μ и ϵ . Как правило, H-цепь содержит шарнирную область, как правило, между первой и второй константными областями. Каждая L-цепь имеет N-конец, переменный домен (VL), за которым следует константный домен (CL) на другом ее конце. VL выровнена с VH, и CL выровнена с первым константным доменом тяжелой цепи (CH1). Считается, что конкретные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между переменными доменами L-цепи и H-цепи. При спаривании VH и VL образуется один антигенсвязывающий сайт. Для информации о структуре и свойствах разных классов антител, смотри, например, Basic and Clinical Immunology, 8-е издание, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, page 71 and Chapter 6 (1994).

L-цепь у любого вида позвоночных животных может быть отнесена к одному из двух четко отличающихся видов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (CH) иммуноглобулины могут быть отнесены к разным классам или изоформам. Существуют пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющих тяжелые цепи, обозначенные α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Классы α и γ дополнительно разделены на подклассы на основании относительно незначительных различий в последовательности и функции CH, например, у человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA₁ и IgA₂.

Предпочтительно, антитело по изобретению представляет собой гуманизованное или человеческое антитело. Даже более предпочтительно, антитело представляет собой гуманизованное или человеческое IgG антитело, наиболее предпочтительно гуманизованное или человеческое IgG1 мАт. Антитело может иметь легкие цепи κ или λ , предпочтительно легкие цепи κ (например, приведенные в SEQ ID NO:26), то есть, гуманизованное или человеческое IgG1- κ антитело. Антитело по изобретению может содержать константную область, которая была генетически модифицирована, например, могли быть внесены одна или более мутаций, например, для увеличения периода полураспада и/или уменьшения эффекторной функции.

Используемые в настоящем документе термины «моноклональное антитело» и «мАт» относятся к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, то есть, отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Определение «моноклональное» не означает, что антитело должно быть получено обязательно каким-либо конкретным методом. В данной области известно несколько методов получения моноклональных антител. Например, моноклональные антитела, используемые по настоящему изобретению, можно получать путем иммунизации животных смесью пептидов, представляющих нужный антиген. Затем В-лимфоциты можно выделять и проводить их слияние с клетками миеломы, или

одиночные В-лимфоциты можно культивировать в течение нескольких дней в присутствии кондиционированной среды и питающих клеток. Супернатанты миеломы или В-лимфоцитов, содержащие продуцированные антитела, тестируют для отбора подходящих В-лимфоцитов или гибридом. Моноклональные антитела можно получать из соответствующих гибридом методом с использованием гибридом, впервые описанным Köhler *et al.* *Nature* 1975, 256, 495-497. Альтернативно, соответствующие В-клетки или лимфоциты можно лизировать, выделять РНК, проводить обратную транскрипцию и секвенировать. Антитела можно получать методами рекомбинантных ДНК в клетках бактерий, эукариотических клетках животных или клетках растений (смотри, например, патент США № 4816567).

Термин «вариабельная область», или «вариабельный домен», антитела относится к аминоконцевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Термин «вариабельные» отражает тот факт, что некоторые сегменты вариабельных доменов сильно отличаются по своей последовательности у разных антител. Вариабельный домен опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела для его конкретного антигена. Однако вариабельность не равномерно распределена на протяжении примерно 110 аминокислот вариабельных доменов. Вместо этого, вариабельные области состоят из относительно неизменных участков, называемых каркасными областями (FR) из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими областями с чрезвычайно сильной вариабельностью, называемыми «гипервариабельные области» (HVR) или «определяющие комплементарность области» (CDR), каждая из которых имеет длину примерно 9-12 аминокислот, однако может быть короче или длиннее, как, например, HCDR1 в МАт по настоящему изобретению, которая имеет длину 5 аминокислотных остатков. Каждый из вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей природных антител содержит четыре FR, в значительной степени принимающие конфигурацию β-листа, соединенные тремя CDR, которые образуют петли, соединяющие, и в некоторых случаях образующие часть, структуры β-листа. Области CDR в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости за счет FR и, с CDR другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антител (смотри Kabat *et al.* *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. 1991). Константные домены не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но осуществляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в ADCC и/или ADCP. Вариабельный домен тяжелой цепи можно называть «VH». Вариабельный домен легкой цепи можно называть «VL».

Используемый в настоящей спецификации термин «антигенсвязывающий фрагмент» включает Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv и rIgG фрагменты при условии, что они проявляют нужную биологическую и/или иммунологическую активность. Термин «антигенсвязывающий фрагмент» также охватывает одноцепочечное (sc) антитело, однодоменное (sd) антитело, диатело или минитело. Например, при расщеплении антител папаином получают два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых «Fab»-фрагментами, и остаточный «Fc»-фрагмент, определение, отражающее способность с легкостью кристаллизоваться. Fab-фрагмент состоит из полной L-цепи наряду с доменом вариабельной области H-цепи (VH) и первым константным доменом одной тяжелой цепи (CH1). Каждый Fab-фрагмент является одновалентным в отношении связывания антигена, то есть, он имеет один антигенсвязывающий сайт. Обработка антитела пепсином приводит к получению одного большого F(ab')₂-фрагмента, который примерно соответствует двум связанным дисульфидными связями Fab-фрагментам,

имеет двухвалентную антигенсвязывающую активность и все-еще способен перекрестно связывать антиген. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов наличием нескольких дополнительных остатков на С-конце домена СН1, включая один или более остатков цистеина из шарнирной области антитела. В настоящем документе Fab'-SH является обозначением для Fab', в котором остаток(остатки) цистеина константных доменов несут свободную тиоловую группу. F(ab')₂-фрагменты антитела исходно были получены в виде пар Fab'-фрагментов, которые имеют между ними остатки цистеина шарнира. Также известны другие химические соединения фрагментов антитела. Fc-фрагмент содержит С-концевые части обеих Н-цепей, удерживаемые вместе дисульфидными связями. Эффекторные функции антител определяются последовательностями в Fc-области, эта область также является фрагментом, узнаваемым Fc-рецепторами (FcR), находящимися на клетках некоторых типов. «Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный сайт узнавания и связывания антигена. Этот фрагмент состоит из димера доменов переменной области одной тяжелой и одной легкой цепи в прочной нековалентной ассоциации. В одноцепочечных Fv (scFv) фрагментах один переменный домен тяжелой цепи и один переменный домен легкой цепи могут быть ковалентно связаны гибким пептидным линкером так, что тяжелая и легкая цепи могут связываться в «димерную» структуру, аналогичную структуре в двухцепочечных Fv-фрагментах. В результате сворачивания этих двух доменов возникают шесть гиперпеременных петель (3 петли из каждой из Н и L-цепи), которые вносят аминокислотные остатки для связывания антигена и придают антителу специфичность связывания антигена. Однако даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичных для антигена) обладает способностью узнавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем целый сайт связывания. «Одноцепочечные Fv», также сокращенно называемые «sFv» или «scFv», представляют собой фрагменты антитела, которые содержат домены VH и VL антитела, связанные в одну полипептидную цепь. Предпочтительно, полипептид sFv также содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет sFv образовывать структуру, необходимую для связывания антигена. Для обзора, посвященного sFv, смотри Pluckthun в: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). «rIgG» означает восстановленный IgG, размером примерно 75000 Дальтон, и может быть получен путем избирательного восстановления только дисульфидных связей шарнирной области, например, с использованием мягкого восстанавливающего реагента, такого как 2-меркаптоэтиламин (2-MEA).

Термин «анти-SIRPα антитело», или «антитело, связывающее SIRPα», означает антитело, которое способно к связыванию SIRPα с достаточной аффинностью, так что антитело может быть использовано в качестве диагностического и/или терапевтического средства, направленного на SIRPα. Предпочтительно, степень связывания анти-SIRPα антитела с посторонним, не SIRP, белком составляет менее примерно 10% от связывания антитела с SIRPα при измерении, например, в радиоиммунном анализе (RIA), методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) или в твердофазном иммуоферментном анализе (ELISA). Связывание с посторонними мишенями также можно профилировать с использованием технологии клеточных микрочипов, такой как, например, Retrogenix™.

«Выделенное антитело» представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено от, и/или извлечено из, компонента его естественного окружения. Примесные компоненты его естественного окружения представляют собой материалы, которые препятствовали бы терапевтическому использованию антитела,

и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления антитело будет очищено (1) до содержания более 95% по массе антитела при определении методом Лоури, и наиболее предпочтительно более 99% по массе, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности при использовании секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности при SDS-ПААГ в восстанавливающих или не восстанавливающих условиях при окрашивании Кумасси голубым или, предпочтительно, при окрашивании серебром. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент из естественного окружения антитела не будет присутствовать. Однако обычно выделенное антитело будет получено с использованием по меньшей мере одного этапа очистки.

«Аффинность связывания», как правило, означает силу общей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если нет иных указаний, используемый в настоящем документе термин «аффинность связывания» означает истинную аффинность связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). В настоящей спецификации аффинность связывания молекулы X для ее партнера Y означает равновесную константу диссоциации (также называемую «константой связывания»; K_D) для конкретного взаимодействия антиген-антитело. K_D представляет собой отношение скорости диссоциации (k_{off}) к скорости ассоциации (k_{on}). Следовательно, K_D равна k_{off}/k_{on} , и ее выражают в виде молярной концентрации (M). Из этого следует, что чем меньше K_D , тем сильнее аффинность связывания. Аффинность можно измерять обычными методами, известными в данной области, включая те, которые описаны в настоящем документе. Низкоаффинные антитела, как правило, связывают антиген медленно и легко диссоциируют, в то время как высокоаффинные антитела, как правило, связывают антиген быстрее и дольше остаются связанными. В данной области известны различные методы измерения аффинности связывания, любой из которых можно использовать для целей настоящего изобретения. Конкретные иллюстративные варианты осуществления описаны далее. Как правило, значения K_D определяют методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР), как правило, с использованием биосенсорной системы (например, *VIACore™*) способами, известными в данной области (например, *E.S. Day et al. Anal. Biochem.* 2013, 440, 96-107), такими как, например, те, которые описаны в разделе «Примеры». Альтернативно, термин «аффинность связывания» также может означать концентрацию антитела, которая обеспечивает полумаксимальное связывание (EC_{50}), ее определяют, например, в анализе ELISA или методом проточной цитометрии.

Антитело, «которое связывает» интересующий антиген или интересующие антигены, например, целевой антиген $SIRP\alpha$, представляет собой антитело, которое связывает антиген с достаточной аффинностью, так что антитело может быть использовано в качестве терапевтического средства, направленного на клетку или ткань, экспрессирующую антиген(ы), и существенно не реагирует перекрестно с другими белками. Например, анти- $SIRP\alpha$ антитело по настоящему изобретению связывает человеческий $SIRP\alpha$ - то есть, по меньшей мере человеческий $SIRP\alpha_1$ и человеческий $SIRP\alpha_{ВГТ}$, предпочтительно, $SIRP\alpha$ яванского макака - и, возможно, $SIRP\beta_{1v1}$ и/или

SIRP β_{1v2} , где оно не связывает SIRP γ или посторонние белки. В таких вариантах осуществления степень связывания антитела с «нецелевым» белком предпочтительно будет составлять менее примерно 10%, более предпочтительно менее примерно 5%, более предпочтительно менее примерно 2%, более предпочтительно менее примерно 1% от связывания антитела с его конкретным целевым белком, при определении в анализе активированной флуоресценцией сортировки клеток (FACS) или анализе радиоиммунопреципитации (RIPA). Что касается связывания антитела с целевой молекулой, термин «специфическое связывание», или «специфически связывает», или «является специфическим для», применительно к конкретному целевому полипептиду или эпитопу на конкретном целевом полипептиде означает связывание, которое значительно отличается от неспецифического взаимодействия. Специфическое связывание можно измерять, например, путем определения связывания молекулы в сравнении со связыванием контрольной молекулы, которая, как правило, представляет собой молекулу с аналогичной структурой, но не обладает активностью связывания. Например, специфическое связывание можно определять путем конкуренции с контрольной молекулой, которая аналогична мишени, например, избытком немеченой мишени. В данном случае, на специфичность связывания указывает то, что связывание меченой мишени с зондом конкурентно ингибируется избытком немеченой мишени. Используемый в настоящем документе термин «специфическое связывание», или «специфически связывает», или «является специфическим для», применительно к конкретному целевому полипептиду(ам) или эпитопу(ам) на конкретном целевом полипептиде может относиться, например, к молекуле, имеющей величину K_D для мишени (которую можно определять, как описано выше) по меньшей мере примерно 10^{-7} М, предпочтительно по меньшей мере примерно 10^{-8} М, более предпочтительно по меньшей мере примерно 10^{-9} М, даже более предпочтительно по меньшей мере примерно 10^{-10} М, даже более предпочтительно по меньшей мере примерно 10^{-11} М, даже более предпочтительно по меньшей мере примерно 10^{-12} М, или более, при определении методом ППР при 25°C.

В настоящей спецификации термин «низкая аффинность» используется взаимозаменяемо с выражениями «не связывает/не связывают» или «не связывается/не связываются с», и означает аффинность связывания между антителом и его антигеном с EC_{50} более 1500 нг/мл при определении в анализе ELISA, и/или в случае ограниченного, или отсутствия, специфического связывания между иммобилизованным антигеном и антителом предпочтительно при определении методом ППР при 25°C, например, когда K_D между антителом и антигеном является выше, чем, например, 10^{-7} М, выше чем 10^{-6} М или даже выше, при определении методом ППР при 25°C.

Используемый в настоящем документе термин «высокая аффинность» означает аффинность связывания между антителом и его антигеном, когда K_D , как правило, составляет менее 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, или даже ниже, при определении методом ППР при 25°C, как описано в разделе «Примеры».

«Гуманизированные» формы не принадлежащих человеку антител (например, антител грызунов) представляют собой антитела (например, химерные не человеческие-человеческие антитела), которые содержат минимальные последовательности, происходящие из не принадлежащего человеку антитела. В данной области известны различные способы гуманизации не принадлежащих человеку антител. Например,

антигенсвязывающие области CDR в переменных областях (VR) H-цепи (VH) и L-цепи (VL) происходят из антител биологического вида, отличного от человека, обычно мыши, крысы или кролика. Эти не принадлежащие человеку CDR объединяют с человеческими каркасными областями (FR1, FR2, FR3 и FR4) областей VH и VL таким образом, что функциональные свойства антител, такие как аффинность связывания и специфичность сохраняются, по меньшей мере частично. Избранные аминокислоты в человеческой области FR могут быть заменены на соответствующие исходные аминокислоты биологического вида, отличного от человека, для дальнейшего улучшения характеристик антитела, например, для повышения аффинности связывания, где с сохранением низкой иммуногенности. Альтернативно, не принадлежащие человеку антитела могут быть гуманизированы путем изменения их аминокислотной последовательности для увеличения сходства с вариантами антител, продуцируемыми естественным образом в организме человека. Например, избранные аминокислоты исходных FR биологического вида, отличного от человека, заменяют на соответствующие им человеческие аминокислоты для уменьшения иммуногенности, где с сохранением аффинности связывания антитела. Иллюстративным способом гуманизации не принадлежащих человеку антител является способ Winter и соавторов (Jones *et al. Nature* 1986, 321, 522-525; Riechmann *et al. Nature* 1988, 332, 323-327; Verhoeven *et al. Science* 1988, 239, 1534-1536) путем замены CDR соответствующих последовательностей человеческого антитела.

Гуманизированные таким способом переменные области, как правило, объединяют с константными областями человеческого антитела. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать два переменных домена, в которых все, или практически все, из CDR соответствуют таковым из не принадлежащего человеку иммуноглобулина, а все, или практически все, из FR имеют последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело, необязательно, будет также содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, из человеческого иммуноглобулина. Для дополнительной информации смотри Jones *et al. Nature* 1986, 321, 522-525; Riechmann *et al. Nature* 1988, 332, 323-327; и Presta. *Curr. Op. Struct. Biol.* 1992, 2, 593-596. Смотри также следующие обзорные статьи и цитируемые в них литературные источники: Vaswani and Hamilton. *Ann. Allergy, Asthma and Immunol.* 1998, 1, 105-115; Harris. *Biochem. Soc. Transactions* 1995, 23, 1035-1038; и Hurlle and Gross. *Curr. Op. Biotech.* (1994), 5, 428-433.

Используемый в настоящем документе термин «гипервариабельная область», «HVR», означает области переменного домена антитела, которые являются гипервариабельными по своей последовательности и/или образуют петли с четкой структурой, которые ответственны за связывание антигена. Как правило, антитела содержат шесть гипервариабельных областей; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Различные варианты разграничения гипервариабельных областей известны в данной области и включены в настоящий документ. Гипервариабельные области, как правило, содержат аминокислотные остатки из «определяющей комплементарности области», или «CDR», (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в VL, и около примерно 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в VH, в случае нумерации в соответствии с системой нумерации Kabat; Kabat *et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991); и/или остатки из «гипервариабельной петли» (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в VL, и 26-32 (H1), 52-56 (H2) и 95-101 (H3) в VH в случае нумерации в соответствии с системой нумерации Chothia; Chothia and Lesk. *J. Mol. Biol.* 1987, 196, 901-917); и/или

остатки из «гипервариабельной петли»/CDR (например, остатки 27-38 (L1), 56-65 (L2) и 105-120 (L3) в VL, и 27-38 (H1), 56-65 (H2) и 105-120 (H3) в VH в случае нумерации в соответствии с системой нумерации IMGT; Lefranc *et al. Nucl. Acids Res.* 1999, 27, 209-212, Ruiz *et al. Nucl. Acids Res.* 2000, 28, 219-221). Необязательно, антитело имеет симметричные вставки в одной или более из следующих точек 28, 36 (L1), 63, 74-75 (L2) и 123 (L3) в VL, и 28, 36 (H1), 63, 74-75 (H2) и 123 (H3) в VH в случае нумерации в соответствии с системой нумерации Honneger и Plunkthun (*Mol. Biol.* 2001, 309, 657-670). В публикации Dondelinger *et al.* приведен обзор нескольких систем нумерации и вариантов их использования (Dondelinger *et al. Frontiers in Immunology*, 2018, 9, Art 2278). HVR/CDR антител и антигенсвязывающих фрагментов по изобретению предпочтительно определены и пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat.

«Каркасные», или «FR», остатки представляют собой остатки вариабельного домена, отличные от остатков гипервариабельной области, определение которым дано в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «блокирующее» антитело, или «антагонистическое» антитело, означает антитело, которое частично или полностью предотвращает связывание естественного лиганда. Например, анти-SIRP α блокирующее антитело предотвращает связывание CD47 с SIRP α . Предпочтительные блокирующие антитела, или антагонистические антитела, в значительной степени или полностью ингибируют биологическую активность антигена.

Термин «эпитоп» означает часть молекулы, которую связывает антигенсвязывающий белок, например, антитело. Термин охватывает любую детерминанту, способную к специфическому связыванию с антигенсвязывающим белком, например, антителом или Т-клеточным рецептором. Эпитоп может быть непрерывным или прерывистым (например, в полипептиде аминокислотные остатки, которые не являются смежными в полипептидной последовательности, но которые в контексте молекулы - то есть, третичной структуры - связываются антигенсвязывающим белком). В конкретных вариантах осуществления эпитопы могут представлять собой миметики в том смысле, что они могут иметь трехмерную структуру, которая аналогична эпитопу, используемому для создания антигенсвязывающего белка, но где не содержат, или содержат лишь некоторые из аминокислотных остатков, присутствующих в эпитопе, используемом для создания антигенсвязывающего белка. Чаще всего эпитопы находятся на белках, но в некоторых случаях могут находиться на молекулах другого вида, например, нуклеиновых кислотах. Эпитопные детерминанты могут включать химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, сахарные боковые цепи, фосфорильные, сульфонильные или сульфатные группы, и могут иметь характерные трехмерные структурные характеристики и/или характерные характеристики заряда. Как правило, антитела, специфические для конкретного целевого антигена, будут предпочтительно узнавать эпитоп на целевом антигене в сложной смеси белков и/или макромолекул. Внеклеточный домен SIRP α может, например, содержать эпитопы в домене d1, d2 или d3.

В настоящем документе термин «Fc-область» используют для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая последовательности Fc-областей дикого типа и варианты Fc-областей. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG, как правило, продолжается от аминокислотного остатка в положении Cys226, или Pro230, до C-конца цепи. C-концевой остаток лизина (остаток 447 в соответствии с системой нумерации EU) Fc-области может быть удален, например, в процессе

5 продуцирования или очистки антитела, или в результате рекомбинантной модификации нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, композиция интактных антител может содержать популяции антител с удаленными всеми остатками K447, популяции антител с не удаленными всеми остатками K447 и популяции антител, содержащие смесь антител, имеющих или не имеющих остаток K447.

10 «Функциональная Fc-область» обладает «эффекторной функцией» последовательности Fc-области дикого типа. Эффекторные функции антител варьируются в зависимости от типа антител. Иллюстративные «эффекторные функции» включают связывание компонента Iq комплемента (C1q); CDC; связывание Fc-рецептора; ADCC; ADCP; ADAP; 10 понижающую регуляцию клеточных поверхностных рецепторов (например, B-клеточного рецептора; BCR) и активацию B-клеток. Для таких эффекторных функций, как правило, необходимо, чтобы Fc-область была объединена со связывающим доменом (например, варибельным доменом антитела), и эти функции можно оценивать с использованием различных анализов, описанных, например, в разделе «Определения» 15 настоящего документа.

«Последовательность Fc-области дикого типа» представляет собой аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, встречающейся в природе. Человеческие последовательности Fc-областей включают последовательность дикого типа Fc-области человеческого IgG1 (не-A и A аллотипов); 20 последовательность дикого типа Fc-области человеческого IgG2; последовательность дикого типа Fc-области человеческого IgG3 и последовательность дикого типа Fc-области человеческого IgG4, а также их существующие в природе варианты.

«Вариантная Fc-область» содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности Fc-области дикого типа вследствие по меньшей мере 25 одной аминокислотной модификации, предпочтительно одной или более аминокислотных замен. Предпочтительно, вариантная Fc-область имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену в сравнении с последовательностью Fc-области дикого типа или Fc-области исходного полипептида, например, от примерно одной до примерно десяти аминокислотных замен, и предпочтительно от примерно одной до 30 примерно пяти аминокислотных замен в последовательности Fc-области дикого типа или Fc-области исходного полипептида. Описанная в настоящем документе Fc-область предпочтительно будет иметь по меньшей мере примерно 80% гомологию с последовательностью Fc-области дикого типа и/или Fc-области исходного полипептида, и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 90% гомологию с ней, более 35 предпочтительно по меньшей мере примерно 95% гомологию с ней.

Термин «антителозависимая опосредуемая клетками цитотоксичность» (также называемая «антителозависимой клеточной цитотоксичностью»), или «ADCC», означает форму цитотоксичности, в которой секретируемые Ig, связанные с Fc рецепторами (FcR), присутствующими на некоторых цитотоксических клетках (например, клетках - 40 естественных киллерах (NK), нейтрофилах и моноцитах/макрофагах), позволяют этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с несущими антиген клетками-мишенями. NK-клетки экспрессируют только Fc γ R1A, в то время как моноциты экспрессируют Fc γ R1, Fc γ R1A/B и Fc γ R1A. Нейтрофилы, которые являются наиболее распространенными лейкоцитами в человеческой крови, также опосредуют 45 ADCC, и это, как правило, зависит от Fc γ R1A (Zhao *et al. Natl Acad Sci U S A.* 2011, 108 (45), 18342-7; Treffers *et al. Eur J Immunol.* 2018, 48(2), 344-354; Matlung *et al. Cell Rep.* 2018, 23(13), 3946-3959). Обобщенные данные по экспрессии FcR на гемопоэтических клетках приведены в Таблице 2 на странице 33 публикации Bruhns and Jönsson *Immunol Rev.* 2015,

268(1), 25-51. Для оценки активности ADCC интересующей молекулы можно проводить *in vitro* анализ ADCC, такой как тот, который описан в патенте США № 5500362 или 5821337, или такой как тот, который описан в разделе «Примеры». Полезные для таких анализов эффекторные клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), включающие смесь моноцитов и НК-клеток, или выделенные моноциты, нейтрофилы или НК-клетки. Альтернативно или дополнительно, активность ADCC интересующей молекулы можно оценивать *in vivo*, например, в животной модели, такой как та, которая описана в публикации Clynes *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1998, 95, 652-656, или в хорошо известных опухолевых моделях, таких как модель на B16F10, описанная в публикации Zhao *et al., PNAS* 2011, смотри выше. «Fc-рецептор», или «FcR», означает рецептор, который связывает Fc-область антитела. Предпочтительный FcR имеет последовательность дикого типа человеческого FcR. Кроме того, предпочтительный FcR представляет собой рецептор, который связывает IgG антитело (гамма-рецептор), и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, в том числе аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы таких рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, но отличаются главным образом своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) в его цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) в его цитоплазматическом домене (смотри обзор М. в Daëron. *Annu. Rev. Immunol.* 1997, 15, 203-234). Обзор FcR приведен в публикациях Ravetch and Kinet. *Annu. Rev. Immunol.* 1991, 9, 457-492; Capel *et al. Immunomethods* 1994, 4, 25-34; и de Haas *et al. J. Lab. Clin. Med.* 1995, 126, 330-341. И другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем, охвачены термином «FcR» в настоящем документе.

«Человеческие эффекторные клетки» представляют собой лейкоциты, которые экспрессируют один или более FcR и выполняют эффекторные функции.

Предпочтительно, экспрессируют FcγRIIA (нейтрофилы или моноциты) или FcγRIIA (НК-клетки или моноциты) и выполняют эффекторную функцию ADCC. Примеры человеческих лейкоцитов, которые опосредуют ADCC, включают МКПК, НК-клетки, моноциты, макрофаги и нейтрофилы, где нейтрофилы являются предпочтительными. Эффекторные клетки могут быть выделены из природного источника, например, из крови, предпочтительно из человеческой крови.

Используемый в настоящем документе термин «терапевтическое антитело» означает антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, как определено выше, которое подходит для лечения человека. Антитела, подходящие для лечения человека, имеют достаточное качество, безопасны и эффективны для лечения конкретных заболеваний человека. Качество можно оценивать с использованием установленных руководящих принципов Надлежащей производственной практики; безопасность и эффективность, как правило, оценивают с использованием руководящих принципов, установленных органами государственного регулирования и контроля оборота лекарственных средств, например, Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) или Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA). Эти руководящие принципы хорошо известны в данной области. В настоящей спецификации термин «терапевтическое антитело» не включает анти-SIRPα антитело. Используемый в настоящем документе термин «терапевтическое антитело» означает противораковое антитело, такое как, например, анти-CD20, анти-HER2, анти-

GD2, анти-EGFR или анти-CD70 антитело.

«Идентичность последовательностей» и «сходство последовательностей» можно определять путем выравнивания двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритмов глобального или локального выравнивания, в зависимости от длин двух последовательностей. Последовательности с одинаковыми длинами предпочтительно выравнивать с использованием алгоритмов глобального выравнивания (например, Нидлмана-Вунша), который оптимально выравнивает последовательности по всей длине, в то время как последовательности со значительно различающимися длинами предпочтительно выравнивать с использованием алгоритма локального выравнивания (например, Смита-Уотермана). Последовательности могут быть названы «практически идентичными» или «по существу идентичными», когда они (при оптимальном выравнивании, например, при помощи программ GAP или BESTFIT с использованием параметров по умолчанию) имеют по меньшей мере определенную минимальную процентную идентичность последовательностей (описанную ниже). В GAP использован алгоритм глобального выравнивания Нидлмана-Вунша для выравнивания двух последовательностей по всей их длине (полноразмерных), с максимизацией количества совпадений и минимизацией количества делеций. Глобальное выравнивание удобно использовать для определения идентичности последовательностей, когда две последовательности имеют одинаковые длины. Как правило, используют параметры по умолчанию GAP, со штрафом за внесение делеции=50 (нуклеотиды) / 8 (белки) и штрафом за продолжение делеции=3 (нуклеотиды) / 2 (белки). Для нуклеотидов используемой по умолчанию матрицей замен является *nwsgapdna*, и для белков используемой по умолчанию матрицей замен является *Blosum62* (Henikoff & Henikoff. PNAS 1992, 89, 915-919). Выравнивание последовательностей и определение процентной идентичности последовательностей можно выполнять с использованием компьютерных программ, таких как пакет программ GCG Wisconsin, версии 10.3, доступный от Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 USA, или с использованием программного обеспечения с открытым исходным кодом, такого как программа «needle» (в которой используется алгоритм Нидлмана-Вунша) или «water» (в которой используется алгоритм поиска локальной гомологии Смита-Уотермана) в EmbossWIN версии 2.10.0, с использованием тех же параметров, что и для GAP, выше, или с использованием установок по умолчанию (как для «needle», так и для «water», и для выравнивания как белков, так и ДНК, штраф по умолчанию за внесение делеции составляет 10,0, и штраф по умолчанию за продолжение делеции составляет 0,5; матрицами замен по умолчанию являются *Blosum62* для белков и *DNAFull* для ДНК). Когда последовательности имеют значительно различающиеся общие длины, предпочтительно использовать локальное выравнивание, например, с использованием алгоритма Смита-Уотермана. Альтернативно, процентное сходство, или идентичность, можно определять путем поиска в общедоступных базах данных с использованием таких алгоритмов, как FASTA, BLAST и так далее.

После выравнивания двух аминокислотных последовательностей с использованием любой из описанных выше программ выравнивания рассчитывают % аминокислотную идентичность последовательности конкретной аминокислотной последовательности А относительно, с, или в сравнении с конкретной аминокислотной последовательностью В (альтернативно можно говорить, что конкретная аминокислотная последовательность А имеет, или включает в себе, определенную % аминокислотную идентичность последовательности относительно, с, или в сравнении с конкретной аминокислотной

последовательностью В) следующим образом: умножают на 100 частное от деления X/Y , где X представляет собой количество аминокислотных остатков, определенных как идентичные совпадения программой выравнивания последовательностей при выравнивании программой А и В, и Y представляет собой общее количество аминокислотных остатков в В. Следует понимать, что если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, то % аминокислотная идентичность последовательности А относительно В не будет равна % аминокислотной идентичности последовательности В относительно А.

Необязательно, при определении степени сходства аминокислот можно учитывать так называемые «консервативные аминокислотные замены». Термин «консервативные аминокислотные замены» относится к взаимозаменяемости остатков, имеющих сходные боковые цепи. Например, группа аминокислотных остатков с алифатическими боковыми цепями включает глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; группа аминокислот, имеющих алифатические гидроксильные боковые цепи, включает серин и треонин; группа аминокислот, имеющих амид-содержащие боковые цепи, включает аспарагин и глутамин; группа аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, включает фенилаланин, тирозин и триптофан; группа аминокислот, имеющих основные боковые цепи, включает лизин, аргинин и гистидин; и группа аминокислот, имеющих серосодержащие боковые цепи, включает цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин и аспарагин-глутамин.

Иллюстративными консервативными заменами для каждой из существующих в природе аминокислот являются следующие: ala на ser; arg на lys; asn на gln или his; asp на glu; cys на ser или ala; gln на asn; glu на asp; gly на pro; his на asn или gln; ile на leu или val; leu на ile или val; lys на arg, gln или glu; met на leu или ile; phe на met, leu или tyr; ser на thr; thr на ser; trp на tyr; tyr на trp или phe; и val на ile или leu.

Используемый в настоящем документе термин «нуклеотидная конструкция», или «нуклеотидный вектор», означает искусственно созданную молекулу нуклеиновой кислоты, полученную с использованием технологии рекомбинантных ДНК. Таким образом, термин «нуклеотидная конструкция» не включает существующие в природе молекулы нуклеиновой кислоты, хотя нуклеотидная конструкция может содержать (части) существующих в природе молекул нуклеиновой кислоты. Термины «экспрессионный вектор» или «экспрессионная конструкция» означают нуклеотидные последовательности, которые способны осуществлять экспрессию гена в клетках-хозяевах или организмах-хозяевах, совместимых с такими последовательностями. Эти экспрессионные векторы, как правило, включают по меньшей мере соответствующие последовательности регуляции транскрипции и, необязательно, 3'-сигналы терминации транскрипции. Дополнительные факторы, необходимые или полезные для осуществления экспрессии, также могут присутствовать, например, энхансерные элементы экспрессии. Экспрессионный вектор будет введен в подходящую клетку-хозяина и будет способен осуществлять экспрессию кодирующей последовательности в *in vitro* клеточной культуре клетки-хозяина. Экспрессионный вектор будет способен к репликации в клетке-хозяине или организме по изобретению.

Используемый в настоящем документе термин «промотор», или «последовательность регуляции транскрипции», означает фрагмент нуклеиновой кислоты, функция которого заключается в контроле транскрипции одной или более кодирующих последовательностей, который расположен выше по ходу транскрипции, чем сайт инициации транскрипции кодирующей последовательности, и структурно определяется

наличием сайта связывания для ДНК-зависимой РНК-полимеразы, сайтов инициации транскрипции и любых других последовательностей ДНК, включая, но без ограничения, сайты связывания факторов транскрипции, сайты связывания белков репрессоров и активаторов, а также любые другие нуклеотидные последовательности, которые, как
 5 известно специалисту в данной области, действуют прямо или косвенно, регулируя транскрипцию с промотора. «Конститутивный» промотор представляет собой промотор, который активен в большинстве тканей в большинстве физиологических условий и стадий развития. «Индукцируемый» промотор представляет собой промотор, который регулируется физиологическими условиями или стадией развития, например, путем
 10 использования химического индуктора.

Используемый в настоящем документе термин «функционально связанные» означает, что полинуклеотидные элементы связаны функциональными отношениями. Нуклеиновая кислота является «функционально связанной», когда имеет место ее функциональное
 15 отношение с другой нуклеотидной последовательностью. Например, последовательность регуляции транскрипции функционально связана с кодирующей последовательностью, если она влияет на транскрипцию кодирующей последовательности. «Функционально связанные» означает, что связанные последовательности ДНК, как правило, являются смежными, и, при необходимости связывания двух кодирующих белок областей, смежными и в одной рамке считывания.

Используемый в настоящем документе термин «ADC» означает цитотоксическое лекарственное средство, конъюгированное с терапевтическим антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, определение которым дано выше, через линкер. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, в ADC не является анти-SIRP α антителом. Как правило, цитотоксические лекарственные средства являются
 25 сильнодействующими, например, дуокармицин, калихеамицин, димер пирролобензодиазепина (PBD), производное майтанзиноида или ауристатина. Линкер может быть расщепляемым, например, содержать расщепляемый дипептид валин-цитруллин (vc) или валин-аланин (va), или не расщепляемым, например, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC).

30 Антитела по изобретению или их фрагменты

В настоящее время отсутствуют одобренные для использования терапевтические средства, направленные на SIRP α , хотя показано, что SIRP α играет важную роль в механизмах избегания опухолями атак иммунной системы.

SIRP α (также известный как CD172 антиген-подобного семейства представитель A, CD172a, SHPS-1, MyD-1) является представителем семейства сигнальных регуляторных
 35 белков (SIRP), трансмембранных гликопротеинов с внеклеточными Ig-подобными доменами, находящихся на иммунных эффекторных клетках. CD47 (также известный как интегрин-ассоциированный белок, IAP) является лигандом SIRP α . NH₂-концевой лиганд-связывающий домен SIRP α является высоко полиморфным (Takenaka *et al. Nature*
 40 *Immun.* 2007, 8(12), 1313-1323). Однако этот полиморфизм существенно не влияет на связывание с CD47. SIRP α _{В1Т} (v1) и SIRP α ₁ (v2) представляют собой две наиболее распространенные и наиболее различающиеся (13 отличающихся остатков) полиморфные формы (Hatherley *et al. J. Biol. Chem.* 2014, 289(14), 10024-10028). Кроме CD47, SIRP α также может быть связан сурфактантными белками (SP-A и SP-D; Gardai
 45 *et al.* 2003, Janssen *et al.* 2008, Fournier *et al.* 2012). Фактически, CD47 может связываться с доменом D1 SIRP α , в то время как SP-D может (одновременно) связываться с доменом D3 SIRP α . Подобно SIRP α , сурфактантные белки вовлечены во врожденные иммунные/воспалительные реакции, направленные, например, на апоптотические клетки и

микроорганизмы, с участием макрофагов и/или нейтрофилов. Другими биохимически охарактеризованными представителями семейства SIRP у человека являются SIRP β_1 и SIRP γ . Номенклатура семейства SIRP описана в публикации van den Berg *et al. J Immunology* 2005, 175(12), 7788-9.

5 SIRP β_1 (также известный как CD172B) не связывает CD47 (van Beek *et al. J. Immunol.* 2005, 175(12), 7781-7787, 7788-7789), и известны по меньшей мере два полиморфных варианта SIRP β_1 , SIRP β_{1v1} (ENSP00000371018) и SIRP β_{1v2} (ENSP00000279477). Хотя естественный лиганд SIRP β_1 пока неизвестен, *in vitro* исследования с использованием
10 специфических анти-SIRP β_1 антител показали, что связывание SIRP β_1 стимулирует фагоцитоз в макрофагах путем индукции фосфорилирования тирозина в DAP12, Syk и SLP-76, и последующей активации каскада киназы легких цепей миозина MEK-MAPK (Matozaki *et al. J. Biol. Chem.* 2004, 279(28), 29450-29460). Человеческий SIRP β_1
15 экспрессируется в миелоидных клетках, таких как моноциты и гранулоциты, но не в лимфоцитах (Hayashi *et al. J. of Biol Chem.* 2004, 279(28); Dietrich *et al. The Journal of Immunology* 2000, 164, 9-12).

SIRP γ (также известный как CD172G) экспрессируется на Т-клетках и активированных НК-клетках, и связывает CD47 с аффинностью, в 10 раз более низкой, чем SIRP α .
20 Взаимодействие CD47-SIRP γ вовлечено в контакт между антигенпредставляющими клетками и Т-клетками, с костимуляцией Т-клеточной активации и стимуляцией Т-клеточной пролиферации (Piccio *et al. Blood* 2005, 105, 2421-2427). Кроме того, взаимодействия CD47-SIRP γ играют определенную роль в трансэндотелиальной миграции Т-клеток (Stefanidakis *et al. Blood* 2008, 112, 1280-1289). В WO2017/178653
25 раскрыто, что вследствие значительного сходства последовательностей между SIRP α и SIRP γ , в частности, в области, которая взаимодействует с CD47, анти-SIRP α антитела предшествующего уровня техники также связывают SIRP γ и проявляют нежелательные эффекты у человека, такие как ингибирование пролиферации Т-клеток и ослабление
30 иммунного ответа. Таким образом, анти-SIRP α антитело по изобретению, которое не связывает SIRP γ на Т-клетках, предположительно будет вызывать меньшее, или не будет вызывать, ингибирование просачивания Т-клеток и/или будет вызывать меньшее, или не будет вызывать, ингибирование трансэндотелиальной миграции Т-клеток, в отличие от анти-SIRP α антитела, которое связывает SIRP γ на Т-клетках.

Настоящее изобретение относится к антагонистическим анти-SIRP α антителам, которые демонстрируют специфическое связывание с по меньшей мере двумя
35 преобладающими полиморфными вариантами человеческого SIRP α , SIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$ и SIRP α_1 . Предпочтительно, анти-SIRP α антитела по изобретению имеют пониженную, низкую или, наиболее предпочтительно, не имеют, аффинность для человеческого SIRP γ (предпочтительно при измерении методом FACS с окрашиванием CD3⁺ Т-клеток или
40 методом поверхностного плазмонного резонанса (предпочтительно BiaCore™) в соответствии с разделом «Примеры»). Предпочтительно, анти-SIRP α антитела по изобретению имеют пониженную, или низкую, аффинность для человеческого SIRP β_{1v1} и/или человеческого SIRP β_{1v2} . Предпочтительно, они усиливают ADCC и/или ADCP терапевтического антитела. В предпочтительном варианте осуществления анти-SIRP α
45 антитело по изобретению также связывает SIRP α яванского макака.

Антагонистические антитела имеют аффинность для конкретного антигена, и связывание антитела с его антигеном ингибирует функцию агониста или обратного агониста на рецепторах. В данном случае предполагается, что связывание

антагонистического анти-SIRP α антитела с SIRP α будет предотвращать связывание CD47 с SIRP α . Антагонистические анти-SIRP α антитела могут связываться в том же сайте, где связывается CD47, то есть, ортостерическом сайте, предотвращая связывание SIRP α с CD47 и, следовательно, ингибируя сигнализацию, которая отрицательно регулирует зависимое от Fc-рецептора действие иммунных эффекторных клеток. Альтернативно, антагонистические анти-SIRP α антитела могут связываться в непосредственной близости от сайта, в котором связывается CD47, предотвращая взаимодействие между CD47 и SIRP α за счет стерического препятствия. Альтернативно, антитело, связываясь отдаленно от сайта взаимодействия с CD47, может блокировать связывание CD47/SIRP α , например, за счет индукции невосприимчивой конформации. Без связи с конкретной теорией, предполагается, что блокирование связывания CD47 с SIRP α уменьшает или предотвращает каскад сигнализации SIRP α , предпочтительно на по меньшей мере 60%, более предпочтительно на по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, наиболее предпочтительно на по меньшей мере 80%, при измерении, как указано в разделе «Примеры» при концентрации анти-SIRP α антитела, составляющей 3,3 мкг/мл.

Если антитело связывает также и другие антигены помимо мишени, например, SIRP β_{1V1} , SIRP β_{1V2} и SIRP γ , особенно когда антитело связывает эти антигены с высокой аффинностью, такие антигены могут действовать как поглотители антитела. Таким образом, предполагается, что вследствие минимизации нецелевого связывания антитела уменьшается любой эффект поглощения антитела, результатом чего может являться эффективность при более низкой дозе, или более выраженный эффект при той же дозе, в сравнении с антителом, которое в остальном имеет такие же характеристики.

В настоящее время роль SIRP β_1 плохо изучена. Таким образом, предпочтительно, если антитело по настоящему изобретению имеет относительно низкую аффинность связывания с обоими полиморфными вариантами (SIRP β_{1V1} и SIRP β_{1V2}). Однако сообщалось, что активация SIRP α (сигнализация через иммунорецепторные тирозиновые ингибирующие мотивы, ITIM) и SIRP β_1 (сигнализация через иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы, ITAM) оказывают противоположные эффекты на функцию иммунных эффекторных клеток, таких как макрофаги и PMN/нейтрофилы (van Beek *et al. J. Immunol.* 2005, 175(12), 7781-7787, 7788-7789). Кроме того, сообщалось, что приведение в действие мышинового рецептора SIRP β_1 стимулирует фагоцитоз в макрофагах (Hayashi *et al. J. Biol. Chem.* 2004, 279(28), 29450-29460). В публикации Liu *et al. (J. Biol. Chem.* 2005, 280 (43), 36132-36140) заявлено, что опосредованное антителом связывание SIRP β_1 приводило к усилению fMLP-управляемой трансэпителиальной миграции PMN. Без связи с конкретной теорией, вполне возможно, что анти-SIRP α блокирующие антитела, которые также связывают SIRP β_1 , могут оказывать противоположные эффекты на SIRP α и SIRP β_1 . Для достижения максимальной стимуляции противоопухолевого клеточного ответа необходимо, чтобы антитела стимулировали активность клеток врожденного иммунитета (например, PMN/нейтрофилов и/или макрофагов) путем блокирования SIRP α , но где влияли ограниченно, или не влияли, на функционирование SIRP β_1 , и в то же время без блокирования клеток приобретенного иммунитета, то есть, Т-клеток, за счет связывания SIRP γ .

Антитела по настоящему изобретению предпочтительно имеют все из следующих характеристик: (i) они способны блокировать связывание CD47 с SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ и SIRP α_1 , (ii) они не связываются с человеческими CD3⁺ Т-клетками, и (iii) они способны уменьшать

сигнализацию SIRP α . Предпочтительно, они проявляют редуцированное или низкое связывание с SIRP β_{1V1} и/или SIRP β_{1V2} при измерении методом ППП. Напротив, известные анти-SIRP α антитела не сочетают все нужные характеристики в одном антителе: все из антител, способных блокировать связывание CD47 с SIRP $\alpha_{ВГТ}$ и SIRP α_1 , также демонстрируют связывание с SIRP γ , в то время как HEFLB может блокировать SIRP $\alpha_{ВГТ}$ без связывания с SIRP γ , но не обладает способностью к связыванию, тем более блокированию, SIRP α_1 . Некоторые другие антитела предшествующего уровня техники, которые способны связывать как SIRP α_1 , так и SIRP $\alpha_{ВГТ}$, без связывания SIRP γ , не способны блокировать связывание CD47 с SIRP α и, таким образом, не блокируют, или блокируют только при высокой концентрации IC₅₀, сигнализацию SIRP α при измерении путем блокирования рекрутинга SHP-1. Несмотря на способность к связыванию и блокированию как SIRP α_1 , так и SIRP $\alpha_{ВГТ}$, SE5A5 не способно блокировать сигнализацию SIRP α при измерении путем блокирования рекрутинга SHP-1. Эти характеристики определяют, как описано или указано в разделе «Примеры».

В первом аспекте изобретение относится к антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывает SIRP α . Анти-SIRP α антитело по изобретению предпочтительно представляет собой выделенное антитело. Предпочтительно, анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по изобретению связывает SIRP α приматов, более предпочтительно человеческий SIRP α , наиболее предпочтительно по меньшей мере аллельные варианты SIRP α_1 и SIRP $\alpha_{ВГТ}$. В предпочтительном варианте осуществления антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, имеет пониженное связывание в сравнении с антителами предшествующего уровня техники, более предпочтительно, связывает слабо, наиболее предпочтительно, не связывает, SIRP γ , предпочтительно при измерении методом FACS с окрашиванием человеческих CD3⁺ Т-клеток, как описано в разделе «Примеры», или в экспериментах с использованием Viacore, как продемонстрировано в примерах. Предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, усиливает ADCC и/или ADCP терапевтических антител. Предпочтительно, анти-SIRP α антитело по изобретению усиливает ADCC 10 мкг/мл трастузумаба при концентрации 0,1 мкг/мл анти-SIRP α антитела по меньшей мере в 1,2 раза; более предпочтительно по меньшей мере в 1,3 раза; более предпочтительно по меньшей мере в 1,4 раза; более предпочтительно по меньшей мере в 1,5 раза; более предпочтительно по меньшей мере в 1,6 раза; более предпочтительно по меньшей мере в 1,7 раза; более предпочтительно по меньшей мере в 1,8 раза; более предпочтительно по меньшей мере в 1,9 раза; более предпочтительно по меньшей мере в 2,0 раза; более предпочтительно по меньшей мере в 2,1 раза; более предпочтительно по меньшей мере в 2,2 раза; наиболее предпочтительно по меньшей мере в 2,3 раза в сравнении с используемым отдельно трастузумабом, при измерении в анализе DELFIA или высвобождения ⁵¹Cr, как описано в примерах.

Альтернативно, или в сочетании с любым из других вариантов осуществления настоящего изобретения, в предпочтительном варианте осуществления анти-SIRP α антитело по изобретению представляет собой гуманизованное или человеческое анти-SIRP α антитело, и антигенсвязывающий фрагмент по изобретению представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, описанный выше в настоящем документе, из гуманизованного или человеческого анти-SIRP α антитела. Более предпочтительно, анти-SIRP α антитело по изобретению представляет собой гуманизованное анти-SIRP α антитело, и антигенсвязывающий фрагмент по изобретению получен из

гуманизированного анти-SIRP α антитела.

Гуманизированное антитело по изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно вызывает небольшой, или не вызывает, иммуногенный ответ против антитела у субъекта, которому вводят антитело или фрагмент. Исходное не принадлежащее человеку антитело, например, антитело грызуна, такое как мышье или крысиное антитело, или кроличье антитело, или химерное не человеческое-человеческое антитело, потенциально может вызывать ответ в виде выработки человеческих антител против не принадлежащих человеку антител, в этом случае гуманизированное антитело по изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, вызывает, и/или ожидается, что будет вызывать, у субъекта-хозяина иммуногенный ответ на значительно более низком уровне в сравнении с исходным не принадлежащим человеку антителом или в сравнении с химерным не человеческим-человеческим антителом. Предпочтительно, гуманизированное антитело вызывает, и/или ожидается, что будет вызывать, минимальный, или не будет вызывать, ответ в виде выработки человеческих антител против не принадлежащих человеку антител. Тестирование иммуногенности можно проводить известными в данной области способами, например, как описано в публикациях Baker *et al. Immunogenicity of protein therapeutics* 2010, 1(4), 314-322; Harding *et al. MAbs* 2010, 2(3), 256-265; или Joubert *et al. PLoS.One* 2016, 11(8), e0159328. Наиболее предпочтительно, антитело по изобретению вызывает ответ в виде выработки человеческих антител против не принадлежащих человеку антител животного, в частности, ответ в виде выработки человеческих антител против антител кролика (HARA), который находится на клинически приемлемом уровне, или ниже. Также важно, чтобы антитела были гуманизированными с сохранением высокой аффинности в отношении антигена и других полезных биологических свойств.

CDR можно определять с использованием подхода Kabat (в: Kabat *et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 1991, NIH publication no. 91-3242, pp. 662, 680, 689), Chothia (Chothia and Lesk. *J. Mol. Biol.* 1987, 196, 901-917; Antibody Engineering Vol. 2, Chapter 3, Martin, 2010, Kontermann and Dübel Eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg) или IMGT (Lefranc. *The Immunologist* 1999, 7, 132-136). В настоящем документе CDR тяжелой цепи и легкой цепи определены с использованием системы Kabat и представлены в списке последовательностей в виде SEQ ID NO, указанных в Таблице 1a. В контексте настоящего изобретения нумерацию Eu используют для указания положений в константных областях тяжелой цепи и легкой цепи антитела. Выражение «нумерация Eu» относится к индексу Eu, описанному в Kabat *et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 1991, NIH publication no. 91-3242, pp. 662, 680, 689.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к анти-SIRP α антителу, предпочтительно гуманизированному анти-SIRP α антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, выбранные из группы, состоящей из: (a) HCDR1, содержащей SHGIS (SEQ ID NO:36); HCDR2, содержащей TIGTGVITYFASWAKG (SEQ ID NO:44); HCDR3, содержащей GSAWNDPFD (SEQ ID NO:45); LCDR1, содержащей QASQSVYGNNDLA (SEQ ID NO:39); LCDR2, содержащей LASTLAT (SEQ ID NO:40); LCDR3, содержащей LGGGDDEADNT (SEQ ID NO:41); (b) HCDR1, содержащей SYVMG (SEQ ID NO:30); HCDR2, содержащей IISSSGSPYYASWVNG (SEQ ID NO:31); HCDR3, содержащей VGPLGVDYFNI (SEQ ID NO:32); LCDR1,

содержащей RASQSINSYLA (SEQ ID NO:33); LCDR2, содержащей SASFLYS (SEQ ID NO:34); LCDR3, содержащей QSWHYISRSYT (SEQ ID NO:35); (c) HCDR1, содержащей SHGIS (SEQ ID NO:36); HCDR2, содержащей TIGTGVITYYASWAKG (SEQ ID NO:37); HCDR3, содержащей GSAWNDPFDY (SEQ ID NO:38); LCDR1, содержащей

5 QASQSVYGNNDLA (SEQ ID NO:39); LCDR2, содержащей LASTLAT (SEQ ID NO:40); LCDR3, содержащей LGGGDDEADNV (SEQ ID NO:46); (d) HCDR1, содержащей SHGIS (SEQ ID NO:36); HCDR2, содержащей TIGTGVITYYASWAKG (SEQ ID NO:37); HCDR3, содержащей GSAWNDPFDY (SEQ ID NO:38); LCDR1, содержащей QASQSVYGNNDLA (SEQ ID NO:39); LCDR2, содержащей LASTLAT (SEQ ID NO:40); LCDR3, содержащей

10 LGGGDDEADNT (SEQ ID NO:41); и (e) HCDR1, содержащей SHGIS (SEQ ID NO:36); HCDR2, содержащей TIGTGGITYYASWAKG (SEQ ID NO:42); HCDR3, содержащей GSAWNDPFDI (SEQ ID NO:43); LCDR1, содержащей QASQSVYGNNDLA (SEQ ID NO:39); LCDR2, содержащей LASTLAT (SEQ ID NO:40); LCDR3, содержащей LGGGDDEADNT (SEQ ID NO:41). Более предпочтительно, анти-SIRP α антитело по изобретению, или его

15 антигенсвязывающий фрагмент, содержит HCDR и LCDR, выбранные из группы, состоящей из: (a) HCDR1, содержащей SHGIS (SEQ ID NO:36); HCDR2, содержащей TIGTGVITYYASWAKG (SEQ ID NO:44); HCDR3, содержащей GSAWNDPFDI (SEQ ID NO:45); LCDR1, содержащей QASQSVYGNNDLA (SEQ ID NO:39); LCDR2, содержащей LASTLAT (SEQ ID NO:40); LCDR3, содержащей LGGGDDEADNT (SEQ ID NO:41); и (b)

20 HCDR1, содержащей SYVMG (SEQ ID NO:30); HCDR2, содержащей IISSSGSPYYASWVNG (SEQ ID NO:31); HCDR3, содержащей VGPLGVDYFNI (SEQ ID NO:32); LCDR1, содержащей RASQSINSYLA (SEQ ID NO:33); LCDR2, содержащей SASFLYS (SEQ ID NO:34); LCDR3, содержащей QSWHYISRSYT (SEQ ID NO:35).

Альтернативно или в сочетании с любым из предшествующих вариантов осуществления, в предпочтительном варианте осуществления анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по изобретению имеет одно или более из

25 следующих функциональных свойств.

Предпочтительно, анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывает человеческий SIRP α_1 с K_D ниже 10^{-9} М, более предпочтительно с K_D ниже

30 10^{-10} М, даже более предпочтительно с K_D ниже 10^{-11} М, при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса (предпочтительно BiaCore™) при 25°C с использованием внеклеточного домена человеческого SIRP α_1 , приведенного в SEQ ID NO:51. Предпочтительно, анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент,

35 связывает человеческий SIRP α_{B1T} с K_D ниже 10^{-9} М, более предпочтительно с K_D ниже 10^{-10} М, даже более предпочтительно с K_D ниже 10^{-11} М при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса (предпочтительно BiaCore™) при 25°C с использованием внеклеточного домена человеческого SIRP α_{B1T} , приведенного в SEQ

40 ID NO:52. Предпочтительно, анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывает SIRP α яванского макака с K_D ниже 10^{-7} М, более предпочтительно с K_D ниже 10^{-8} М, даже более предпочтительно с K_D ниже 10^{-9} М при анализе методом

45 поверхностного плазмонного резонанса (предпочтительно BiaCore™) при 25°C с использованием внеклеточного домена SIRP α яванского макака, приведенного в SEQ ID NO:56. Предпочтительно, анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, не связывает в поддающейся обнаружению степени человеческий SIRP γ при

измерении методом FACS с окрашиванием CD3⁺ Т-клеток, как описано в разделе «Примеры». Предпочтительно, анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, не связывает человеческий SIRP γ при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса (предпочтительно BiaCore™) при 25°C с использованием

5 внеклеточного домена человеческого SIRP γ , приведенного в SEQ ID NO:55. Предпочтительно, анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, не является иммуногенным при определении в анализе IL-2 ELISpot и/или анализе Т-клеточной пролиферации. Предпочтительно, анти-SIRP α антитело, или его

10 антигенсвязывающий фрагмент, связывает человеческий SIRP β_{1v2} с умеренной или низкой аффинностью при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса (предпочтительно BiaCore™) при 25°C с использованием внеклеточного домена человеческого SIRP β_{1v2} , приведенного в SEQ ID NO:54. Предпочтительно, K_D является

15 выше 10^{-10} М, более предпочтительно выше 10^{-9} М. Предпочтительно, в сочетании с умеренной или низкой аффинностью связывания SIRP β_{1v2} , анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывает SIRP β_{1v1} с K_D выше 10^{-11} М, более

20 предпочтительно выше 3×10^{-11} М, даже более предпочтительно выше 10^{-10} М, даже более предпочтительно выше 10^{-9} М при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса (предпочтительно BiaCore™) при 25°C с использованием внеклеточного домена человеческого SIRP β_{1v1} , приведенного в SEQ ID NO:53. Эти анализы описаны или указаны в разделе «Примеры».

Альтернативно или в сочетании с любым из предшествующих вариантов

25 осуществления, в предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к анти-SIRP α антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, описанному выше в настоящем документе, где антитело специфически связывает как человеческий SIRP α_{BIT} , так и человеческий SIRP α_1 , и не связывает в поддающейся обнаружению

30 степени человеческий SIRP γ при анализе методом окрашивания CD3⁺ Т-клеток и/или ППП, оба из которых описаны в разделе «Примеры». В одном из вариантов осуществления анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывает человеческий SIRP α_{BIT} с K_D ниже 10^{-9} М, более предпочтительно с K_D ниже 10^{-10} М, даже более предпочтительно с K_D ниже 10^{-11} М; и связывает человеческий SIRP α_1 с K_D

35 ниже 10^{-8} М, более предпочтительно с K_D ниже 10^{-9} М, более предпочтительно с K_D ниже 10^{-10} М, даже более предпочтительно с K_D ниже 10^{-11} М, где K_D измеряют методом ППП при 25°C (смотри Примеры). Предпочтительно, анти-SIRP α антитело по

40 изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывает SIRP γ с K_D выше 10^{-8} М, более предпочтительно с K_D выше 10^{-7} М, более предпочтительно с K_D выше 10^{-6} М, даже более предпочтительно с K_D выше 10^{-5} М, наиболее предпочтительно, если связывание не может быть обнаружено, где K_D измеряют методом ППП при 25°C

45 (смотри Примеры).

Альтернативно или в сочетании с любым из предшествующих вариантов осуществления, в предпочтительном варианте осуществления анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по изобретению: (а) связывает человеческий

$SIRP\alpha_1$ с K_D ниже 10^{-8} М, более предпочтительно с K_D ниже 10^{-9} М, более
 предпочтительно с K_D ниже 10^{-10} М, даже более предпочтительно с K_D ниже 10^{-11} М,
 при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР; предпочтительно
 с использованием *BiaCore*TM) при 25°C с использованием внеклеточного домена
 человеческого $SIRP\alpha_1$, приведенного в SEQ ID NO:51 (смотри Примеры); (b) связывает
 человеческий $SIRP\alpha_{BIT}$ с K_D ниже 10^{-9} М, более предпочтительно с K_D ниже 10^{-10} М,
 даже более предпочтительно с K_D ниже 10^{-11} М в анализе ППР (предпочтительно с
 использованием *BiaCore*TM) при 25°C с использованием внеклеточного домена
 человеческого $SIRP\alpha_{BIT}$, приведенного в SEQ ID NO:52 (смотри Примеры); (c) блокирует
 связывание CD47 с $SIRP\alpha_1$ и $SIRP\alpha_{BIT}$, предпочтительно в анализе диссоциации от
 иммобилизованного CD47 методом ППР (предпочтительно с использованием *BiaCore*TM),
 более предпочтительно, как описано в Примере 6; и (d) не связывает в поддающейся
 обнаружению степени человеческий $SIRP\gamma$ при измерении методом проточной
 цитометрии, предпочтительно методом активированной флуоресценцией сортировки
 клеток (FACS) с окрашиванием CD3⁺ Т-клеток, и/или ППР, оба из которых описаны в
 разделе «Примеры». Предпочтительно, в сочетании с предшествующим вариантом
 осуществления анти- $SIRP\alpha$ антитела, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывает
 человеческий $SIRP\beta_{1v2}$ с умеренной или низкой аффинностью в анализе ППР
 (предпочтительно с использованием *BiaCore*TM) при 25°C с использованием
 внеклеточного домена человеческого $SIRP\beta_{1v2}$, приведенного в SEQ ID NO:54.
 Предпочтительно, K_D является выше 10^{-10} М, более предпочтительно выше 10^{-9} М.
 Предпочтительно, в сочетании со связыванием $SIRP\beta_{1v2}$ с умеренной или низкой
 аффинностью, анти- $SIRP\alpha$ антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывает
 $SIRP\beta_{1v1}$ с K_D выше 10^{-11} М, более предпочтительно выше 3×10^{-11} М, даже более
 предпочтительно выше 10^{-10} М, даже более предпочтительно выше 10^{-9} М в анализе
 ППР (предпочтительно с использованием *BiaCore*TM) при 25°C с использованием
 внеклеточного домена человеческого $SIRP\beta_{1v1}$, приведенного в SEQ ID NO:53. Эти
 анализы описаны или указаны в разделе «Примеры».

Альтернативно или в сочетании с любым из предшествующих вариантов
 осуществления, в предпочтительном варианте осуществления изобретение относится
 к анти- $SIRP\alpha$ антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, по изобретению, в
 котором: (a) переменный домен тяжелой цепи антитела содержит 4 каркасные области
 тяжелой цепи, HFR1-HFR4, и 3 определяющие комплементарность области HCDR1-
 HCDR3, которые функционально связаны в следующем порядке: HFR1-HCDR1-HFR2-
 HCDR2-HFR3-HCDR3-HFR4, где каждая из каркасных областей тяжелой цепи имеет по
 меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%,
 по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или предпочтительно
 имеет 100% аминокислотную идентичность с любой аминокислотной
 последовательностью каркаса из SEQ ID NO:1, 3-6, 8, 10-15, или в котором HFR1-HFR4
 отличаются от любой из SEQ ID NO:1, 3-6, 8, 10-15 одной или более аминокислотными
 заменами, как указано в Таблицах 8-11; и (b) переменный домен легкой цепи антитела
 содержит 4 каркасные области легкой цепи, LFR1-LFR4, и 3 определяющие
 комплементарность области LCDR1-LCDR3, которые функционально связаны в

следующем порядке: LFR1-LCDR1-LFR2-LCDR2-LFR3-LCDR3-LFR4, где каждая из каркасных областей легкой цепи имеет по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или предпочтительно имеет 100% аминокислотную идентичность с любой аминокислотной последовательностью каркаса из SEQ ID NO: 2, 7 или 9, или в котором LFR1, LFR2 и/или LFR4 отличаются от любой из SEQ ID NO: 2, 7 или 9 одной или более аминокислотными заменами, как указано в Таблицах 12-14. В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к анти-SIRP α антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, по изобретению, в котором: (а) 5 10 15 20 25

вариабельный домен тяжелой цепи антитела содержит 4 каркасные области тяжелой цепи, HFR1-HFR4, и 3 определяющие комплементарность области HCDR1-HCDR3, которые функционально связаны в следующем порядке: HFR1-HCDR1-HFR2-HCDR2-HFR3-HCDR3-HFR4, где каждая из каркасных областей тяжелой цепи имеет по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или предпочтительно имеет 100% аминокислотную идентичность с аминокислотной последовательностью каркаса SEQ ID NO 8, или в котором HFR1-HFR4 отличаются от SEQ ID NO 8 одной или более аминокислотными заменами, как указано в Таблицах 8-11; и (b) вариабельный домен легкой цепи антитела содержит 4 каркасные области легкой цепи, LFR1-LFR4, и 3 определяющие комплементарность области LCDR1-LCDR3, которые функционально связаны в следующем порядке: LFR1-LCDR1-LFR2-LCDR2-LFR3-LCDR3-LFR4, где каждая из каркасных областей легкой цепи имеет по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или предпочтительно имеет 100% аминокислотную идентичность с аминокислотной последовательностью каркаса SEQ ID NO 9, или в котором LFR1, LFR2 и/или LFR4 отличаются от SEQ ID NO 9 одной или более аминокислотными заменами, как указано в Таблицах 12-14.

Предпочтительно, аминокислотные остатки, которые находятся в каждом положении (в соответствии с нумерацией Kabat) из FR1, FR2, FR3 и FR4 вариабельного домена тяжелой цепи, представляют собой остатки, указанные в Таблицах 8-11 для FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно, или их консервативные аминокислотные замены, и аминокислотные остатки, которые находятся в каждом положении (в соответствии с нумерацией Kabat) из FR1, FR2 и FR4 вариабельного домена легкой цепи, предпочтительно представляют собой остатки, указанные в Таблицах 12-14 для FR1, FR2 и FR4, соответственно, или их консервативные аминокислотные замены. Однако более предпочтительно, каркасный аминокислотный остаток для любого положения в каркасной области выбирают из аминокислотных остатков, показанных в соответствующем положении в Таблицах 8-14.

Анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по изобретению, предпочтительно содержит HCDR, LCDR, а также каркасные области тяжелой цепи и легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из: (а) HCDR1, содержащей SEQ ID NO: 36; HCDR2, содержащей SEQ ID NO:44; HCDR3, содержащей SEQ ID NO:45; LCDR1, содержащей SEQ ID NO:39; LCDR2, содержащей SEQ ID NO:40; LCDR3, содержащей SEQ ID NO:41; HFR1-HFR4, имеющих по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99% или наиболее предпочтительно 100% аминокислотную идентичность с

мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по
меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99% или наиболее
предпочтительно 100% аминокислотную идентичность с аминокислотными
последовательностями каркаса SEQ ID NO:6, 10 или 11, или HFR1-HFR4, отличающихся
5 от любой из SEQ ID NO:6, 10 или 11 одной или более аминокислотными заменами, как
указано в Таблицах 8-11; LFR1-LFR4, имеющих по меньшей мере 90%, более
предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%,
более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере
97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей
10 мере 99% или наиболее предпочтительно 100% аминокислотную идентичность с
аминокислотной последовательностью каркаса SEQ ID NO:9, или LFR1, LFR2 и/или
LFR4, отличающихся от SEQ ID NO:9 одной или более аминокислотными заменами,
как указано в Таблицах 12-14; и (е) HCDR1, содержащей SEQ ID NO:36; HCDR2,
содержащей SEQ ID NO:42; HCDR3, содержащей SEQ ID NO:43; LCDR1, содержащей
15 SEQ ID NO:39; LCDR2, содержащей SEQ ID NO:40; LCDR3, содержащей SEQ ID NO:41;
HFR1-HFR4, имеющих по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере
91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей
мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по
меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99% или наиболее
20 предпочтительно 100% аминокислотную идентичность с аминокислотной
последовательностью каркаса SEQ ID NO:12, или HFR1-HFR4, отличающихся от SEQ
ID NO:12 одной или более аминокислотными заменами, как указано в Таблицах 8-11;
LFR1-LFR4, имеющих по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере
91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей
25 мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по
меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99% или наиболее
предпочтительно 100% аминокислотную идентичность с аминокислотной
последовательностью каркаса SEQ ID NO:9, или LFR1, LFR2 и/или LFR4, отличающихся
от SEQ ID NO:9 одной или более аминокислотными заменами, как указано в Таблицах
30 12-14. Более предпочтительно, анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий
фрагмент, по изобретению, содержит: (а) HCDR1, содержащую SEQ ID NO:36; HCDR2,
содержащую SEQ ID NO:44; HCDR3, содержащую SEQ ID NO:45; LCDR1, содержащую
SEQ ID NO:39; LCDR2, содержащую SEQ ID NO:40; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO:
41; где (i) HFR1-HFR4 имеют по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей
35 мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по
меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более
предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%
или наиболее предпочтительно 100% аминокислотную идентичность с аминокислотной
последовательностью каркаса SEQ ID NO:8, или HFR1-HFR4 отличаются от SEQ ID
40 NO:8 одной или более аминокислотными заменами, как указано в Таблицах 8-11; и (ii)
LFR1-LFR4 имеют по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%,
более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере
95%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей
мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99% или наиболее предпочтительно
45 100% аминокислотную идентичность с аминокислотной последовательностью каркаса
SEQ ID NO:9, или LFR1, LFR2 и/или LFR4 отличаются от SEQ ID NO:9 одной или более
аминокислотными заменами, как указано в Таблицах 12-14.

Альтернативно или в сочетании с предшествующим вариантом осуществления, в

предпочтительном варианте осуществления каркасные замены ограничены остатками, приведенными в Таблицах 8-14. Таким образом, предпочтительно, если отсутствуют замены в других участках в каркасных областях, и также предпочтительно, если замены ограничены остатками, приведенными в Таблицах 8-14, или их консервативными

5 аминокислотными заменами.

Альтернативно или в сочетании с предшествующим вариантом осуществления, в предпочтительном варианте осуществления анти-SIRP α антитело по настоящему изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит HCVR и LCVR, выбранные из группы, состоящей из: (a) HCVR с аминокислотной последовательностью

10 SEQ ID NO:8; LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:9; (b) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1; LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2; (c) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:3; LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2; (d) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4; LCVR с аминокислотной

15 последовательностью SEQ ID NO:2; (e) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5; LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2; (f) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6; LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7; (g) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:10; LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:9; (h) HCVR

20 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6; LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:9; (i) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11; LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:9; (j) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:12; LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:9; (k) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:13; LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7; (l) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:14; LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2; и (m) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:15; LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2. Более

30 предпочтительно, анти-SIRP α антитело по настоящему изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит HCVR и LCVR, выбранные из группы, состоящей из: (a) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:8 и LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:9; (b) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1 и LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2; (c) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:3 и LCVR

35 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2; (d) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4 и LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2; (e) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5 и LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2; (f) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:14 и LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2; и (g) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:15 и LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2. Наиболее предпочтительно, анти-SIRP α антитело по настоящему изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:8 и LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:9.

45 Помимо связывания как с человеческим (hu)SIRP α _{ВГТ}, так и с (hu)SIRP α ₁, антитела по изобретению также могут связывать SIRP α яванского макака (су), что позволяет проводить *in vivo* исследования в релевантной животной модели. Аффинность антитела по изобретению для SIRP α других биологических видов также не исключена.

Без связи с конкретной теорией, считается, что антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по изобретению может действовать следующим образом. Антитело по изобретению может связывать тот же сайт, с которым связывается CD47, предотвращая связывание SIRP α с CD47 и, следовательно, ингибируя сигнализацию, которая отрицательно регулирует зависимое от Fc-рецептора действие иммунных эффекторных клеток.

Анти-SIRP α антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, по изобретению предпочтительно являются более специфическими, чем известные анти-SIRP α антитела, и демонстрируют превосходную аффинность как для человеческого SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$, так и для человеческого SIRP α_1 , где они имеют пониженную, более предпочтительно низкую аффинность, даже более предпочтительно не имеют поддающуюся обнаружению аффинность для человеческого SIRP γ , предпочтительно при измерении с использованием окрашивания человеческих CD3⁺ Т-клеток, как описано в разделе «Примеры».

В некоторых вариантах осуществления анти-SIRP α антитело по изобретению содержит константную область легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела. Можно использовать любые константные области антитела, известные в данной области. Константная область легкой цепи может представлять собой, например, константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа, например, константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа человека. Константная область тяжелой цепи может представлять собой, например, константную область тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа, например, константную область тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа человека. В одном варианте осуществления константная область легкой или тяжелой цепи представляет собой фрагмент, производное, вариант или мутеин природной константной области.

В одном конкретном варианте осуществления анти-SIRP α антитело по изобретению содержит Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках. Такое анти-SIRP α антитело может быть подходящим для монотерапии SIRP α -положительных опухолей, предпочтительно, почечноклеточного рака или меланомы, поскольку оно может индуцировать ADCC и/или ADCP (Yanagita *et al. JCI Insight* 2017, 2(1), e89140). Без связи с конкретной теорией, считается, что уничтожение раковых клеток таким антителом происходит, по меньшей мере частично, за счет ADCC. Человеческие иммунные эффекторные клетки имеют различные активирующие Fc-рецепторы, которые при связывании инициируют фагоцитоз, трогоцитоз, высвобождение перфорина и гранзима, высвобождение цитокинов, ADCC, ADCP, ADAP и/или другие механизмы. Примерами таких рецепторов являются Fc γ -рецепторы, например, Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32a), Fc γ RIIA (CD16a), Fc γ RIIB (CD16b), Fc γ RIIC (CD32c) и Fc α -рецептор Fc α RI (CD89). Антитела различных природных изоформ связываются с рядом таких рецепторов. Например, IgG1 связывается с Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIC, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB; IgG2 связывается с Fc γ RIIA, Fc γ RIIC, Fc γ RIIA; IgG3 связывается с Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIC, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB; IgG4 связывается с Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIC, Fc γ RIIA; и IgA связывается с Fc α RI.

В предпочтительном варианте осуществления анти-SIRP α антитело по изобретению содержит Fc-область изоформы IgA или IgG. Более предпочтительным является анти-SIRP α антитело, содержащее Fc-область изоформы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4; изоформы IgG1, IgG2 или IgG4 является даже более предпочтительным. Наиболее предпочтительным является анти-SIRP α антитело, содержащее Fc-область изоформы IgG1, предпочтительно

с последовательностью SEQ ID NO:24.

Хотя анти-SIRP α антитела, содержащие Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках, подходят для лечения видов рака, экспрессирующих CD47, комбинированной терапией с терапевтическим антителом, *in vitro* эксперименты по ADCC химерного анти-SIRP α IgG1 антитела в сочетании с терапевтическим антителом (трастузумабом), содержащим человеческую Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках (то есть, антителами, которые способны индуцировать ADCC и/или ADCP), не продемонстрировали усиление ADCC, как ожидалось на основании более ранних результатов с использованием мышинных антител (Фигура 2). Без связи с конкретной теорией, считается, что может иметь место эффект Курландера (Kurlander *J Immunol* 1983, 131(1), 140-147) для анти-SIRP α антитела, которое может конкурировать с терапевтическим антителом (в данном случае трастузумабом) за связывание с активирующим Fc-рецептором на иммунной эффекторной клетке (в данном случае нейтрофильном гранулоците). Таким образом, Fc-хвост анти-SIRP α может связываться в *cis*-положении с Fc-рецептором на соответствующей фагоцитарной иммунной эффекторной клетке, например, гранулоците, макрофаге или дендритной клетке, тем самым уменьшая или предотвращая ADCC и/или ADCP, и/или ADAP. Следовательно, уменьшение связывания Fc-области анти-SIRP α антитела с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках, например, вследствие модификации Fc-хвоста, как показано, повышает эффективность ADCC терапевтического антитела (трастузумаба; Фигура 2). Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к анти-SIRP α антителу, которое проявляет пониженное связывание с, и/или низкую аффинность для активации, Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках, и которое может быть эффективно использовано в комбинированной терапии с терапевтическим антителом, как более подробно описано в разделе «Использование антител по изобретению или их фрагментов». Такое анти-SIRP α антитело может содержать природную Fc-область, которая имеет низкую аффинность для Fc-рецептора, как, например, Fc IgG4 или IgG2, или такое анти-SIRP α антитело может содержать модифицированную Fc-область, в которой одна или более аминокислот были заменены другой аминокислотой(ами) в сравнении с аналогичной не модифицированной Fc-областью. Альтернативно, ферментативное дегликозилирование уменьшает связывание Fc с Fc-гамма-рецепторами, без необходимости в аминокислотных мутациях. Пониженное связывание в данном контексте означает, что аффинность анти-SIRP α антитела, содержащего модифицированную Fc-область, для активирующих Fc-рецепторов, меньше, чем аффинность анти-SIRP α антитела с теми же вариabельными областями, содержащего аналогичную не модифицированную Fc-область. Предпочтительно, аффинность уменьшается по меньшей мере в 2 раза, предпочтительно по меньшей мере в 3 раза, предпочтительно по меньшей мере в 4 раза, предпочтительно по меньшей мере в 5 раз, предпочтительно по меньшей мере в 10 раз, предпочтительно по меньшей мере в 50 раз, предпочтительно по меньшей мере в 100 раз, предпочтительно по меньшей мере в 1000 раз. Аффинность связывания антител с активирующими Fc-рецепторами, как правило, измеряют с использованием ППР или проточной цитометрии методами, известными в данной области, например, методом, описанным в публикации Harrison *et al. in J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012, 63, 23-28. Анти-SIRP α антитела, проявляющие

пониженное связывание или низкую аффинность для человеческого Fc α или Fc γ -рецептора, в сочетании с терапевтическим антителом являются особенно эффективными в клеточном уничтожении раковых клеток в результате усиления ADCC и/или ADCP, и/или ADAP иммунных эффекторных клеток. Как правило, Fc-область анти-SIRP α антитела по изобретению модифицирована для уменьшения связывания с активизирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках.

В предпочтительном варианте осуществления анти-SIRP α антитело по изобретению содержит модифицированную Fc-область, которая проявляет пониженное связывание, или низкую аффинность, предпочтительно отсутствие связывания, с человеческим Fc α или Fc γ -рецептором. Например, связывание IgG1 с Fc γ -рецептором может быть уменьшено путем замены одной или более аминокислот IgG1, выбранных из группы, состоящей из L234, L235, G237, D265, D270, N297, A327, P328 и P329 (нумерация Eu); связывание IgG2 может быть уменьшено путем внесения, например, одной или более из следующих аминокислотных замен: V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S и/или P331S; или H268Q, V309L, A330S и/или P331S (аналог нумерации для Eu нумерации IgG1) (Vafa *et al. Methods* 2014, 65, 114-126); связывание IgG3 может быть уменьшено путем внесения, например, аминокислотных замен L234A и L235A, или аминокислотных замен L234A, L235A и P331S (Leoh *et al. Mol. Immunol.* 2015, 67, 407-415); и связывание IgG4 может быть уменьшено путем внесения, например, аминокислотных замен S228P, F234A и/или L235A (аналог нумерации для Eu нумерации IgG1) (Parekh *et al. mAbs* 2012, 4(3), 310-318). Связывание IgA с Fc α -рецептором может быть уменьшено путем внесения, например, одной или более из аминокислотных замен L257R, P440A, A442R, F443R и/или P440R (последовательная нумерация, Pleass *et al. J. Biol. Chem.* 1999, 271(33), 23508-23514).

Предпочтительно, анти-SIRP α антитело по изобретению содержит модифицированную Fc-область, которая проявляет пониженное связывание, или низкую аффинность, предпочтительно отсутствие связывания, с человеческим Fc α или Fc γ -рецептором в сравнении с таким же анти-SIRP α антителом, содержащим Fc-область дикого типа. Более предпочтительно, модифицированная Fc-область представляет собой Fc-область изоформа IgG. Даже более предпочтительно, модифицированная Fc-область представляет собой Fc-область изоформа IgG1, IgG2 или IgG4. В предпочтительном варианте осуществления анти-SIRP α антитело по изобретению содержит модифицированную Fc-область человеческого IgG1, имеющую одну или более аминокислотных замен в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из L234, L235, G237, D265, D270, N297, A327, P328 и P329 (нумерация Eu).

В предпочтительном варианте осуществления анти-SIRP α антитело по изобретению содержит модифицированную Fc-область человеческого IgG1, имеющую одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, D270A, D270E, D270N, N297A, N297G, A327Q, P328A, P329A и P329G. Более предпочтительно, одну или более аминокислотных замен выбирают из группы, состоящей из L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, N297A, P328A, P329A и P329G. Альтернативно, предпочтительно, одну или более аминокислотных замен выбирают из группы, состоящей из L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, D270A, D270E, D270N, A327Q, P328A, P329A и P329G. Даже более предпочтительно, анти-SIRP α антитело по изобретению содержит модифицированную Fc-область человеческого IgG1, имеющую одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N,

P328A, P329A и P329G. В предпочтительном варианте осуществления модифицированная Fc-область человеческого IgG1 имеет аминокислотные замены: (i) L234A и L235A; (ii) L234E и L235A; (iii) L234A, L235A и P329A; или (iv) L234A, L235A и P329G. Более предпочтительно, модифицированная Fc-область человеческого IgG1 имеет аминокислотные замены: (i) L234A и L235A; или (ii) L234E и L235A. Наиболее предпочтительно, модифицированная Fc-область человеческого IgG1 имеет аминокислотные замены L234A и L235A. В сочетании с любым из предшествующих вариантов осуществления, в предпочтительном варианте осуществления модифицированная Fc-область IgG1 не имеет аминокислотную замену N297A или N297G. Более предпочтительно, модифицированная Fc-область IgG1 не имеет аминокислотную замену в положении N297. Таким образом, предпочтительно, если аминокислотный остаток в положении 297 в соответствии с нумерацией Eu представляет собой аспарагин. Анти-SIRP α антитело по данному варианту осуществления предпочтительно содержит модифицированную Fc-область изотипа IgG1, имеющую SEQ ID NO:25 (с мутациями L234A и L235A, показанными в положениях 117 и 118).

Получение и очистка антител по изобретению или их фрагментов

Анти-SIRP α антитела по изобретению, или их антигенсвязывающие фрагменты, можно получать любым из множества общепринятых методов. Их, как правило, получают в рекомбинантных экспрессионных системах с использованием любого метода, известного в данной области. Смотри, например, Shukla and Thömmes (*Trends in Biotechnol.* 2010, 28(5), 253-261), Harlow and Lane. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988, и Sambrook and Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001. Любую экспрессионную систему, известную в данной области, можно использовать для получения рекомбинантных полипептидов по изобретению. Как правило, клетки-хозяева трансформируют рекомбинантным экспрессионным вектором, который содержит ДНК, кодирующую нужный полипептид.

Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-SIRP α антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент. Одна нуклеотидная последовательность кодирует полипептид, содержащий по меньшей мере переменный домен легкой цепи анти-SIRP α антитела по изобретению; другая нуклеотидная последовательность кодирует полипептид, содержащий по меньшей мере переменный домен тяжелой цепи анти-SIRP α антитела по изобретению. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере одну из HCVR и LCVR антитела. Предпочтительная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой экспрессионный вектор, в котором нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды антитела по изобретению, функционально связаны с последовательностями регуляции экспрессии, такими как, например, промотор и лидерная последовательность (также называемая сигнальным пептидом, сигнальной последовательностью, направляющим сигналом, сигналом локализации, последовательностью локализации, транзитным пептидом или лидерным пептидом), для экспрессии кодирующей нуклеотидной последовательности в клетке-хозяине. Предпочтительная лидерная последовательность для тяжелой цепи приведена в SEQ ID NO:28. Предпочтительная лидерная последовательность для легкой цепи приведена в SEQ ID NO:29. Другая подходящая лидерная последовательность для использования по настоящему изобретению, приведена в SEQ ID NO:27.

В другом аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше в данном разделе. Клетка предпочтительно представляет собой выделенную клетку или культивируемую клетку. В число клеток-хозяев, которые могут быть использованы, входят клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот. Прокариоты включают грамотрицательные или грамположительные микроорганизмы, например, *Escherichia coli* или бациллы. Клетки высших эукариот включают клетки насекомых и стабилизированные линии клеток млекопитающих. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), линию клеток COS-7 почки обезьяны (Gluzman *et al. Cell* 1981, 23, 175), клетки 293 человеческой эмбриональной почки (HEK), клетки L, клетки C127, клетки 3T3, клетки HeLa, линию клеток почки новорожденного хомяка (ВНК) и линию клеток CV1/EBNA, полученную из линии клеток CV1 почки африканской зеленой мартышки, описанную в публикации McMahan *et al. EMBO J.* 1991, 10, 2821. Соответствующие клонирующие и экспрессионные векторы для использования с клетками-хозяевами бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих, например, описаны в публикации Pouwels *et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985).*

Трансформированные клетки можно культивировать в условиях, которые стимулируют экспрессию полипептида. Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к способу получения анти-SIRP α антитела по изобретению, или его антигенсвязывающего фрагмента, включающему этап культивирования клетки, содержащей по меньшей мере один экспрессионный вектор, описанный в настоящем документе, в условиях, способствующих экспрессии полипептида, и, необязательно, извлечение полипептида.

Анти-SIRP α антитело по изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, можно извлекать общепринятыми методами очистки белков, включая, например, хроматографию на гидроксипатите, электрофорез в геле, диализ, аффинную хроматографию (такую как, например, хроматография на белок А-сефарозе, белок G-сефарозе), ионообменную хроматографию (такую как, например, анионообменная хроматография, катионообменная хроматография, смешанная хроматография) или хроматографию гидрофобного взаимодействия (смотри, например, Low *et al. J. Chromatography B* 2007, 848, 48-63; Shukla *et al. J. Chromatography B* 2007, 848, 28-39). Аффинная хроматография включает аффинную хроматографию с использованием лигандов CaptureSelect™, которые представляют собой уникальный раствор для аффинной очистки на основе фрагментов однодоменных антител (VHH) верблюдовых (смотри, например, Eifler *et al. Biotechnology Progress* 2014, 30(6), 1311-1318). Полипептиды, предусмотренные для использования по настоящему изобретению, включают практически гомогенные полипептиды рекомбинантного анти-SIRP α антитела, практически свободные от примесных эндогенных материалов.

Модификация(и) аминокислотной последовательности анти-SIRP α антитела по изобретению, или его антигенсвязывающего фрагмента, также предусмотрена. Например, может быть желательным увеличение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела получают путем внесения соответствующих изменений нуклеотидов в кодирующую антитело нуклеиновую кислоту, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента. Любое сочетание делеций, вставок и замен можно производить для получения

конечной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает нужными характеристиками. Аминокислотные изменения также могут приводить к изменениям посттрансляционного процессинга антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, таким как изменение количества или положения сайтов гликозилирования.

5 Вставки в аминокислотную последовательность включают амино- и/или карбокси-концевые слитые фрагменты, имеющие диапазон длин от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым остатком метионила или антитело, 10 слитое с цитотоксическим полипептидом. Другие варианты антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, со вставками включают продукт слияния с ферментом или полипептидом, который увеличивает время полураспада в сыворотке антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

Другим видом варианта является вариант с аминокислотной заменой. Эти варианты 15 имеют по меньшей мере один аминокислотный остаток в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, который заменен другим остатком. Такой заместительный мутагенез антител, или их антигенсвязывающих фрагментов, включает изменения FR, описанные выше, а также изменения для уменьшения связывания Fc-области с Fc-рецептором с целью предотвращения активации рецептора, как описано 20 выше.

В другом виде аминокислотного варианта антитела изменен исходный паттерн гликозилирования антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента. Под изменением понимают делецию одного или более углеводных фрагментов в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, и/или добавление одного или более сайтов 25 гликозилирования, которые отсутствуют в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте. Гликозилирование полипептидов, как правило, бывает либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное гликозилирование означает присоединение углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую 30 аминокислоту кроме пролина, являются последовательностями узнавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование означает присоединение одного из моносахаридов или производных 35 моносахаридов N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, чаще всего серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксиллизин. Добавление сайтов гликозилирования в антитело удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности так, чтобы она содержала одну или более из вышеописанных трипептидных 40 последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Изменение также можно производить путем добавления, или замены на, одного или более остатков серина или треонина в последовательность исходного антитела (для сайтов O-связанного гликозилирования). Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотной последовательности антитела, получают различными способами, 45 известными в данной области. Эти способы включают, но без ограничения, выделение из природного источника (в случае природных вариантов аминокислотной последовательности) или получение путем олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее полученного

варианта или неизмененного варианта антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Композиции, содержащие антитела по изобретению или их фрагменты

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей анти-SIRP α антитело по изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фармацевтическое производное или пролекарство, совместно с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, такими как, например, фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или среда. Предпочтительно, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей анти-SIRP α антитело по изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Такая фармацевтическая композиция предназначена для введения субъекту. Фармацевтическая композиция по изобретению может быть использована в способах лечения, описанных далее в настоящем документе, путем введения эффективного количества композиции субъекту, который нуждается в этом. Используемый в настоящем документе термин «субъект» относится ко всем животным, классифицируемым как млекопитающие, и охватывает, но без ограничения, приматов и людей. Субъект предпочтительно является человеком.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый эксципиент» должен охватывать любые, и все, растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства, и тому подобное, совместимые с фармацевтическим введением (смотри, например, Handbook of Pharmaceutical Excipients, Rowe *et al.* Eds. 7-е издание, 2012, www.pharmpress.com). Использование таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением тех случаев, когда общепринятые среды или средства несовместимы с активным соединением, их использование в композиции предусмотрено. Приемлемые эксципиенты, включая носители или стабилизаторы, нетоксичны для реципиентов в используемых дозах и концентрациях, и включают буферы, такие как фосфат, цитрат, ацетат, гистидин и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид; гексаметэтония хлорид; бензалкония хлорид, бензэтония хлорид; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, Zn-белковые комплексы) и/или неионные сурфактанты, такие как полисорбат (например, твинTM), полоксамер (например, плюроникиTM), гидроксипропил- β -циклодекстрин или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Дополнительные активные соединения также можно включать в фармацевтическую композицию по изобретению. Таким образом, в конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция по изобретению также может содержать более одного активного соединения, необходимого для лечения конкретного состояния, предпочтительно соединения с дополняющими активностями, которые не влияют

отрицательно друг на друга. Эффективное количество такого другого активного средства зависит, в числе прочего, от количества анти-SIRP α антитела по изобретению, или его антигенсвязывающего фрагмента, присутствующего в фармацевтической композиции, вида заболевания или нарушения, или лечения и так далее.

5 В одном из вариантов осуществления анти-SIRP α антитело по изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, готовят с носителями, которые будут защищать
указанное соединение от быстрой элиминации из организма, например, в виде препарата
с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные
10 системы доставки, например, липосомы. Можно использовать биоразлагаемые,
биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды,
полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы
получения таких препаратов известны специалистам в данной области. Липосомные
суспензии, включая направленные липосомы, также можно использовать в качестве
фармацевтически приемлемых носителей. Их можно получать способами, известными
15 специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4522811 или
WO2010/095940.

Путь введения анти-SIRP α антитела по изобретению, или его антигенсвязывающего
фрагмента, может быть пероральным, парентеральным, ингаляционным или топическим.
Используемый в настоящем документе термин «парентеральный» путь введения
20 включает внутривенное, внутриартериальное, в лимфатические узлы, внутрибрюшинное,
внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение. Внутривенные
формы парентерального введения являются предпочтительными. «Системное введение»
означает пероральное, внутривенное, внутрибрюшинное и внутримышечное введение.
Количество антитела, необходимое для терапевтического или профилактического
25 эффекта, будет, безусловно, варьироваться в зависимости от выбранного антитела,
природы и степени тяжести подвергаемого лечению состояния, а также от субъекта.
Кроме того, антитело можно вводить путем импульсной инфузии, например, с
убывающими дозами антитела. Предпочтительно, введение доз выполняют путем
инъекций, наиболее предпочтительно внутривенных или подкожных инъекций, частично
30 в зависимости от того, является ли введение кратковременным или постоянным.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция
по изобретению может находиться в форме, подходящей для парентерального введения,
такой как стерильные растворы, суспензии или лиофилизированные препараты в
подходящей стандартной лекарственной форме. Фармацевтические композиции,
35 подходящие для инъекционного введения, включают стерильные водные растворы (в
случае водорастворимы препаратов) или дисперсии и стерильные порошки для
приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий непосредственно
перед введением. В случае внутривенного введения подходящие носители включают
физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, кремофор EM (BASF,
40 Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна
быть стерильной и должна быть жидкой, чтобы ее легко можно было вводить шприцем.
Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения, и должна быть
защищена от загрязнения микроорганизмами, такими как бактерии и грибы. Носитель
может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую,
45 например, воду, этанол, фармацевтически приемлемый полиол, такой как глицерин,
пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль, а также их подходящие смеси.
Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования такого
покрытия, как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае

дисперсии и путем использования сурфактантов. Действие микроорганизмов можно предотвращать с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобного. Во многих случаях в композицию будет предпочтительно включать изотонические средства, например, сахара, полиспирты, такие как маннит или сорбит, или хлорид натрия.

Продолжительной абсорбции инъекционных композиций можно добиваться путем включения в композицию средства, замедляющего абсорбцию, например, алюминия моностеарата или желатина.

Стерильные инъекционные растворы можно получать путем включения активного соединения (например, полипептида или антитела) в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним, или с сочетанием ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит базовую дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофилизация, с получением порошка активного ингредиента плюс любой дополнительный нужный ингредиент из его ранее стерилизованного фильтрованием раствора.

В конкретном варианте осуществления указанную фармацевтическую композицию вводят внутривенным (в/в) или подкожным (п/к) путем введения. Можно использовать соответствующие эксципиенты, такие как наполнители, буферные средства или сурфактанты. Указанные препараты получают стандартными способами получения парентерально вводимых композиций, как хорошо известно в данной области и описано более подробно в различных литературных источниках, включая, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Allen Ed. 22nd edition, 2012, www.pharmpress.com.

Особенно предпочтительно формулировать фармацевтические композиции, а именно, парентеральные композиции, в стандартной лекарственной форме для легкости введения и для единообразия доз. Используемый в настоящем документе термин «стандартная лекарственная форма» означает физически дискретные единицы, подходящие для однократного введения дозы субъекту, получающему лечение; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения (анти-SIRP α антитела по изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента), рассчитанное для оказания желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификации для стандартных лекарственных форм по изобретению продиктованы и напрямую зависят от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, а также ограничений, принятых в области изготовления такого активного соединения для лечения индивидуумов.

Как правило, эффективное вводимое количество анти-SIRP α антитела по изобретению будет зависеть от относительной эффективности выбранного соединения, степени тяжести заболевания, подвергаемого лечению, и массы тела больного. Однако активные соединения, как правило, вводят один или более раз в сутки, например, 1, 2, 3 или 4 раза в сутки, с типичными суммарными суточными дозами в диапазоне от 0,001 до 1000 мг/кг массы тела/сутки, предпочтительно от примерно 0,01 до примерно 100 мг/кг массы тела/сутки, наиболее предпочтительно от примерно 0,05 до 10 мг/кг массы тела/сутки. Руководства для выбора соответствующих доз антител доступны (смотри,

например, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Baert *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 1999, 348, 601-608; 5 Milgrom *et al.* *New Engl. J. Med.* 1999, 341, 1966-1973; Slamon *et al.* *New Engl. J. Med.* 2001, 344, 783-792; Beniaminovitz *et al.* *New Engl. J. Med.* 2000, 342, 613-619; Ghosh *et al.* *New Engl. J. Med.* 2003, 348, 24-32; Lipsky *et al.* *New Engl. J. Med.* 2000, 343, 1594-1602).

Соответствующую дозу определяет клиницист, например, с использованием параметров или факторов, которые, как известно или предполагается в данной области, 10 влияют на лечение или предположительно будут влиять на лечение. Как правило, введение доз начинают с количества, которое намного меньше оптимальной дозы, и увеличивают с небольшими приращениями до достижения желаемого или оптимального эффекта относительно любых отрицательных побочных эффектов. Важные 15 диагностические показатели включают симптомы, например, воспаления, или уровень продуцируемых воспалительных цитокинов. Антитела, или фрагменты антител, можно вводить путем непрерывной инфузии, или отдельными дозами с интервалами, например, один день, одна неделя, либо 1-7 раз в неделю. Альтернативно, антитела, или фрагменты антител, можно вводить один раз в день, через день, 2-3 раза в неделю, раз в 2 недели, раз в 3 недели, раз в 6 недель. Предпочтительным протоколом введения доз является 20 протокол, включающий максимальную дозу или частоту введения доз, которые позволяют избегать значительных нежелательных побочных эффектов. Суммарная или средняя недельная доза, как правило, составляет по меньшей мере 0,05 мкг/кг массы тела, как правило, по меньшей мере 0,2 мкг/кг, как правило, по меньшей мере 0,5 мкг/кг, как правило, по меньшей мере 1 мкг/кг, более конкретно по меньшей мере 10 мкг/кг, чаще всего, по меньшей мере 100 мкг/кг, предпочтительно по меньшей мере 0,2 мг/кг, более предпочтительно по меньшей мере 1,0 мг/кг, наиболее предпочтительно по 25 меньшей мере 2,0 мг/кг, оптимально по меньшей мере 10 мг/кг, более оптимально по меньшей мере 25 мг/кг, и наиболее оптимально по меньшей мере 50 мг/кг (смотри, например, Yang *et al.* *New Engl. J. Med.* 2003 349, 427-434; Herold *et al.* *New Engl. J. Med.* 30 2002, 346, 1692-1698; Liu *et al.* *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 1999, 67, 451-456; Portielje *et al.* *Cancer Immunol. Immunother.* 2003, 52, 133-144). Предпочтительно, суммарная или средняя недельная доза находится в диапазоне от 0,001 до 100 мг/кг массы тела, предпочтительно от примерно 0,01 до примерно 50 мг/кг массы тела, предпочтительно от примерно 0,05 до примерно 30 мг/кг массы тела, наиболее предпочтительно от 35 примерно 0,1 до 10 мг/кг массы тела.

Фармацевтические композиции могут быть заключены в контейнер, пакет или дозатор, совместно с инструкциями по введению.

Анти-SIRP α антитела по настоящему изобретению, или их антигенсвязывающие фрагменты, предпочтительно используют в сочетании с терапевтическим антителом, 40 как более подробно описано в следующем разделе, и, возможно, в сочетании с другими лекарственными средствами. Терапевтическое антитело может составлять часть той же композиции, или быть предоставлено в виде отдельной композиции для введения в одно и то же время, или в другое время. Альтернативно или в сочетании с любым из предшествующих вариантов осуществления, любые другие лекарственные средства 45 могут составлять часть той же композиции, или быть предоставлены в виде отдельной композиции для введения в одно и то же время, или в другое время.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция по изобретению имеет форму лиофилизированной таблетки (лиофилизированных порошков), которую необходимо

растворять (то есть, восстанавливать) (в водной среде) перед внутривенным введением, или форму замороженного (водного) раствора, который необходимо размораживать перед введением. Наиболее предпочтительно, фармацевтическая композиция имеет форму лиофилизированной таблетки. Соответствующие фармацевтически приемлемые эксципиенты для включения в фармацевтическую композицию (перед лиофилизацией) по настоящему изобретению включают буферные растворы (например, цитрат, ацетат, гистидин или сукцинат, содержащий соли, в воде), лиопротекторы (например, сахарозу, трегалозу), модифицирующие тоничность средства (например, хлорид натрия), сурфактанты (например, полисорбат или гидроксипропил- β -циклодекстрин) и наполнители (например, маннит, глицин). Эксципиенты, используемые для лиофилизированных белковых препаратов, выбирают на основании их способности предотвращать денатурацию белка в процессе лиофилизации, а также при хранении.

Использование антител по изобретению или их фрагментов

Анти-SIRP α антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и фармацевтические композиции по изобретению будут полезны в лечении заболеваний, состояний и нарушений, при которых экспрессируется SIRP α или при которых экспрессируются SIRP α и CD47, предпочтительно избыточно экспрессируются, в частности, в лечении CD47-экспрессирующего рака.

Таким образом, в следующем аспекте настоящее изобретение относится к анти-SIRP α антителу по изобретению, или его антигенсвязывающему фрагменту, или фармацевтической композиции по изобретению для использования в качестве лекарственного препарата.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к анти-SIRP α антителу по изобретению, или его антигенсвязывающему фрагменту, или фармацевтической композиции по изобретению для использования в лечении рака, предпочтительно в лечении CD47-экспрессирующего рака.

Установлено, что CD47 экспрессируется на человеческих опухолях нескольких видов, включая острый миелоидный лейкоз (AML), рак молочной железы, хронический миелоидный лейкоз (CML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый лимфобластный лейкоз (ALL), неходжкинскую лимфому (NHL), в том числе фолликулярную лимфому (FL) и диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), печеночно-клеточную карциному, множественную миелому (MM), рак мочевого пузыря, рак толстого кишечника, рак желудка, рак яичника, рак головы и шеи, нейробластому, меланому, остеосаркому, рак поджелудочной железы, почечную карциному, рак предстательной железы, печеночно-клеточную карциному, рак легкого и другие солидные опухоли (Chao *et al. Curr Opin Immunol.* 2012, 24(2), 225-232; Chao *et al. Cell* 2010, 142(5), 699-713; Rösner *et al. Mol Cancer Ther.* 2018). Увеличение экспрессии было обнаружено в некоторых из этих опухолей в сравнении с их нормальными клеточными аналогами (Russ *et al. Blood Rev.* 2018, doi: 10.1016/j.blre.2018.04.005). Было выдвинуто предположение, что - наряду с другими гипотетическими механизмами CD47 - повышение регуляции CD47 в опухолевых клетках позволяет опухолям уклоняться от надзора врожденной иммунной системы путем избегания фагоцитоза (Chao *et al. Curr Opin Immunol.* 2012, 24(2), 225-232).

Интересно, что Yanagita с соавторами сообщали, что клетки почечноклеточного рака и меланомы человека в высокой степени экспрессируют SIRP α (Yanagita *et al. JCI Insight* 2017, 2(1), e89140). Кроме того, экспрессия SIRP α была обнаружена на некоторых клетках нейробластомы и при остром миелоидном лейкозе (AML). Sosale с соавторами сообщали об экспрессии SIRP α на клетках карциномы легкого и глиобластомы (Sosale

et al. Mol. Ther. Способы Clin. Dev. 2016, 3, 16080). Chen с соавторами сообщали об экспрессии SIRP α на клетках астроцитомы и глиобластомы (Chen *et al. Cancer Res* 2004, 64(1), 117-127). Клетки мезотелиомы и В-клеточной лимфомы также могут быть SIRP α -положительными. Таким образом, в другом аспекте настоящее изобретение относится к анти-SIRP α антителу по изобретению, или его антигенсвязывающему фрагменту, или фармацевтической композиции по изобретению для использования в лечении заболевания, состояния или нарушения, при котором экспрессируется SIRP α , в частности, в лечении SIRP α -экспрессирующего рака, такого как, например, почечноклеточный рак и меланома человека, но также и при аутоиммунном заболевании, например, при ревматоидном артрите, рассеянном склерозе и, возможно, гранулематозе с полиангиитом (GPA), микроскопическом полиангиите (MPA) и обыкновенной пузырчатке (PV). Анти-SIRP α антитела также могут повышать эффективность другого антитела при заболеваниях, используют ли это последнее антитело для устранения патогенных, или инфицированных клеток. В случае SIRP α -экспрессирующей опухоли, анти-SIRP α антитело по изобретению, содержащее человеческую Fc-область дикого типа, может быть подходящим в качестве монотерапии. В одном варианте осуществления изобретение относится к анти-SIRP α антителу, содержащему Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках, для использования в лечении SIRP α -положительных солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека, предпочтительно почечноклеточного рака или злокачественной меланомы. Предпочтительно, Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках, имеет изотип IgA или IgG. Более предпочтительным является анти-SIRP α антитело, содержащее Fc-область изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4; даже более предпочтительным является изотип IgG1, IgG2 или IgG4. Наиболее предпочтительным является анти-SIRP α антитело, содержащее Fc-область изотипа IgG1.

Как указано выше, анти-SIRP α антитела по изобретению, или их антигенсвязывающие фрагменты, в которых, предпочтительно, эффекторная функция Fc частично или полностью нарушена, могут быть использованы для улучшения эффекторных функций - например, для повышения ADCC - терапевтического антитела. Предпочтительно, рак, который предстоит лечить таким антителом по изобретению, или его антигенсвязывающим фрагментом, и терапевтическим антителом, не экспрессирует SIRP α . Такой способ лечения предпочтительно объединяют с одним или более дополнительными видами противораковой терапии. Обнаружено, что анти-SIRP α антитело, содержащее модифицированную Fc-область, которая проявляет пониженное связывание с человеческим Fc α или Fc γ -рецептором в сравнении с таким же анти-SIRP α антителом, содержащим Fc-область дикого типа, как описано выше в настоящем документе, повышает *in vitro* ADCC терапевтического антитела при использовании нейтрофилов в качестве эффекторных клеток. Антитела 1-13, описанные в разделе «Примеры», демонстрируют зависимое от дозы возрастание *in vitro* ADCC при использовании нейтрофилов от гетерозиготных SIRP α_1 /SIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$ доноров.

Предпочтительными антителами являются антитела, которые повышают *in vitro* ADCC при использовании нейтрофилов в максимальной степени, где предпочтительно с отсутствием признаков иммуногенности *in vitro* в анализе Т-клеточной пролиферации и/или IL-2 ELISpot. Наиболее предпочтительными являются антитела 1-6, 12 и 13, предпочтительно антитело 6.

Предпочтительно, терапевтическое антитело представляет собой антитело,

одобренное органами государственного регулирования и контроля оборота лекарственных средств, такими как Европейское агентство по лекарственным средствам (EMA) или Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA). Можно сверяться с электронной системой базы данных большинства органов государственного регулирования и контроля для установления того, одобрено ли антитело для использования в области медицины.

Как правило, терапевтическое антитело для использования в сочетании с анти-SIRP α антителом по изобретению (предпочтительно, с пониженным связыванием его Fc-области), или его антигенсвязывающим фрагментом, представляет собой

моноспецифическое или биспецифическое антитело, или фрагмент антитела, содержащее по меньшей мере одну из HCVR и LCVR, связывающуюся с мишенью, выбранной из группы, состоящей из аннексина A1, AMHR2, AXL, BCMA, B7H3, B7H4, CA6, CA9, CA15-3, CA19-9, CA27-29, CA125, CA242, CCR2, CCR4, CCR5, CD2, CD4, CD16, CD19, CD20, CD22, CD27, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD47, CD52, CD56, CD70, CD74, CD79, CD98, CD115, CD123, CD138, CD203c, CD303, CD333, CEA, CEACAM, CLCA-1, CLL-1, c-MET, Cripto, CTLA-4, DLL3, EGFL, EGFR, EPCAM, Eph (например, EphA2 или EphB3), рецептора эндотелина B (ETBR), FAP, FcRL5 (CD307), FGF, FGFR (например, FGFR3), FOLR1, фукозил-GM1, GCC, GD2, GPNMB, gp100, HER2, HER3, HMW-MAA, интегрин α (например, $\alpha v \beta 3$ и $\alpha v \beta 5$), IGF1R, IL1RAP, каппа-антигена миеломы, TM4SF1 (или антигена L6), Lewis A-подобного углевода, Lewis X, Lewis Y, LIV1, мезотелина, MUC1, MUC16, NaPi2b, нектин 4, PD-1, PD-L1, рецептора пролактина, PSMA, PTK7, SLC44A4, STEAP-1, антигена 5T4 (или TPBG, тробластного гликопротеина), TF (тканевого фактора), антигена Томсона-Фриденрайха (TF-Ag), Tag72, TNF, TNFR, TROP2, VEGF, VEGFR и VLA.

Неограничивающими примерами видов рака, которые экспрессируют такую мишень, являются: (HER2-положительный) рак молочной железы, (EGFR-положительная) карцинома толстой кишки, (GD2-положительная) нейробластома, меланома, остеосаркома, (CD20-положительные) В-клеточные лимфомы, (CD38-положительная) множественная миелома, (CD52-положительная) лимфома и (CD33-положительный) острый миелоидный лейкоз (AML).

Предпочтительным является моноспецифическое терапевтическое антитело. Более предпочтительным является терапевтическое антитело против связанной с мембраной мишени на поверхности опухолевых клеток.

В предпочтительном варианте осуществления терапевтическое антитело против связанной с мембраной мишени на поверхности опухолевых клеток содержит человеческую Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках. Посредством связывания с этими активирующими Fc-рецепторами, описанными выше в настоящем документе, терапевтическое антитело, содержащее человеческую Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках, может индуцировать ADCC и/или ADCP.

Терапевтические антитела изотипов IgG, IgE или IgA человека содержат человеческую Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках.

Предпочтительным терапевтическим антителом для использования по изобретению является терапевтическое антитело изотипа IgG или IgA. Более предпочтительным является терапевтическое антитело изотипа IgG, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 антитела. Даже более предпочтительным является терапевтическое антитело изотипа

IgG1 или IgG2. Наиболее предпочтительным является терапевтическое антитело изотипа IgG1.

Подходящие терапевтические антитела для использования в сочетании с анти-SIRP α антителом по изобретению, или его антигенсвязывающим фрагментом, включают
5 алектумумаб (например, для лечения рассеянного склероза), обинтузумаб (например, для лечения CLL, FL), офатумумаб (например, для лечения ММ), даратумумаб (например, для лечения ММ), трастузумаб (например, для лечения избыточно экспрессирующего HER-2 рака молочной железы, рака желудка, аденокарциномы гастроэзофагеального соединения), динутуксимаб (например, для лечения нейробластомы у педиатрических
10 пациентов), панитумумаб, цетуксимаб (например, для лечения рака головы и шеи, колоректального рака), ритуксимаб, офатумумаб (например, для лечения NHL, CLL, FL, DLBCL), ублитуксимаб, маргетуксимаб, пертузумаб, велтузумаб, брентуксимаб, элотузумаб, ибритумомаб, ифаботузумаб, фарлетузумаб, отиертузумаб, каротуксимаб, эпратузумаб, инебилизумаб, лумретузумаб, могамулизумаб, лейкотуксимаб, изатуксимаб,
15 опортузумаб, энситуксимаб, цемиплимаб, ниволумаб, пембролизумаб, дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб, спартализумаб, тислелизумаб, камрелизумаб, синтилимаб, цемиплимаб. Такие терапевтические антитела также могут быть предоставлены в виде части конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). Подходящие ADC для использования в сочетании с анти-SIRP α антителом по изобретению, или его
20 антигенсвязывающим фрагментом, включают, но без ограничения, трастузумаб дуокармазин, трастузумаб дерукстекал, трастузумаб эмтансин, гемтузумаб озагомицин, инотузумаб озагомицин, полатузумаб ведотин, наратуксимаб эмтансин, ибритутомаб тиуксетан и брентуксимаб ведотин.

Антитела по изобретению, или их антигенсвязывающие фрагменты, и терапевтическое
25 антитело могут находиться в одном и том же препарате, или могут быть введены в разных препаратах. Введение может быть одновременным или последовательным, и может быть выполнено в любом порядке.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к анти-SIRP α антителу по изобретению, или его антигенсвязывающему
30 фрагменту, для использования в лечении солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека в сочетании с использованием терапевтического антитела против связанной с мембраной мишени на поверхности опухолевых клеток, содержащего человеческую Fc-область, которая связывается с активизирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных
35 эффекторных клетках, где анти-SIRP α антитело содержит модифицированную Fc-область, которая проявляет пониженное связывание с человеческим Fc α или Fc γ -рецептором в сравнении с таким же анти-SIRP α антителом, содержащим Fc-область дикого типа, предпочтительно модифицированную Fc-область человеческого IgG1, имеющую одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из: L234, L235, G237, D265, D270, N297, A327, P328 и P329 (нумерация Eu).
40

Альтернативно или в сочетании с любым из других вариантов осуществления, в одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к использованию анти-SIRP α антитела по изобретению, или его антигенсвязывающего фрагмента, или фармацевтической композиции по изобретению для производства лекарственного
45 препарата для лечения заболевания, состояния или нарушения, при котором экспрессируется, предпочтительно избыточно экспрессируется, CD47, в частности, для лечения рака. Для иллюстративных неограничивающих примеров рака, который можно лечить в соответствии с изобретением, смотри выше в настоящем документе. В

предпочтительном варианте осуществления анти-SIRP α антитело по изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическая композиция по изобретению предназначены для одновременного или последовательного введения с терапевтическим антителом, описанным выше.

5 Альтернативно или в сочетании с любым из других вариантов осуществления, в одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к использованию анти-SIRP α антитела по изобретению, или его антигенсвязывающего фрагмента, или фармацевтической композиции по изобретению для производства лекарственного
10 препарата для лечения SIRP α -экспрессирующего рака, такого как почечноклеточный рак или меланома человека. В предпочтительном варианте осуществления анти-SIRP α антитело по изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическая композиция по изобретению предназначены для одновременного или последовательного введения с терапевтическим антителом, описанным выше.

15 Альтернативно или в сочетании с любым из других вариантов осуществления, в одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения рака, в частности, рака, опухолевые клетки которого экспрессируют CD47 или SIRP α , включающему введение субъекту, который нуждается в указанном лечении, терапевтически эффективного количества анти-SIRP α антитела по изобретению, или его антигенсвязывающего фрагмента, или фармацевтической композиции по
20 изобретению. В конкретном варианте осуществления указанный рак представляет собой рак, характеризующийся тем, что его опухолевые клетки экспрессируют CD47, потенциально избыточно экспрессируют CD47. Для иллюстративных неограничивающих примеров CD47-экспрессирующих видов рака, который можно лечить в соответствии с изобретением, смотри выше в настоящем документе. В альтернативном варианте
25 осуществления SIRP α -экспрессирующий рак представляет собой почечноклеточный рак или меланому, или нейробластому, или острый миелоидный лейкоз (AML) человека.

 Предпочтительно, если анти-SIRP α антитело по изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, или композиция по изобретению ингибирует рост
30 опухолевых клеток, экспрессирующих CD47, при использовании в сочетании с терапевтическим антителом. «Ингибирование роста опухолевых клеток, экспрессирующих CD47» или «ингибирование роста» означает, что достигается измеримое ингибирование роста раковых клеток (экспрессирующих или избыточно экспрессирующих CD47). Предпочтительные ингибирующие рост анти-SIRP α антитела ингибируют рост CD47-экспрессирующих опухолевых клеток на более чем 20%,
35 предпочтительно от примерно 20% до примерно 50%, и даже более предпочтительно, на более чем 50% (например, от примерно 50% до примерно 100%) в сравнении с соответствующим контролем, где контроль, как правило, представляет собой опухолевые клетки, не обработанные тестируемым антителом. В одном варианте осуществления ингибирование роста можно измерять при концентрации антитела от
40 примерно 0,1 до 30 мг/мл или от примерно 0,5 нМ до 200 нМ в клеточной культуре, где ингибирование роста определяют через 1-10 дней после воздействия антитела на опухолевые клетки. Ингибирование роста опухолевых клеток *in vivo* можно определять различными способами, например, как описано в EP2474557B1. Антитело является ингибирующим рост *in vivo*, если введение анти-SIRP α антитела в дозе от примерно 1
45 мг/кг до примерно 100 мг/кг массы тела приводит к уменьшению размера опухоли или пролиферации опухолевых клеток в течение срока от примерно 5 дней до 3 месяцев после первого введения антитела, предпочтительно в течение срока от примерно 5 дней до 30 дней.

Антитело, которое «вызывает гибель клеток», представляет собой антитело, которое делает жизнеспособные клетки нежизнеспособными. Клетка представляет собой клетку, которая экспрессирует CD47. Гибель клеток *in vitro* можно определять в отсутствие комплемента и иммунных эффекторных клеток, чтобы отличать гибель клеток, вызванную ADCC. Таким образом, анализ на гибель клеток можно проводить с использованием инактивированной нагреванием сыворотки (то есть, в отсутствие комплемента) в отсутствие иммунных эффекторных клеток. Для определения того, способно ли антитело вызывать гибель клеток, можно оценивать утрату целостности мембраны на основании поглощения пропидий иодида (PI), трипанового синего (смотри Moore *et al. Cytotechnology* 1995; 17, 1-11) или 7-AAD в сравнении с необработанными клетками, или утрату жизнеспособности клеток (восстановление тетразолия, восстановление резазурина, маркеры протеазы и определение АТФ).

Выражение «терапевтически эффективное количество» означает количество, эффективное для лечения рака, как было определено ранее; указанное количество может представлять собой количество, достаточное для вызывания желаемого ответа, или для ослабления симптома или признака, например, метастазирования или прогрессирования, размера или роста первичной опухоли. Терапевтически эффективное количество для конкретного субъекта может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние, которое подвергают лечению, общее состояние здоровья субъекта, способ, путь и доза введения, а также степень тяжести побочных эффектов. Критерии оценки ответа описаны (RECIST; Eisenhauer *et al. European Journal of Cancer* 2009; 45, 228-247; Schwartz *et al. European Journal of Cancer* 2016; 62, 138-145; Cheson *et al. Journal of Clinical Oncology* 2003; 21(24), 4642-4649; Moghbel *et al. Journal of Nuclear Medicine* 2016, 57(6), 928-935; литературные источники включены посредством ссылки в полном объеме). Предпочтительно, эффект приведет к стазу опухоли (то есть, без уменьшения, но с сохранением существующего состояния), уменьшению числа лезий или уменьшению размера опухоли на по меньшей мере примерно 10%, предпочтительно по меньшей мере 20%, 30%, 50%, 70% или даже 90%, или более, в сравнении с исходным размером опухоли, предпочтительно уменьшению на по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% суммы диаметров целевых лезий, принимая за основу исходную сумму диаметров. В случае использования сочетания терапевтически эффективное количество пропорционально сочетанию компонентов, и эффект не ограничен только отдельными компонентами. Терапевтически эффективное количество будет модулировать симптомы предпочтительно на по меньшей мере примерно 10%; предпочтительно на по меньшей мере примерно 20%; предпочтительно на по меньшей мере примерно 30%; или более предпочтительно на по меньшей мере примерно 50%. Альтернативно, модуляция миграции будет означать, что затронута миграция или направленная миграция клеток разных типов. Это приведет, например, к статистически значимым и поддающимся количественной оценке изменениям числа затронутых клеток. Это может представлять собой уменьшение числа целевых клеток, которые привлечены в течение определенного периода времени или в целевую область. Также можно проводить мониторинг степени прогрессирования, размера, распространения или роста первичной опухоли.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к анти-SIRP α антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, или фармацевтической композиции, описанным выше в настоящем документе, для использования в лечении заболевания, состояния или нарушения, при котором экспрессируется CD47, в частности,

рака, более конкретно, солидной опухоли или гематологического новообразования у человека, в сочетании с использованием терапевтического антитела и также в сочетании с одним или более другими видами противораковой терапии. Соответствующие другие виды противораковой терапии включают, но без ограничения, хирургическую операцию, химиотерапию, лучевую терапию, гормональную терапию и направленную терапию низкомолекулярными соединениями, такими как, например, ингибиторы ангиогенеза. Анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическая композиция, описанные выше в настоящем документе, могут быть предназначены для одновременного или последовательного использования в лечении солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека в сочетании с использованием одного или более других видов противораковой терапии. В частности, анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическая композиция, описанные выше в настоящем документе, могут быть предназначены для использования в лечении солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека после использования одного или более других видов противораковой терапии.

Предпочтительно, настоящее изобретение относится к анти-SIRP α антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, или фармацевтической композиции, описанным выше в настоящем документе, для использования в лечении заболевания, состояния или нарушения, при котором экспрессируется CD47, в сочетании с использованием одного или более дополнительных противораковых терапевтических соединений. Используемый в настоящем документе термин «противораковое терапевтическое соединение» не должен включать терапевтическое антитело. Определение терапевтического антитела приведено выше в настоящем документе. Таким образом, анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическая композиция, описанные выше в настоящем документе, предпочтительно в сочетании с терапевтическим антителом, определение которому дано выше, могут быть предназначены для использования в лечении солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека до, после или одновременно с использованием одного или более других противораковых терапевтических соединений.

Соответствующие противораковые терапевтические соединения включают цитотоксическое средство, то есть, вещество, которое ингибирует или предотвращает функцию клеток и/или вызывает гибель клеток. Термин должен охватывать химиотерапевтические средства, то есть, химические соединения, полезные для лечения рака, радиоактивные терапевтические средства, например, радиоактивные изотопы, гормональные терапевтические средства, направленные терапевтические средства и иммунотерапевтические средства. Соответствующие химиотерапевтические средства включают алкилирующие средства, такие как азотистые иприты, нитрозомочевина, тетразины и азиридины; антиметаболиты, такие как антифолаты, фторпиримидины, аналоги дезоксинуклеозидов и тиопурины; средства, направленные против микротрубочек, такие как алкалоиды барвинка и таксаны; ингибиторы топоизомеразы I и II; а также цитотоксические антибиотики, такие как антрациклины и блеомицины. Например, режим химиотерапии может быть выбран из группы, состоящей из СНОР (циклофосфамид, доксорубин (также называемый гидроксилдаунорубицином), винкристин (также называемый онковином) и преднизон), ICE (идарубин, цитарабин и этопозид), митоксантрона, цитарабина, DVP (даунорубин, винкристин и преднизон), ATRA (полностью транс-ретиноевая кислота), идарубин, режима химиотерапии Холзера, ABVD (блеомицин, декарбазин, доксорубин и винкристин), СЕОР

(циклофосфамид, эпирубицин, винкристин и преднизолон), 2-CdA (2-хлордезоксиаденозин), FLAG и IDA (флударабин, цитарабин, филгастрим и идарубицин) (с использованием, или без использования, последующего лечения G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор) или GM-CSF), VAD (винкристин, доксорубицин и дексаметазон), M и P (мелфалан и преднизон), C (циклофосфамид) еженедельно, ABCM (адриамицин, блеомицин, циклофосфамид и митомицин C), MOPP (мехлорэтамин, винкристин, преднизон и прокарбазин) и DHAP (дексаметазон, цитарабин и цисплатин). Предпочтительным режимом химиотерапии является CHOP.

Соответствующие радиоактивные терапевтические средства включают радиоизотопы, такие как ^{131}I -метайодбензилгуанидин (MIBG), ^{32}P в виде фосфата натрия, хлорид ^{223}Ra , хлорид ^{89}Sr и диаминтетраметилефосфонат ^{153}Sm (EDTMP). Соответствующие средства, используемые в качестве гормональных терапевтических средств, включают ингибиторы синтеза гормонов, например, ингибиторы ароматазы, и аналоги GnRH; а также антагонисты рецепторов гормонов, например, селективные модуляторы рецепторов эстрогенов и антиандрогены. Описанное в настоящем документе направленное терапевтическое средство представляет собой терапевтическое средство, которое служит препятствием для специфических белков, вовлеченных в образование опухолей и пролиферацию клеток, и может представлять собой низкомолекулярное лекарственное средство; либо пептид или пептидное производное. Примеры направленных низкомолекулярных лекарственных средств включают ингибиторы mTOR, такие как эверолимус, темсиролимус и рапамицин; ингибиторы киназы, такие как иматиниб, дазатиниб и нилотиниб; ингибиторы VEGF, такие как сорафениб и регорафениб; и ингибиторы EGFR/HER2, такие как gefитиниб, лапатиниб и эрлотиниб. Примеры пептидов или пептидных производных, являющихся направленными терапевтическими средствами, включают ингибиторы протеасом, такие как бортезомиб и карфилзомиб. Иммунотерапевтические средства включают средства, которые индуцируют, усиливают или подавляют иммунный ответ, такие как цитокины (IL-2 и IFN- α); иммуномодулирующие имидные лекарственные средства, такие как талидомид, леналидомид и помалидомид; терапевтические противораковые вакцины, такие как талимоген лахерпарепвек; клеточные иммунотерапевтические средства, такие как вакцины на основе дендритных клеток, адоптивные T-клетки и модифицированные химерным антигенным рецептором T-клетки); или иммунотоксины, такие как моксетумомаб пасудотокс.

Любые из вышеупомянутых терапевтических методов можно использовать для любого субъекта, который нуждается в такой терапии, включая, например, млекопитающих, предпочтительно приматов, в том числе, например, отличных от людей приматов, и наиболее предпочтительно, людей.

В настоящем документе и в формуле изобретения глагол «включать», и его вариации, используют в неограничивающем смысле для указания на то, что объекты, перечисленные после этого слова, включены, но не указанные конкретно объекты не исключены. Кроме того, ссылка на элемент в единственном числе не исключает возможность того, что присутствует более, чем один элемент, если только из контекста явно не следует, что присутствует один, и только один, из элементов. Таким образом, форма единственного числа термина, как правило, означает «по меньшей мере один».

Все патенты и литературные источники, цитированные в настоящей спецификации, включены посредством ссылки в полном объеме.

Следующие далее примеры приведены исключительно с целью иллюстрации, и никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

Примеры

1. Временная экспрессия антител

а) Получение конструкций кДНК и экспрессионных векторов

Каждая из аминокислотных последовательностей варибельной области тяжелой цепи (HCVR) антител была соединена на N-конце с лидерной последовательностью (SEQ ID NO:28 для антител 1-13), и на C-конце с константным доменом HC LALA человеческого IgG1 в соответствии с SEQ ID NO:25 (*in silico*). Каждая из аминокислотных последовательностей HCVR антител 12C4, 12C4-LALA, 29AM4-5-LALA или KWAR23-LALA была соединена на N-конце с лидерной последовательностью HAVT20 (SEQ ID NO:27) и на C-конце с константным доменом HC LALA человеческого IgG1 в соответствии с SEQ ID NO:25 или HC дикого типа человеческого IgG1 (SEQ ID NO:24). KWAR23 имеет стандартный константный домен тяжелой цепи адалимумаба, но с отсутствием мутации LALA. Тяжелая цепь HEFLB относится к типу IgG4 и была использована с последовательностью SEQ ID NO:42, приведенной в WO 2017/178653.

Полученные аминокислотные последовательности были обратно транслированы в последовательность кДНК, кодон-оптимизированную для экспрессии в человеческих клетках (*Homo sapiens*). Аналогично, последовательность кДНК для конструкции LC (варибельная область легкой цепи; LCVR) была получена путем соединения последовательностей лидерной последовательности (SEQ ID NO:29 для антител 1-13, SEQ ID NO:27 для 12C4, 12C4-LALA, 29AM4-5-LALA, KWAR23, KWAR23-LALA и (гуманизированного) HEFLB) с LCVR антител 1-13, 12C4, 12C4-LALA, 29AM4-5-LALA, KWAR23, KWAR23-LALA и (гуманизированного) HEFLB на N-конце, и на C-конце с константной областью легкой цепи к человеческого антитела (SEQ ID NO:26).

Использовали последовательности HCVR и LCVR в соответствии с Таблицей 1а-с. Анти-SIRP α антитело SE5A5 (мышинное IgG1 κ) было получено от компании Biologend (San Diego, USA; очищенное антитело против CD172a/b человека (анти-SIRP α/β антитело)). Конструкции кДНК и экспрессионные векторы для сравнительных анти-SIRP α антител, приведенных в Таблице 1с, и контролей по изотипу, приведенных в Таблице 1d, были получены аналогичным образом.

В Таблице 1а представлены (i) аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 (SEQ ID NO), которые содержатся в тяжелой цепи и легкой цепи в каждом из гуманизированных анти-SIRP α антител 1-13, и (ii) аминокислотные последовательности каждой из HCVR и LCVR, включающие области CDR гуманизированных анти-SIRP α антител 1-13.

Антитело	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
		SEQ ID NO:				SEQ ID NO:		
1	SEQ ID NO:1	30	31	32	SEQ ID NO:2	33	34	35
2	SEQ ID NO:3	30	31	32	SEQ ID NO:2	33	34	35
3	SEQ ID NO:4	30	31	32	SEQ ID NO:2	33	34	35
4	SEQ ID NO:5	30	31	32	SEQ ID NO:2	33	34	35
5	SEQ ID NO:6	36	37	38	SEQ ID NO:7	39	40	46
6	SEQ ID NO:8	36	44	45	SEQ ID NO:9	39	40	41
7	SEQ ID NO:10	36	37	38	SEQ ID NO:9	39	40	41
8	SEQ ID NO:6	36	37	38	SEQ ID NO:9	39	40	41
9	SEQ ID NO:11	36	37	38	SEQ ID NO:9	39	40	41
10	SEQ ID NO:12	36	42	43	SEQ ID NO:9	39	40	41
11	SEQ ID NO:13	36	37	38	SEQ ID NO:7	39	40	46
12	SEQ ID NO:14	30	31	32	SEQ ID NO:2	33	34	35
13	SEQ ID NO:15	30	31	32	SEQ ID NO:2	33	34	35

В Таблице 1b представлены HC и LC контрольных антител.

Контрольное антитело	HC SEQ ID NO:	LC SEQ ID NO:
12C4 (IgG1)	16	17
29AM4-5-LALA (IgG1)	18	19
12C4-LALA (IgG1)	20	21
KWAR23-LALA (химерное IgG1, LALA)	22	23
KWAR23 (мышинное IgG2a)	47	48
HEFLB (гуманизированное IgG4)*	49	50

*HEFLB представляет собой IgG4 антитело, следовательно, варибельный домен тяжелой цепи связан не с остовом IgG1, а с последовательностью Fc IgG4 (WO 2017/178653).

В Таблице 1c представлены аминокислотные последовательности HC и LC дополнительных сравнительных анти-SIRP α антител. Эти антитела были выбраны из WO2018/190719, WO2018/057669, WO2019/023347, WO2018/107058 и WO01/40307.

Контрольное антитело	HC SEQ ID NO:	LC SEQ ID NO:	Описание
1H9	57	58	1H9 гуманизированное IgG1-каппа, HC-N297A
40A-1	59	60	40AVH2VL4 гуманизированное IgG1-каппа, HC-N297A
40A-2	61	62	40AVH2VL4 гуманизированное IgG2-каппа, HC-A378S
AB3-LALA	63	64	AB3 химерное куриное-человеческое IgG1-каппа, LALA
AB25-LALA	65	66	AB25 гуманизированное IgG1-каппа, LALA
AB115-LALA	67	68	AB115 человеческое IgG1-каппа, LALA
AB119-LALA	69	70	AB119 человеческое IgG1-каппа, LALA
AB136-LALA	71	72	AB136 человеческое IgG1-каппа, LALA
3F9-LALA	73	74	3F9 химерное мышинное-человеческое IgG1-каппа, LALA
7H9-LALA	75	76	7H9 химерное мышинное-человеческое IgG1-каппа, LALA

Все последовательности HC и LC контрольных антител содержат в качестве лидерной последовательности лидерную последовательность HAVT20 с SEQ ID NO:27. Лидерная последовательность экспрессируется и необходима для транспортировки из клетки, во время этого процесса она отделяется.

В Таблице 1d приведен список контрольных по изотипу антител

Контрольное антитело	Описание
iso1-LALA	гуманизированное IgG1-каппа, LALA
iso2	гуманизированное IgG1-каппа, HC-N297A
iso3	гуманизированное IgG2-каппа, HC-A378S
iso4	мышинное IgG2a, дт
iso5	гуманизированное IgG4
iso6	гуманизированное IgG1
iso7*	очищенное мышинное IgG1, к, BioLegend
iso8	гуманизированное IgG4-каппа, HC-S228P, L445P

*iso7 было получено от компании BioLegend (каталожный № 400102).

б) Конструирование вектора и стратегия клонирования

Для экспрессии цепей антитела использовали экспрессионный вектор млекопитающих (pcDNA3.4; ThermoFisher), который содержит экспрессионную кассету CMV: ТКрА. Конечные векторы, содержащие экспрессионную кассету либо HC, либо LC (CMV:HC: ТКрА и CMV:LC: ТКрА, соответственно), переносили и размножали в клетках *E. coli* NEB 5- α . Крупномасштабное производство конечных экспрессионных векторов для трансфекции осуществляли с использованием наборов Maxi- или Megaprep kits (Qiagen).

с) Временная экспрессия в клетках млекопитающих

Коммерчески доступные клетки Expi293F (Thermo Fisher) трансфицировали

экспрессионными векторами с использованием реагента для трансфекции ExpiFectamine в соответствии с инструкциями производителя следующим образом: 75×10^7 клеток высевали в 300 мл среды FortiCHO, 300 мкг экспрессионного вектора объединяли с 800 мкл реагента для трансфекции ExpiFectamine и добавляли к клеткам. Через день после трансфекции к культуре добавляли 1,5 мл энхансера 1 и 15 мл энхансера 2. Через шесть дней после трансфекции супернатант клеточной культуры собирали центрифугированием при 4000 g в течение 15 мин и фильтровали осветленный сбор с использованием ПЭС фильтровальных колб/фильтров MF 75 (Nalgene). Антитела очищали аффинной хроматографией.

2. Связывание и специфичность антител

Экспериментальный раздел

Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР): Анализ аффинности выполняли путем анализа одного цикла кинетики на приборе поверхностного плазмонного резонанса (система BiaCore™ T200, GE Life Sciences) при 25°C.

Биотинилированные антигены SIRP (SEQ ID NO:51-56) были иммобилизованы на поверхности чипа, подходящего для биотинилированных молекул (Sensor Chip CAP, GE Life Sciences) путем инъекции 5 мкг/мл антигена SIRP в подвижном буфере (10 mM HEPES буфер, pH 7,4, с 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,005% об/об раствором полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурата (сурфактант P20)) в течение 60 сек со скоростью 10 мкл/мин после инъекции разведенных 20x (в подвижном буфере) реагентов Biotin CAPture (GE Life Sciences) в течение 60 сек со скоростью 10 мкл/мин. Базовая стабилизация была установлена на 1 мин, после чего проводили инъекцию анти-SIRP антитела в пяти возрастающих концентрациях в подвижном буфере. Для каждого этапа использовали время ассоциации 150 сек, с последующим временем диссоциации 600 сек только после максимальной концентрации, во всех случаях со скоростью потока 30 мкл/мин. Регенерацию выполняли с использованием раствора 6 M гуанидин-HCl, 0,25 M NaOH (120 сек со скоростью потока 30 мкл/мин). На наблюдаемых сенсорграммах было выполнено двойное вычитание пустых проб с использованием проточного канала с иммобилизованным не анти-SIRP (пустая проба) контролем и инъекцией подвижного буфера. Проводили подгонку сенсограмм к модели Ленгмюра 1:1 для всех протестированных анти-SIRP антител. Кинетические параметры (скорость ассоциации $[k_a]$, скорость диссоциации $[k_d]$ и константу связывания, также называемую равновесной константой диссоциации или аффинностью связывания $[K_D]$), рассчитывали с использованием программного обеспечения для оценки BiaCore™ T200 (v3.1).

Анализ методом проточной цитометрии: клетки U937 (линия человеческих моноцитарных клеток), эндогенно экспрессирующие человеческий антиген SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$, и клетки, полученные из не рекомбинантного субклона, которые были подвергнуты скринингу и выделены из клеток яичника китайского хомяка CHO-S (ExpiCHO-S), экспрессирующие каждый из человеческих антигенов SIRP α_1 , SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ или суSIRP α (100000 клеток/лунку в 96-луночном планшете), промывали три раза ледяным буфером для FACS (1x PBS (LONZA), содержащий 0,1% об/масс БСА (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) и 0,02% об/масс NaN₃ (Sigma-Aldrich)), с последующим добавлением каждого из первичных мАт в диапазоне концентраций (50 мкл/лунку), разбавленных в ледяном буфере для FACS. После инкубации в течение 30 мин при 4°C клетки промывали три раза ледяным буфером для FACS и добавляли 50 мкл/лунку вторичных мАт (для человеческих антител AffiniPure F(ab')₂-фрагмент антител козы против человеческих IgG-APC, разведение 1:6000, Jackson Immuno Research, и для мышинных антител AffiniPure

Fab-фрагмент антител козы против мышинных IgG (H+L)-Alexa Fluor 488, разведение 1:1000, Jackson Immuno Research). Через 30 мин при 4°C клетки промывали дважды и ресуспендировали в 150 мкл буфера для FACS. Интенсивность флуоресценции определяли методом проточной цитометрии (BD FACSVersе, Franklin Lakes, NJ) и представляли в виде средней интенсивности флуоресценции (СИФ-средняя) для клеток U937 и средней интенсивности флуоресценции (СИФ-средняя) для клеток ЕхрiCHO-S. Проводили подгонку кривых методом нелинейной регрессии с использованием уравнения сигмоидальной кривой доза-ответ с переменным наклоном (четырёхпараметрической) в GraphPad Prism (версия 7.02 для Windows, GraphPad, San Diego, CA). Значения EC₅₀ рассчитывали в виде концентрации в размерности мкг/мл, которая приводила к ответу на половине расстояния между основанием и верхом кривой, при использовании 4-параметрической подгонки логистической кривой.

Результаты

Анализ ППР: Значения K_D (то есть, константы связывания, также называемой «равновесной константой диссоциации» или «аффинностью связывания») для связывания с человеческим SIRPα₁ (huSIRPα₁), человеческим SIRPα_{БИТ} (huSIRPα_{БИТ}), SIRPα яванского макака (суSIRPα), человеческим SIRPγ (huSIRPγ), человеческим SIRPβ_{1v1} (huSIRPβ_{1v1}) и человеческим SIRPβ_{1v2} (huSIRPβ_{1v2}) антител 1-13 и контрольных антител приведены в Таблице 2. Антитела 1-13 связывают как huSIRPα_{БИТ}, так и huSIRPα₁, и не связывают huSIRPγ. Некоторые из антител 1-13, например, антитело 6, иногда демонстрирует слабое связывание с SIRPγ, но с очень низким значением единиц ответа (ЕО), что, по-видимому, не имеет значения, как показано в экспериментах по связыванию клеток в приведенных ниже примерах. Гуманизированное HEFLB узнает только вариант huSIRPα_{БИТ}, но не huSIRPα₁ и huSIRPγ, и суSIRPα. Антитела KWAR23, 29AM4-5, SE5A5 и 12C4 связывают все варианты SIRP, включая huSIRPγ.

Таблица 2. Аффинность связывания (K_D, M) анти-SIRPα антител с человеческим SIRPα₁, человеческим SIRPα_{БИТ}, человеческим SIRPγ, человеческим SIRPβ_{1v1}, человеческим SIRPβ_{1v2} и SIRPα яванского макака, измеренная методом ППР

Антитело	huSIRPα ₁	huSIRPα _{БИТ}	суSIRPα	huSIRPγ	huSIRPβ _{1v2}	huSIRPβ _{1v1}
12C4	9,72E-11	<1,0E-11	<1,0E-11	<1,0E-11	<1,0E-11	1,01E-10
29AM4-5-LALA	2,29E-11	<1,0E-11	2,21E-11	4,45E-10	8,54E-11	6,01E-11
12C4-LALA	1,01E-10	<1,0E-11	<1,0E-11	<1,0E-11	<1,0E-11	1,13E-10
KWAR23-LALA	1,25E-11	<1,0E-11	<1,0E-11	<1,0E-11	<1,0E-11	3,20E-11
KWAR23	1,44E-11	<1,0E-11	<1,0E-11	<1,0E-11	<1,0E-11	3,56E-11
HEFLB	н/о	1,28E-11	н/о	1,74E-08#	2,16E-10	1,61E-10
SE5A5	1,54E-11	7,98E-10	1,80E-09	2,66E-09	2,87E-10	3,82E-11
1	1,49E-09	<1,0E-11	1,87E-09	н/о	2,42E-09	н/о
2	1,34E-09	<1,0E-11	2,27E-09	н/о	2,54E-09	н/о
3	9,08E-10	<1,0E-11	1,66E-09	н/о	1,92E-09	н/о
4	1,38E-09	<1,0E-11	1,94E-09	н/о	2,34E-09	н/о
5	<1,0E-11	1,42E-10	7,62E-08#	н/о	2,97E-09	5,93E-10
6	<1,0E-11	<1,0E-11	4,56E-09	н/о	2,01E-09	7,43E-11
7	1,71E-11	3,78E-10	н/о	н/о	н/о	1,65E-09
8	<1,0E-11	1,52E-10	1,88E-09#	н/о	1,84E-09	6,61E-10
9	1,91E-11	3,65E-10	н/о	н/о	н/о	1,44E-09
10	6,72E-10	5,10E-09#	н/о	н/о	н/о	1,29E-08
11	3,49E-11	2,12E-10	н/о	н/о	н/о	2,01E-09
12	1,38E-09	<1,0E-11	1,53E-09	н/о	1,94E-09	н/о

13	1,41E-09	<1,0E-11	2,05E-09	н/о	2,78E-09	н/о
----	----------	----------	----------	-----	----------	-----

Значения K_D для huSIRP α_1 и huSIRP $\alpha_{ВГТ}$ получали с использованием серии концентраций 1,56-6,25-25-100-400 нг/мл. Значения K_D для cySIRP α , huSIRP γ , huSIRP β_{1v1} и huSIRP β_{1v2} получали с использованием серии концентраций 6,25-25-100-400-1600 нг/мл. н/о: нет ответа или ниже порога отсечения 10 единиц ответа (ЕО) для рассчитанного R_{max} . Когда значение <1,0E-11 М приведено в виде значения K_D , для образца невозможно было провести точное определение, поскольку аффинность находится за пределами диапазона технических характеристик прибора или рассчитанное значение K_D составляло примерно 1,0E-11 М, но наблюдалось поверхностное насыщение. Значение K_D <1,0E-11 М означает высокую аффинность. # означает, что имела место неоптимальная подгонка к модели Ленгмюра 1:1.

Анализ методом проточной цитометрии: Связывание различных антител с huSIRP α_1 , huSIRP $\alpha_{ВГТ}$ и/или cySIRP α , экспрессируемые на клетках, определяли методом проточной цитометрии. Связывание представлено в виде значений EC₅₀, то есть, концентрации антител в размерности мкг/мл, которая приводит к ответу на половине расстояния между основанием и верхом кривой, приведенных в Таблице 3. Антитела 1-13 связывают huSIRP $\alpha_{ВГТ}$ (либо временно экспрессируемый в клетках ExpiCHO-S, либо эндогенно экспрессируемый в клетках U937) и huSIRP α_1 . Антитела 1-4, 6, 12, 13 связывают cySIRP α в низком диапазоне концентраций (мкг/мл). Эти антитела также связываются, с тем же диапазоном значений EC₅₀ (низкие значения мкг/мл), с клетками U937, эндогенно экспрессирующими huSIRP $\alpha_{ВГТ}$. Контрольные антитела KWAR23, KWAR23huIgG1LALA, 12C4huIgG1LALA, 12ChuIgG1, 29AM4-5huIgG1LALA и HEFLB демонстрируют аналогичное связывание с huSIRP $\alpha_{ВГТ}$, экспрессируемым на клетках U937. HEFLB не связывает huSIRP α_1 и cySIRP α .

Таблица 3. Клеточный анализ связывания анти-SIRP α антител с клетками U937, эндогенно экспрессирующими человеческий SIRP $\alpha_{ВГТ}$, и с клетками ExpiCHO-S, временно трансфицированными либо человеческим SIRP α_1 , человеческим SIRP $\alpha_{ВГТ}$, либо SIRP α яванского макака

Антитело	Клетки U937 (huSIRP $\alpha_{ВГТ}$) EC ₅₀ (мкг/мл)	ExpiCHO-S (huSIRP α_1) EC ₅₀ (мкг/мл)	ExpiCHO-S (huSIRP $\alpha_{ВГТ}$) EC ₅₀ (мкг/мл)	ExpiCHO-S (cySIRP α) EC ₅₀ (мкг/мл)
1	0,09	0,28	0,30	0,12
2	0,10	0,32	0,31	0,12
3	0,12	0,40	0,28	0,15
4	0,10	0,38	0,36	0,14
5	1,60	0,22	0,12	1,91
6	0,14	0,24	0,18	0,13
7	3,55	0,20	0,20	5,35
8	1,04	0,17	0,14	2,44
9	2,78	0,19	0,11	>10
10	7,11	0,10	0,30	>10
11	3,73	0,11	0,08	6,30
12	0,08	0,27	0,26	0,23
13	0,08	0,27	0,28	0,11
12C4	0,07	0,12	0,36	0,16
29AM4-5-LALA	0,17	0,09	0,12	0,13
12C4-LALA	0,04	0,11	0,17	0,22

KWAR23-LALA	0,07	0,19	0,19	0,27
KWAR23	0,14	0,08	0,10	0,08
HEFLB	0,25	>30	0,15	>30
SE5A5	1,48	0,09	0,62	0,05

3. Связывание человеческого SIRP γ - FACS-окрашивание T-клеток

Экспериментальный раздел

Анализ методом проточной цитометрии: Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из свежей крови здоровых людей с использованием градиента перколла. Клетки промывали в HEPES+ буфере (132 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 10 1 mM MgSO₄, 1,2 mM фосфат калия, 20 mM HEPES, 5,5 mM глюкоза и 0,5% (масс/об) человеческий сывороточный альбумин, pH 7,4) и ресуспендировали в концентрации 1×10⁶/мл в буфере для FACS (буфер PBS+человеческий альбумин 1% масс/об, человеческий альбумин 200 г/мл, Sanquin Plasma Products B.V., Amsterdam, Netherlands), осаждали центрифугированием и ресуспендировали в PBS+20% нормальной козьей сыворотки (NGS). Затем клетки (200000 клеток/лунку в 96-луночной планшете) 15 инкубировали в присутствии тестируемых антител или в контрольных условиях только со вторичными антителами (вторичные антитела козы против человеческого IgG, Alexa 633, F(ab')₂-фрагмент, разведение 1:1000, Jackson Immuno Research, и вторичные антитела козы против мышинных IgG, Alexa 633, F(ab')₂-фрагмент, разведение 1:250, Invitrogen) в 20 течение 30 мин на льду. После этого клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в смеси антитела против человеческого CD3, FITC (разведение 1:100, Invitrogen), с соответствующим вторичным антителом (либо против человеческого, либо против мышинных антител) и инкубировали в течение 30 мин в темноте на льду. Затем 25 клетки промывали буфером для FACS, ресуспендировали в 150 мкл буфера для FACS, определяли интенсивность флуоресценции методом проточной цитометрии (LSRII HTS или LSRFortessa, BD Biosciences, CA, USA) и представляли в виде средней интенсивности флуоресценции (СИФ-средняя) и процентной доли положительных клеток.

Результаты

30 Связывание антител с SIRP γ -экспрессирующими CD3⁺ T-клетками показано на Фигуре 1 (средняя интенсивность флуоресценции (Фигура 1a); процентная доля положительных клеток (Фигура 1b)). Все контрольные антитела, за исключением гуманизированного HEFLB, связывали SIRP γ . Антитела 1-13 не связывали человеческие 35 CD3⁺ T-клетки, это подтверждало отсутствие связывания SIRP γ в клеточном окружении.

4. Определение характеристик сравнительных анти-SIRP α антител

Экспериментальный раздел

Анализ методом проточной цитометрии: клетки U937 (линия человеческих моноцитарных клеток), эндогенно экспрессирующие человеческий антиген SIRP α _{ВIT}, 40 и клетки, полученные из не рекомбинантного субклона, которые были подвергнуты скринингу и выделены из клеток яичника китайского хомяка CHO-S (Exp1CHO-S), временно экспрессирующие человеческий антиген SIRP α ₁ или SIRP α _{ВIT} (100000 клеток/лунку в 96-луночной планшете), промывали дважды ледяным буфером для FACS (1x PBS (LONZA), содержащий 0,1% об/масс БСА (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) и 0,02% об/масс NaN₃ (Sigma-Aldrich)), с последующим добавлением каждого из первичных мАт в 45 диапазоне концентраций (50 мкл/лунку), разбавленных в ледяном буфере для FACS. После инкубации в течение 30 мин при 4°C клетки промывали дважды ледяным буфером для FACS. Затем добавляли 50 мкл/лунку вторичного мАт (AffiniPure™ F(ab')₂-фрагмент

антитела козы против человеческих IgG-APC, разведение 1:6000, Jackson Immuno Research). Через 30 мин при 4°C клетки промывали дважды и ресуспендировали в 150 мкл буфера для FACS. Интенсивность флуоресценции определяли методом проточной цитометрии с использованием FACSVerse (BD Biosciences) и представляли в виде средней интенсивности флуоресценции (СИФ-средняя) для клеток U937 и средней интенсивности флуоресценции (СИФ-средняя) для клеток Epr1CHO-S. Проводили подгонку кривых методом нелинейной регрессии с переменным наклоном (четырёхпараметрической) в GraphPad Prism (версия 7.02 для Windows, GraphPad, San Diego, CA). Значения EC₅₀ рассчитывали в виде концентрации в размерности мкг/мл, которая приводила к ответу на половине расстояния между основанием и верхом кривой, при использовании 4-параметрической подгонки логистической кривой.

Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР): Анализ аффинности выполняли путем анализа одного цикла кинетики на приборе BiaCore™ T200 (GE life Sciences) при 25°C. AVI-маркированные биотинилированные антигены SIRP были иммобилизованы с использованием набора Biotin CAPture (GE life Sciences). Покрытую стрептавидином поверхность готовили путем инъекции реагента Biotin CAPture. Затем биотинилированные варианты SIRP вводили инъекцией в подвижном буфере (10 mM HEPES буфер, pH 7,4, с 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,005% об/об раствором сурфактанта P20) до уровня захвата примерно 40-50 единиц ответа (ЕО). После 1-мин стабилизации базовой линии вводили инъекцией анти-SIRP α антитела в пяти возрастающих концентрациях, с временем ассоциации 150 сек. Диссоциацию наблюдали в течение 600 сек, в обоих случаях скорость потока составляла 30 мкл/мин. Диапазон концентраций был выбран вокруг ожидаемого значения K_D. Регенерацию проводили в соответствии с протоколом производителя раствором 6 M гуанидин-HCl, 0,25 M NaOH. На наблюдаемых сенсорограммах было выполнено двойное вычитание пустых проб с использованием (связанного реагента Biotin CAPture) контрольного проточного канала и инъекции подвижного буфера. Проводили подгонку сенсограмм к модели Ленгмюра 1:1 для всех протестированных анти-SIRP антител. Кинетические параметры (k_a, k_d и K_D) рассчитывали с использованием программного обеспечения для оценки BiaCore™ T200 (v3.1). huSIRP β _{1v1} и huSIRP β _{1v2} тестировали в их мономерной форме. Расчетные значения K_D находились в диапазоне тестируемых концентраций. Когда значение <1,0E-11 приведено в виде значения K_D, аффинность невозможно было точно определить, поскольку кинетические параметры находились за пределами технических характеристик приборов.

Результаты

Анализ методом проточной цитометрии: Сравнение связывания антител против SIRP α с huSIRP α ₁ и huSIRP α _{BIT}, экспрессируемыми на клетках, проводили методом проточной цитометрии. Связывание представлено в виде значений EC₅₀ в Таблице 4. Все протестированные в данном эксперименте антитела связывали huSIRP α _{BIT} (либо временно экспрессируемый в клетках Epr1CHO-S, либо эндогенно экспрессируемый в клетках U937) и huSIRP α ₁. При том, что большинство антител демонстрировали значение EC₅₀ в низком диапазоне концентраций (мкг/мл), AB115-LALA, 3F9-LALA и 7H9-LALA демонстрировали значение EC₅₀, превышающее 1 мкг/мл, при связывании с клетками U937. Кроме того, 3F9-LALA связывает huSIRP α ₁ и huSIRP α _{BIT}, экспрессируемые на клетках Epr1CHO-S, с величиной EC₅₀, превышающей 1 мкг/мл. Следует отметить, что

соответствующие контроли по изотипу не связывались ни с одними из этих клеток.

Таблица 4. Клеточный анализ связывания анти-SIRP α антител с клетками U937, эндогенно экспрессирующими человеческий SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$, и с клетками Epc1CHO-S, временно трансфицированными либо человеческим SIRP α_1 , либо человеческим SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$.

Антитело	Клетки U937 (huSIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$) EC ₅₀ (мкг/мл)	Epc1CHO-S (huSIRP α_1) EC ₅₀ (мкг/мл)	Epc1CHO-S (huSIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$) EC ₅₀ (мкг/мл)
6	0,09	0,06	0,01
KWAR23-LALA	0,07	0,14	0,16
1H9	0,05	0,04	0,08
40A-1	0,23	0,09	0,16
40A-2	0,24	0,14	0,12
AB3-LALA	0,06	0,09	0,13
AB25-LALA	0,08	0,18	0,10
AB115-LALA	1,43	0,37	0,48
AB119-LALA	0,04	0,10	0,07
AB136-LALA	0,39	0,12	0,18
3F9-LALA	3,24	1,49	1,88
7H9-LALA	1,08	0,49	0,52

Анализ ППР: Сравнение избирательности анти-SIRP α антител в отношении вариантов человеческого SIRP β , $\beta_{1\text{V}1}$ и $\beta_{1\text{V}2}$, проводили методом ППР, и результаты приведены в Таблице 5. За исключением 3F9-LALA, все антитела узнавали huSIRP $\beta_{1\text{V}1}$. Все протестированные антитела связывают huSIRP $\beta_{1\text{V}2}$, где антитело 6 имеет самое высокое значение K_D и, следовательно, самую низкую аффинность. Следует отметить, что соответствующие контроли по изотипу не связывают huSIRP $\beta_{1\text{V}1}$ и huSIRP $\beta_{1\text{V}2}$.

Таблица 5. Аффинность связывания (K_D , M) анти-SIRP α антител с человеческим SIRP $\beta_{1\text{V}1}$ и человеческим SIRP $\beta_{1\text{V}2}$, измеренная методом ППР.

Антитело	huSIRP $\beta_{1\text{V}1}$	huSIRP $\beta_{1\text{V}2}$
6	1,48E-10	3,20E-09
KWAR23-LALA	1,83E-11	2,52E-11
1H9	2,08E-11	2,40E-11
40A-1	7,15E-09	7,44E-11
40A-2	9,70E-09	1,88E-10
AB3-LALA	2,12E-11	<1E-11
AB25-LALA	<1E-11	<1E-11
AB115-LALA	<1E-11	<1E-11
AB119-LALA	<1E-11	1,28E-11
AB136-LALA	1,71E-10	2,02E-10
3F9-LALA	нет связывания	3,80E-10
7H9-LALA	3,36E-10	3,99E-10
KWAR23	1,47E-11	2,74E-11
12C4	1,06E-10	4,90E-11
29AM4-5-LALA	1,05E-10	1,53E-10
12C4-LALA	1,11E-10	5,11E-11
HEFLB	2,20E-10	3,46E-10
SE5A5	6,31E-11	3,58E-10

5. Связывание анти-SIRP α антител с первичными клетками: гранулоцитами, моноцитами и Т-клетками

Экспериментальный раздел

Анализ методом проточной цитометрии, окрашивание цельной крови: Обработанные

гепарином образцы цельной крови получали от здоровых доноров (банк крови Sanquin, Nijmegen, the Netherlands) и хранили в течение ночи при комнатной температуре. Образцы цельной крови лизировали 1X лизирующим раствором BD FACS™ (349202, BD Biosciences)) в течение 15 мин при комнатной температуре и промывали буфером для

5 FACS (PBS, содержащий 0,1% БСА и 2 мМ ЭДТА). $1,5 \times 10^5$ клеток на лунку окрашивали при помощи 50 мкл на лунку анти-SIRP α антител (в диапазоне концентраций, начиная с 10 мкг/мл или 90 мкг/мл с 3,16x разведением) в 96-луночных планшетах для микротитрования (353910, Falcon) в течение 30 мин при 4°C. После промывания буфером
10 для FACS клетки инкубировали с коктейлем из разведенного 1:800 клона UCHL1 антитела против человеческого CD3-PB (558117, BD Biosciences), разведенного 1:800 клона M ϕ P9 антитела против человеческого CD14-FITC (345784, BD Biosciences) и разведенного 1:6000 APC-меченого F(ab')₂ вторичного антитела козы против человеческих IgG (109-136-098, Jackson ImmunoResearch) в буфере для FACS в течение
15 30 мин при 4°C. После промывания буфером для FACS клетки смешивали на вихревой мешалке во избежание агрегации клеток, инкубировали с 50 мкл на лунку фиксирующего буфера BD Cytotfix™ (4,2% ПФА) (554655, BD Biosciences) в течение 15 мин при комнатной температуре и промывали перед анализом. Образцы собирали при помощи FACSVerse (BD Biosciences) и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (BD Biosciences). Гранулоциты были гейтированы на основании FSC-A/SSC-A, с
20 последующим гейтированием по CD14⁻. Т-клетки и моноциты сначала были гейтированы на основании FSC-A/SSC-A. Затем Т-клетки были идентифицированы как CD3⁺CD14⁻ клетки, и моноциты как CD14⁺CD3⁻ клетки.

25 Анализ методом проточной цитометрии, связывание с выделенными Т-клетками: Т-клетки выделяли методом отрицательной селекции (11344D Dynabeads Untouched Human T Cell Kit, ThermoFisher Scientific) из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) здоровых людей (банк крови Sanquin, Nijmegen, the Netherlands). Клетки промывали в HEPES+ буфере (132 мМ NaCl, 6 мМ KCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgSO₄, 1,2
30 мМ фосфат калия, 20 мМ HEPES, 5,5 мМ глюкоза и 0,5% (масс/об) человеческий сывороточный альбумин, pH 7,4) и ресуспендировали в концентрации 1×10^6 /мл в буфере для выделения (буфер PBS+1% масс/об человеческий альбумин, человеческий альбуман 200 г/мл, Sanquin Plasma Products B.V., Amsterdam, Netherlands), осаждали центрифугированием и ресуспендировали в буфере для FACS (1x PBS (LONZA),
35 содержащий 0,1% об/масс БСА (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) и 0,02% об/масс NaN₃ (Sigma-Aldrich)). Клетки (100000 клеток/лунку в 96-луночном планшете) промывали ледяным буфером для FACS, с последующим добавлением каждого из первичных mAb в диапазоне концентраций (50 мкл/лунку), разведенного в ледяном буфере для FACS. После инкубации в течение 30 мин при 4°C клетки промывали два раза ледяным буфером
40 для FACS; затем добавляли 50 мкл/лунку вторичного антитела (для человеческих антител AffiniPure F(ab')₂-фрагмент антител козы против человеческих IgG-APC, разведение 1:6000, Jackson Immuno Research, и для мышиных антител AffiniPure Fab-фрагмент антител козы против мышиных IgG (H+L)-Alexa Fluor 488, разведение 1:1000, Jackson Immuno Research). Через 30 мин при 4°C клетки промывали дважды и ресуспендировали в 150
45 мкл буфера для FACS. Интенсивность флуоресценции определяли методом проточной цитометрии с использованием FACSVerse (BD Biosciences) и представляли в виде средней интенсивности флуоресценции (СИФ-средняя). Проводили подгонку кривых методом нелинейной регрессии с переменным наклоном (четырёхпараметрической) в GraphPad

Prism (версия 7.02 для Windows, GraphPad, San Diego, CA). Значения EC_{50} рассчитывали в виде концентрации в размерности мкг/мл, которая приводила к ответу на половине расстояния между основанием и верхом кривой, при использовании 4-параметрической подгонки логистической кривой.

5 Результаты

Анализ методом проточной цитометрии, окрашивание цельной крови: Связывание различных анти-SIRP α антител с первичными клетками определяли методом проточной цитометрии. Кривые доза-ответ для клеток репрезентативного здорового гетерозиготного SIRP α_1 /SIRP α_{BIT} донора представлены на Фигуре 10a-d. Следует отметить, что точная высота ответа не обязательно является характеристикой анти-SIRP α антитела, поскольку она также может зависеть от вторичного антитела. Напротив, значения EC_{50} не зависят от обнаруживающего антитела, следовательно, их можно сравнивать. Сводная информация по значениям EC_{50} приведена в Таблице 6. Все антитела связывают гранулоциты и моноциты гетерозиготных SIRP α_{BIT} /SIRP α_1 доноров, хотя точные значения EC_{50} варьируются. За исключением HEFLB, все антитела также связывают гранулоциты и CD14⁺ моноциты гомозиготного SIRP α_1 донора с варьирующими значениями EC_{50} . Эти данные согласуются с данными ППП и клеточного анализа, приведенными в Таблицах 2 и 3, где HEFLB также не связывает SIRP α_1 .

Циркулирующие CD3⁺ Т-клетки в человеческой крови не экспрессируют SIRP α или SIRP β , экспрессируют только SIRP γ и, следовательно, связывание CD3⁺ Т-клеток можно интерпретировать как связывание SIRP γ . При том, что большинство антител связывают CD3⁺ Т-клетки, антитело 6, AB3-LALA, 3F9-LALA, 7H9-LALA и HEFLB не связывают CD3⁺ Т-клетки. В этом анализе окрашивания цельной крови AB136-LALA связывает Т-клетки при более высоких концентрациях антитела. Это, очевидно, согласуется с приведенными в WO2018/057669 данными о том, что Ab136 связывает SIRP γ , но с низким значением K_D .

Таблица 6. Клеточный анализ связывания анти-SIRP α антител с гранулоцитами, CD14⁺ моноцитами и CD3⁺ Т-клетками в цельной крови здоровых гетерозиготных SIRP α_1 /SIRP α_{BIT} доноров (α_1/α_{BIT}) или гомозиготного SIRP α_1 /SIRP α_1 донора (α_1/α_1).

	Гранулоциты			CD14+ Моноциты			CD3+ Т-клетки (человеческие ат)		
	EC_{50} (мкг/мл)			EC_{50} (мкг/мл)			EC_{50} (мкг/мл)		
	Донор #1	Донор #2	Донор #3	Донор #1	Донор #2	Донор #3	Донор #1	Донор #2	Донор #3
Антитело	α_1/α_{BIT}	α_1/α_{BIT}	α_1/α_1	α_1/α_{BIT}	α_1/α_{BIT}	α_1/α_1	α_1/α_{BIT}	α_1/α_{BIT}	α_1/α_1
6	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	>10	>10	>10
KWAR23-LALA	0,03	0,04	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,003
1H9	0,02	0,04	0,01	0,01	0,03	0,01	*	*	*
40A-1	0,07	0,06	0,02	0,05	0,05	0,03	0,03	0,03	0,02
AB3-LALA	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	>10	>10	>10
AB25-LALA	0,02	0,06	0,03	0,02	0,06	0,03	#	0,06	0,03
AB115-LALA	0,73	0,35	0,18	0,61	0,36	0,21	0,15	0,09	0,10
AB119-LALA	0,01	0,01	0,005	0,01	0,01	0,003	0,01	0,01	0,005
AB136-LALA	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3F9-LALA	0,83	0,51	~0,12^	0,48	0,51	~0,11	>10	>10	>10
7H9-LALA	0,10	0,08	0,04	0,10	0,09	0,04	>10	>10	>10
29AM4-5-LALA	0,03	0,05	0,04	0,02	0,03	0,02	0,07	0,32	0,12

12C4-LALA	0,02	0,03	0,10	0,01	0,02	0,19	*	*	*
HEFLB	0,02	0,17	>10	0,02	0,15	>10	>10	>10	>10

>10=EC₅₀ >10 мкг/мл

= исключено, приводило к аномальному профилю связывания

^ = наблюдалась кривая зависимости ответа от дозы; однако значения ниже, чем у контроля по изотипу

* = неполная кривая (насыщение не достигнуто)

~ = неоднозначная подгонка

Анализ методом проточной цитометрии, связывание с выделенными Т-клетками:

Для подтверждения SIRP γ -зависимого связывания Т-клеток разными антителами с использованием другого подхода выделенные первичные Т-клетки (в отсутствие SIRP α -или SIRP β -положительных миелоидных клеток) окрашивали панелью антител.

Результаты представлены на Фигуре 11. При том, что большинство антител связывают Т-клетки, антитела 6, AB3-LALA, 3F9-LALA, 7H9-LALA, SE5A5 и HEFLB не связывают Т-клетки. Опять-таки, AB136-LALA демонстрирует связывание при высоких концентрациях антитела.

Таким образом, описанные выше примеры показывают, что аффинность антитела 6 для huSIRP β _{1v2} ниже, чем аффинность любого из сравнительных протестированных анти-SIRP α антител в обширной панели, указанной выше. Кроме того, аффинность не связывающего Т-клетки антитела 6 для SIRP β _{1v1} была сопоставима с аффинностью AB136-LALA, 7H9-LALA и HEFLB, которые также имеют низкую/не имеют аффинность для SIRP γ , и была ниже, чем аффинность у AB3 и SE5A5, которые также имеют низкую/не имеют аффинность для SIRP γ .

В совокупности результаты показывают, что антитело 6 обладает высокой способностью связывания с обоими аллелями SIRP α , в то же время демонстрируя очень низкое связывание, или отсутствие такового, с другими не ингибирующими представителями семейства SIRP: SIRP β _{1v1}, SIRP β _{1v2} и SIRP γ .

6. Способность к блокированию CD47

Экспериментальный раздел

Способность к блокированию CD47: Для оценки способности анти-SIRP α антител блокировать связывание либо SIRP α ₁, либо SIRP α _{В1Т}, с CD47, SIRP α ₁ или SIRP α _{В1Т} преинкубировали с анти-SIRP α антителом, а затем тестировали диссоциацию от иммобилизованного CD47. Вкратце, AVI-маркированный биотинилированный CD47-Fc был иммобилизован с использованием набора Biotin CAPture (GE life Sciences). Покрытую стрептавидином поверхность готовили путем инъекции реагента Biotin CAPture. Затем биотинилированный CD47-Fc вводили инъекцией в подвижном буфере (10 mM HEPES буфер, pH 7,4, с 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,005% об/об сурфактантом P20) до уровня захвата примерно 1000 ЕО. Смесь, содержащую пятикратный молярный избыток антитела и либо 10 мкг/мл SIRP α ₁, либо 10 мкг/мл SIRP α _{В1Т}, преинкубировали в течение 30 мин при температуре окружающей среды и вводили инъекцией над поверхностью с CD47-Fc в течение 120 сек со скоростью 5 мкл/мин. Диссоциацию наблюдали в течение 300 сек, затем проводили регенерацию с использованием смеси 6 М гуанидин-HCl, 0,25 М NaOH (3:1) в соответствии с инструкциями производителя. Определение блокирующего/не блокирующего антитела выполняли путем визуальной оценки после вычитания двойного контрольного значения.

Результаты

Способность к блокированию CD47: Способность направленных на SIRP α антител

блокировать связывание CD47 изучали методом ППП (Таблица 7). При том, что большинство антител, включая антитело 6, блокируют взаимодействие CD47-SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ и CD47-SIRP α_1 , AB3-LALA, AB136-LALA, 3F9-LALA и 7H9-LALA не блокируют взаимодействие CD47-SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ и CD47-SIRP α_1 , и, следовательно, являются не блокирующими. Кроме того, HEFLB блокирует только взаимодействие CD47-SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$, но не взаимодействие CD47-SIRP α_1 , что согласуется с отсутствием узнавания SIRP α_1 антителом HEFLB.

Таблица 7. Определение блокирования анти-SIRP α антителами взаимодействий CD47-SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ и CD47-SIRP α_1 .

Антитело	huSIRP α_1	huSIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$
6	да	да
KWAR23-LALA	да	да
1H9	да	да
40A-1	да	да
40A-2	да	да
AB3-LALA	нет	нет
AB25-LALA	да	да
AB115-LALA	да	да
AB119-LALA	да	да
AB136-LALA	нет	нет
3F9-LALA	нет	нет
7H9-LALA	нет	нет
KWAR23	да	да
12C4	да	да
29AM4-5-LALA	да	да
12C4-LALA	да	да
HEFLB	нет	да
SE5A5	да	да

7. Способность к блокированию рекрутинга SHP-1

Экспериментальный раздел

Сигнализацию SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ анализировали с использованием технологии комплементации ферментных фрагментов PathHunter от DiscoverX[®]. В данном анализе дефицитные по CD47 клетки Jurkat генетически модифицировали для избыточной экспрессии SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ ⁺, маркированного ProLink (PK), и ферментного акцептора (EA), слитого с доменом SH2 сигнального белка SHP-1. Когда эти клетки Jurkat с сигнализацией SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ инкубируют с клетками, экспрессирующими CD47 (клетки с лигандом CD47), SHP-1 и SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ взаимодействуют, что приводит к комплементации PK и EA. В результате образуется активный фермент β -галактозидаза, который может расщеплять субстрат, с генерированием хемилюминесцентного сигнала. Данную систему можно использовать для изучения способности направленных на SIRP α антител препятствовать рекрутингу SHP-1 к SIRP α . Клетки Jurkat с сигнализацией SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ инкубировали с анти-SIRP α антителом в диапазоне концентраций в сочетании с клетками с лигандом CD47. Клетки Jurkat Е6.1 использовали в качестве клеток с лигандом CD47, и анализ проводили в формате 384-луночного планшета. Сначала в каждую лунку добавляли 12,5 мкл суспензии клеток Jurkat с сигнализацией SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ (0,8 миллионов клеток/мл), с последующим добавлением 2,5 мкл (11x концентрированного) раствора анти-SIRP α

антитела в диапазоне концентраций. Анализ начинали путем добавления 12,5 мкл суспензии клеток с лигандом CD47 при EC₈₀ (1,6 миллионов клеток Jurkat E6.1/мл). Планшеты инкубировали в течение 4 часов в условиях 37°C и 5% CO₂. После инкубации добавляли 2 мкл 2х разбавленных реагентов А (DiscoverX detection kit, в PBS, содержащем 0,1% БСА). Планшеты инкубировали 30 мин на шейкере (300 об/мин) в темноте при комнатной температуре. Затем добавляли 10 мкл 2х разбавленных реагентов В (DiscoverX detection kit, в PBS, содержащем 0,1% БСА). Планшеты инкубировали в течение 1 часа на шейкере (300 об/мин) в темноте при комнатной температуре. Люминесценцию измеряли со временем интеграции 0,1 сек/лунку с использованием системы Envision[®] (Perkin Elmer). Все клеточные суспензии готовили в среде для высевания клеток (DiscoverX), антитела разводили в PBS, содержащем 0,1% БСА (Sigma). Графики анализировали с использованием программы GraphPad Prism 8. % максимального сигнала определяли следующим образом: (относительные единицы люминесценции (ОЕЛ)/ОЕЛ при максимальной стимуляции (без антитела) * 100). Уровни эффективности рассчитывали следующим образом: 100% - «% максимального сигнала» соединения в концентрации 3,3 мкг/мл.

Результаты

Активация SIRPα приводит к хорошо охарактеризованному ингибирующему сигнальному каскаду. После связывания CD47 иммунорецепторные тирозиновые ингибирующие мотивы (ITIM) цитоплазматического домена SIRPα становятся фосфорилированными, что приводит к рекрутингу и активации Src-гомологичный домен 2-содержащей фосфатазы-1 (SHP-1). SHP-1 опосредует ингибирующую сигнализацию за счет белкового дефосфорилирования определенных субстратов, включая активирующие FcγR. Это ведет к затуханию иммунного ответа. Способность направленных на SIRPα антител к ингибированию SIRPα-опосредуемой сигнализации исследовали с использованием дефицитных по CD47 клеток Jurkat с сигнализацией SIRPα_{ВГТ}. При инкубации этих клеток с CD47-содержащими клетками Jurkat E6.1 рекрутинг SHP-1 к SIRPα_{ВГТ} приводит к генерации хемилюминесцентного сигнала.

Антитело 6 способно противодействовать данному сигналу зависимым от дозы образом (Фигура 12a). Другие направленные на SIRPα антитела были протестированы в фиксированной дозе (3,3 мкг/мл) на их способность противодействовать сигнализации SIRPα_{ВГТ} (Фигура 12b). За исключением SE5A5, эффективность ингибирования сигнализации SIRPα_{ВГТ} является аналогичной у всех блокирующих CD47-SIRPα антител (показано белыми столбиками). Не блокирующие антитела AB3-LALA, AB136-LALA, 3F9-LALA и 7H9-LALA (показаны черными столбиками) демонстрируют более низкую эффективность, или отсутствие эффективности, ингибирования сигнала в сравнении с блокирующими антителами, и, следовательно, по всей видимости являются менее способными, или неспособными, противодействовать опосредованной SIRPα сигнализации.

В совокупности результаты показывают, что антитело 6 блокирует связывание CD47 с обоими аллелями SIRPα и, в отличие от не блокирующих антител, это приводит к высокой степени ингибирования последующей сигнализации.

8. Антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC)

Экспериментальный раздел

Анализ цитотоксичности DELFIA[®] (не радиоактивный анализ): Нейтрофилы доноров, гетерозиготных по SIRPα₁ и SIRPα_{ВГТ}, выделяли и культивировали методом, описанным

в публикации Zhao *et al. PNAS* 2011, 108(45), 18342-18347. Свежевыделенные нейтрофилы культивировали в течение ночи с человеческим G-CSF (10 нг/мл) и IFN γ (50 нг/мл). Антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) определяли с использованием анализа цитотоксичности с не радиоактивным европием-ТДА (EuTDA) (DELFLIA[®],
 5 PerkinElmer). Клетки SKBR3 (человеческая линия клеток HER2-положительного рака молочной железы) использовали в качестве клеток-мишеней и метили бис(ацетоксиметил) 2,2':6',2"-терпиридин-6,6"-дикарбоксилатом (реагент BATDA, DELFLIA) в течение 5 мин при 37°C. После 2 промываний PBS 5 \times 10³ клеток-мишеней на лунку инкубировали в
 10 культуральной среде IMDM с добавлением 10% (об/об) эмбриональной бычьей сыворотки с ультранизким содержанием IgG (FBS, Gibco) в течение 4 часов в условиях 37°C и 5% CO₂ в 96-луночном планшете с U-образным дном совместно с нейтрофилами при соотношении эффекторных клеток и мишеней, составляющем 50:1, в присутствии соответствующих антител. После инкубации супернатант собирали и добавляли к
 15 раствору европия (DELFLIA, PerkinElmer), и флуоресценцию европия 2,2':6',2"-терпиридин-6,6"-дикарбоновой кислоты (EuTDA) определяли на спектрофлуориметре (Envision, PerkinElmer). Цитотоксичность, в процентах, рассчитывали по формуле: [(экспериментальное высвобождение - спонтанное высвобождение) / (полное высвобождение - спонтанное высвобождение)] x 100%. Для всех вариантов измерения
 20 проводили в двойном и/или тройном повторе.

Анализ высвобождения ⁵¹Cr (радиоактивный анализ):

Нейтрофилы доноров, гомозиготных либо по SIRP α_1 , либо по SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$, выделяли методом, описанным в публикации Zhao *et al. PNAS* 2011, 108(45), 18342-18347. Для всех
 25 экспериментов с высвобождением ⁵¹Cr, за исключением тех, которые представлены на Фигуре 2, свежевыделенные нейтрофилы культивировали в течение 100 мин с человеческим GM-CSF в концентрации 10 нг/мл. Антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) определяли с использованием анализа высвобождения ⁵¹Cr. Клетки SKBR3 (человеческая линия клеток рака молочной железы) использовали в
 30 качестве клеток-мишеней и метили 100 мкКи ⁵¹Cr (Perkin-Elmer) в течение 90 мин при 37°C. После 2 промываний PBS 5 \times 10³ клеток-мишеней на лунку инкубировали в культуральной среде IMDM с добавлением 10% (об/об) эмбриональной бычьей сыворотки в течение 4 часов в условиях 37°C и 5% CO₂ в 96-луночном планшете с U-
 35 образным дном совместно с нейтрофилами при соотношении эффекторных клеток и мишеней, составляющем 50:1, в присутствии соответствующих антител. После инкубации супернатант собирали и анализировали радиоактивность в гамма-счетчике (Wallac). Цитотоксичность, в процентах, рассчитывали по формуле: [(экспериментальное высвобождение - спонтанное высвобождение) / (полное высвобождение - спонтанное
 40 высвобождение)] x 100%. Для всех вариантов измерения проводили в двойном и/или тройном повторе.

Результаты

Гуманизация 12C4 приводила к потере ADCC, которая была восстановлена за счет уменьшения эффекторной функции константной области IgG1:

45 На Фигуре 2 представлены результаты анализа ADCC в виде цитотоксичности, %, измеренной в анализе высвобождения ⁵¹Cr. Цитотоксичность, %, измеренная на клетках SKBR3 с использованием нейтрофилов от гомозиготных по SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ доноров в качестве эффекторных клеток и только трастузумаба, является более низкой, чем

цитотоксичность, %, трастузумаба в сочетании с мышинным антителом 12C4 (mu12C4). Трастузумаб в сочетании с антителом, в котором переменные области 12C4 привиты на константную область человеческого IgG1 (12C4huIgG1), проявлял сходную цитотоксичность, %, в сравнении с одним только трастузумабом при низких концентрациях 12C4huIgG1. При более высоких концентрациях 12C4huIgG1 наблюдалось уменьшение цитотоксичности, %. Трастузумаб в сочетании с антителом, в котором переменные области 12C4 привиты на константную область человеческого IgG1, имеющую аминокислотные замены L234A и L235A (12C4huIgG1LALA), демонстрировал повышенную цитотоксичность, %, в сравнении с цитотоксичностью, %, одного только трастузумаба, и повышенную цитотоксичность, %, в сравнении с сочетанием 0,2 мкг/мл 12C4huIgG1 и трастузумаба.

Зависимое от дозы увеличение опосредованной трастузумабом ADCC:

ADCC/цитотоксичность, в процентах, трастузумаба (10 мкг/мл) в присутствии антител 1-13 - имеющих константную область человеческого IgG1, имеющую аминокислотные замены L234A и L235A (LALA) - или в присутствии контрольного антитела, в разных концентрациях (мкг/мл; кривые доза-ответ) в отношении клеток SRBR3 HER2-положительного рака молочной железы показана на Фигурах 3-9. При использовании антител 1-13 ADCC возрастала в зависимости от дозы в случае гетерозиготных SIRP α_1 /SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ доноров (Фигуры 4 и 5), где наблюдалось зависимое от дозы уменьшение при использовании 12C4huIgG1, четкий эффект отсутствовал при использовании гуманизированного HEFLB, минимальные эффекты наблюдались при использовании KWAR23huIgG1 и SE5A5, и зависимое от дозы увеличение наблюдалось при использовании контрольного антитела KWAR23-LALA в случае гетерозиготных доноров (Фигура 3). Антитела 7-13 и контрольные антитела также тестировали в случае гомозиготных по SIRP α_1 или SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ доноров (Фигуры 6-9). Все антитела, судя по всему, демонстрировали более переменные результаты.

9. Иммуногенность

CD4⁺ Т-клеточные эпитопы являются важными факторами иммуногенности (антитела против лекарственных средств) *in vivo*. Использовали *ex vivo* Т-клеточный анализ для обнаружения Т-клеточных ответов против Т-клеточных эпитопов в анти-SIRP α антителе 6. Антитело 6 было отправлено в Abzena (Cambridge, UK) для оценки иммуногенности с использованием EpiScreen™ динамического Т-клеточного анализа с целью выяснения их способности индуцировать CD4⁺ Т-клеточные ответы. МКПК от группы из 50 здоровых доноров, представляющих европейскую и североамериканскую популяцию (на основании аллотипов HLA), инкубировали с тестируемыми образцами. Т-клеточные ответы определяли с использованием анализа пролиферации (поглощение [³H]-тимидина) и анализа секреции цитокинов (IL-2 ELISpot). В сочетании анализов Т-клеточной пролиферации и IL-2 ELISpot было установлено, что антитело 6 является не иммуногенным.

10. Антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC); сравнительный пример *Экспериментальный раздел*

Человеческие нейтрофилы от доноров, гомозиготных либо по SIRP α_1 , либо по SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$, или гетерозиготных по обоим аллелям, выделяли методом, описанным в публикации Zhao *et al. PNAS* 2011, 108(45), 18342-18347. Затем нейтрофилы стимулировали гранулоцитарно-моноцитарным колониестимулирующим фактором (GM-CSF, Peprotech) в концентрации 10 нг/мл в течение 30 мин. Антителозависимую клеточную

цитотоксичность (ADCC) определяли с использованием анализа высвобождения ^{51}Cr (PerkinElmer) методом, описанным в публикации Zhao *et al. PNAS* 2011, 108(45), 18342-18347. Вкратце, клетки SKBR3 (человеческая линия клеток рака молочной железы) или A431 (линия клеток эпидермоидной карциномы кожи) использовали в качестве клеток-мишеней и метили 100 мкКи ^{51}Cr (Perkin-Elmer) в течение 90 мин при 37°C. После 2 промываний PBS 5×10^3 клеток-мишеней на лунку опсонизировали при помощи трастузумаба (конечная концентрация для SKBR3 10 мкг/мл) или цетуксимаба (конечная концентрация для A431 5 мкг/мл) и инкубировали в культуральной среде IMDM с добавлением 20% (об/об) эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) с низким содержанием IgG в течение 4 часов в условиях 37°C и 5% CO_2 в 96-луночных планшетах с U-образным дном совместно с нейтрофилами при соотношении эффекторных клеток и мишеней, составляющем 50:1, в присутствии антител с концентрациями в диапазоне зависимости ответа от дозы, которые представлены на Фигурах 13-14. После инкубации супернатант собирали, переносили в LumaPlates (Perkin Elmer) и анализировали на радиоактивность в счетчике MicroBeta (Perkin Elmer). Цитотоксичность, в процентах, рассчитывали по формуле: [(экспериментальное высвобождение - спонтанное высвобождение) / (полное высвобождение - спонтанное высвобождение)] x 100%. Для всех вариантов измерения проводили в двойном и/или тройном повторе.

Результаты

Антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC): Эффект анти-SIRP α антител тестировали в экспериментах ADCC с использованием GM-CSF-активированных первичных человеческих нейтрофилов в качестве эффекторных клеток и разных сочетаний направленных на раковые клетки терапевтических антител и опухолевых клеток-мишеней (Фигуры 13a-b, 14a-b). Последние включали HER2-экспрессирующие клетки SKBR3 рака молочной железы в сочетании с трастузумабом (Фигура 13) и EGFR-экспрессирующие клетки A431 карциномы в сочетании с цетуксимабом (Фигура 14). Результаты показали, что антитело б было способно усиливать ADCC нейтрофилов в обоих сочетаниях направленных на раковые клетки антител и раковых клеток-мишеней. Аналогичные результаты были получены для некоторых других анти-SIRP α антител, но не для, например, 40A-1, 40A-2, 3F9-LALA, 7H9-LALA, 12C4, 29AM4-5-LALA, SE5A5.

В совокупности результаты свидетельствуют о том, что антитело б является единственным антителом с относительно низкой аффинностью, или без нее, для не ингибирующих представителей семейства SIRP, SIRP β_{1v1} , SIRP β_{1v2} и SIRP γ , которое в функциональных анализах эффективно ингибирует последующую сигнализацию, в то же время обеспечивая повышенную ADCC в случае обоих генотипов SIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$ и SIRP α_1 .

Списки последовательностей, у антител 1-13 подчеркнуты аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в аминокислотных последовательностях переменных областей (VR) тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) (остатки VR определены по системе Kabat; нумерация последовательностей является последовательной, не в соответствии с нумерацией Kabat)

SEQ ID NO:1 (HCVR; МАТ 1)

1 VQLVESGGRL GQPGTPLTLS CTVSGFSLSSYVMGWFRQAP GKGLE^{II}YIGII

51 SSSGSPYYASWVNGRFTISK TSTTMDLKMN SLRSEDTATY FCARVGPLGV

101 DYENIWGPGT LVTVSS

SEQ ID NO:2 (LCVR; МАТ 1, 2, 3, 4, 12, 13)

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSINSYLA^{II}WYQQKP GKAPKLLIYS

51 ASFLYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQSWHYISRSYTF

101 GQGTKVEIK

SEQ ID NO:3 (HCVR; mAt 2)

1 VQLVESGGRL VQPGTPLTLS CTVSGFSLSSYVMGWFRQAP GKGLLEYIGII

51 SSSGSPYYASWVNGRFTISK TSTTMDLKMN SLRSEDTATY FCARVGPLGV5 101 DYFNIWGPGT LVTVSS

SEQ ID NO:4 (HCVR; mAt 3)

1 VQLVESGGRL GQPGTSLTLS CTVSGFSLSSYVMGWFRQAP GKGLLEYIGII

51 SSSGSPYYASWVNGRFTISK TSTTMDLKMN SPTTEDTATY FCARVGPLGV101 DYFNIWGPGT LVTVSS

10 SEQ ID NO:5 (HCVR; mAt 4)

1 VQLVESGGRL GQPGTSLTLS CTVSGFSLSSYVMGWFRQAP GKGLLEYIGII

51 SSSGSPYYASWVNGRFTISK TSTTMDLKMN SLRSEDTATY FCARVGPLGV101 DYFNIWGPGT LVTVSS

SEQ ID NO:6 (HCVR; mAt 5, 8)

15 1 RQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFSLSSHGISWVRQAP GKGLLEYIGTI

51 GTGVITYYASWAKGRFTGSK TSSTAYLQMT SLRAEDTAVY YCARGSAWND101 PFDYWGQGTL VTVSS

SEQ ID NO:7 (LCVR; mAt 5, 11)

20 1 DIEMTQSPSS VSASVGDRVT LTCQASQSVYGNNDLAWYQQ KPGQAPKLLI

51 YLASTLATGV PSRFGSGSG TDFTLTISSL QPEDFATYYC LGGGDDEADN101 VFGGGTKVEI K

SEQ ID NO:8 (HCVR; mAt 6)

1 RQLVESGGGL VQPGGSLRLS CTASGFSLSSHGISWVRQAP GKGLLEYIGTI

51 GTGVITYFASWAKGRFTGSK TSSTAYMELS SLRSEDTAVY FCARGSAWND25 101 PEDPWGQGT L VTVSS

SEQ ID NO:9 (LCVR; mAt 6, 7, 8, 9, 10)

1 DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQSVYGNNDLAWYQQ KPGQAPKLLI

51 YLASTLATGV PSRFGSGSG TDFTLTISSL QPEDFATYYC LGGGDDEADN101 TFGQGTKVEI K

30 SEQ ID NO:10 (HCVR; mAt 7)

1 RQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFSLSSHGISWVRQAP GKGLEWVGTI

51 GTGVITYYASWAKGRFTGSK TSSTAYLQMT SLRAEDTAVY YCARGSAWND101 PFDYWGQGT L VTVSS

SEQ ID NO:11 (HCVR; mAt 9)

35 1 RQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFSLSSHGISWVRQAP GKGLEWVGTI

51 GTGVITYYASWAKGRFTGSK TSSTAYLQMT SLRSEDTAVY YCARGSAWND101 PFDYWGQGT L VTVSS

SEQ ID NO:12 (HCVR; mAt 10)

40 1 RQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFSLSSHGISWVRQAP GKGLEWVGTI

51 GTGGITYYASWAKGRFTGSK TSSTAYMELS SLRAEDTAVY YCARGSAWND101 PFDIWGQGT L VTVSS

SEQ ID NO:13 (HCVR; mAt 11)

1 RQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFSLSSHGISWVRQAP GKGLEWVGTI

51 GTGVITYYASWAKGRFTGSK TSSTAYLQMT SLRAEDTAVY YCARGSAWND45 101 PFDYWGQGT L VTVSS

SEQ ID NO:14 (HCVR; mAt 12)

1 QSVEESGGRL VQPGTPLTLS CTVSGFSLSSYVMGWFRQAP GKGLLEYIGII

51 SSSGSPYYASWVNGRFTISK TSTTMDLKMN SLRSEDTATY FCARVGPLGV

101 DYFNIWGPGT LVTVSS

SEQ ID NO:15 (HCVR; mAt 13)

1 VQLVESGGRL VQPGTPLTLS CTVSGFSLSSYVMGWFRQAP GKGLE^{YIGII}

51 SSSGSPYYASWVNGRFTISK TSTTMDLKMN SPTTEDTATY FCARVGPLGV

5 101 DYFNIWGPGT LVTVSS

SEQ ID NO:16 (HC; 12C4)

1 EVKLEESGGG LMQPGGSMKL SCVASGFTFS NYWMNWVRQS PEKGLEWVAE

51 IRLKSNNYAT HYAESVKGRF TISRDDSKSS VYLQMNNLRA EDTGIYYCIR

101 DYDYDAYFDY WGQGTTLTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV

10 151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ

201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK

251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY

301 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP

351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP

15 401 VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG

451 K

SEQ ID NO:17 (LC; 12C4)

1 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYNYMYWY QQKPGQPPKL

51 LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHS^{GELPY}

20 101 TFGGGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV

151 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL^S STLTLKADY EKHKVYACEV

201 THQGLSSPVT KSFNRGEC

SEQ ID NO:18 (HC; 29AM4-5-LALA)

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIS YYFIHWVRQA PGKGLEWVAS

25 51 VYSSFGYTTY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARFT

101 FPGLFDGFFG AYLGS^{LDYWG} QGTLTVVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG

151 TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFP^{AVLQSSG} LYSLS^{SVVTV}

201 PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP

251 SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK

30 301 TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK

351 AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE

401 NNYKTPPV^L DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ

451 KSLSLSPGK

SEQ ID NO:19 (LC; 29AM4-5-LALA)

35 1 DIQMTQSPSS LSASVGD^{RVT} ITCRASQSVS SAVAWYQKPK GKAPKLLIYS

51 ASSLYSGVPS RFSGSRSGTD FTLTIS^{LQP} EDFATY^{YCQQ} AVNWVGALVT

101 FGQGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ

151 WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT

201 HQGLSSPVTK SFNRGEC

40 SEQ ID NO:20 (HC; 12C4-LALA)

1 EVKLEESGGG LMQPGGSMKL SCVASGFTFS NYWMNWVRQS PEKGLEWVAE

51 IRLKSNNYAT HYAESVKGRF TISRDDSKSS VYLQMNNLRA EDTGIYYCIR

101 DYDYDAYFDY WGQGTTLTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV

151 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ

45 201 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCAPEAAG GPSVFLFPPK

251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY

301 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP

351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP

401 VLSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
451 K

SEQ ID NO:21 (LC; 12C4-LALA)

1 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYNYMYWY QQKPGQPPKL
5 51 LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHS GELPY
101 TFGGGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
151 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S STLTL SKADY EKHKVYACEV
201 THQGLSSPVT KSFNRGEC

SEQ ID NO:22 (HC; KWAR23-LALA)

1 EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DYYIHWVQQR TEQGLEWIGR
10 51 IDPEDGETKY APKFQDKATI TADTSSNTAY LHLSSLTSED TAVYYCARWG
101 AYWGQGTIVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV
151 TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH
201 KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
15 251 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
301 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
351 RDELTKNQVS LTCLVKGFPY SDIAVEWESN GPENNYKTT PVLDS DGSF
401 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

SEQ ID NO:23 (LC; KWAR23-LALA)

1 QIVLTQSPAI MSASPGEKVT LTCASASSVS SSYLYWYQQK PGSSPKLWIY
20 51 STSNLASGVP ARFSGSGSGT SYSLTISSME AEDAASYFCH QWSSYPRTFG
101 AGTKLELKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK
151 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSL TL SKADYEK K VYACEVTHQ
201 GLSSPVTKSF NRGEC

25 SEQ ID NO:24 (константная область HC человеческого IgG1 антитела)

1 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
101 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
151 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
30 201 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
251 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV L DSDGSFFLY SKLTVDKSRW
301 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

SEQ ID NO:25 (LALA мутант константной области HC человеческого IgG1 антитела
(мутации подчеркнуты))

35 1 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
101 KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
151 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
201 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
40 251 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV L DSDGSFFLY SKLTVDKSRW
301 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

SEQ ID NO:26 (константная область к LC человеческого антитела)

1 RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
51 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTL SKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
45 101 SFNRGEC

SEQ ID NO:27 (лидерная последовательность HAVT20, 12C4/12C4-LALA/29AM4-5
LALA/KWAR23/KWAR23-LALA/HEFLB)

1 MACPGFLWAL VISTCLEFSM A

SEQ ID NO:28 (лидерная последовательность тяжелых цепей МАТ 1-13)
 1 MGWTLVFLFL LSVTAGVHS
 SEQ ID NO:29 (лидерная последовательность легких цепей МАТ 1-13)
 1 MVSSAQFLGL LLLCFQGTRC
 5 SEQ ID NO:30 (HCDR1; МАТ 1, 2, 3, 4, 12 и 13)
 1 SYVMG
 SEQ ID NO:31 (HCDR2; МАТ 1, 2, 3, 4, 12 и 13)
 1 IISSSGSPYY ASWVNG
 SEQ ID NO:32 (HCDR3; МАТ 1, 2, 3, 4, 12 и 13)
 10 1 VGPLGVDYFN I
 SEQ ID NO:33 (LCDR1; МАТ 1, 2, 3, 4, 12 и 13)
 1 RASQSINSYL A
 SEQ ID NO:34 (LCDR2; МАТ 1, 2, 3, 4, 12 и 13)
 1 SASFLYS
 15 SEQ ID NO:35 (LCDR3; МАТ 1, 2, 3, 4, 12 и 13)
 1 QSWHYISRSY T
 SEQ ID NO:36 (HCDR1; МАТ 5-11)
 1 SHGIS
 SEQ ID NO:37 (HCDR2; МАТ 5, 7, 8, 9, 11)
 20 1 TIGTGVITYY ASWAKG
 SEQ ID NO:38 (HCDR3; МАТ 5, 7, 8, 9, 11)
 1 GSAWNDPFDY
 SEQ ID NO:39 (LCDR1; МАТ 5-11)
 1 QASQSVYGNN DLA
 25 SEQ ID NO:40 (LCDR2; МАТ 5-11)
 1 LASTLAT
 SEQ ID NO:41 (LCDR3; МАТ 6-10)
 1 LGGGDDEADN T
 SEQ ID NO:42 (HCDR2; МАТ 10)
 30 1 TIGTGGITYY ASWAKG
 SEQ ID NO:43 (HCDR3; МАТ 10)
 1 GSAWNDPFDI
 SEQ ID NO:44 (HCDR2; МАТ 6)
 1 TIGTGVITYF ASWAKG
 35 SEQ ID NO:45 (HCDR3; МАТ 6)
 1 GSAWNDPFDP
 SEQ ID NO:46 (LCDR3; МАТ 5, 11)
 1 LGGGDDEADN V
 SEQ ID NO:47 (HC; KWAR23)
 40 1 EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DYYIHWVQQR TEQGLEWIGR
 51 IDPEDGETKY APKFQDKATI TADTSSNTAY LHLSSLTSED TAVYYCARWG
 101 AYWGQGTIVT VSSAKTTAPS VYPLAPVCGD TTGSSVTLGC LVKGYFPEPV
 151 TLTWNSGSL SSGVHTFPAVL QSDLYTLSS VTVTSSTWPS QSITCNVAHP
 201 ASSTKVDK KI EPRGPTIKPC PPCKCPAPNL LGGPSVFIFP PKIKDVL MIS
 45 251 LSPIVTCVVV DVSEDDPDVQ ISWVFNVEV HTAQQTHTRE DYNSTLRVVS
 301 ALPIQH QDWM SGKEFKCKVN NKDLPIER TISKPKGSVR APQVYVLP PP
 351 EEEMTKKQVT LTCMV TDFMP EDIYVEWTNN GKTELNYKNT EPVLDS DGSY
 401 FMYSKLRVEK KNWVERNSYS CSVVHEGLHN HHTTKSFSRT PGK

SEQ ID NO:48 (LC; KWAR23)

1 QIVLTQSPAI MSASPGEKVT LTCASASSVS SSYLYWYQQK PGSSPKLWIY
 51 STSNLASGVP ARFSGSGSGT SYSLTISSME AEDAASYFCH QWSSYPRTFG
 101 AGTKLELKRA DAAPTVISIFP PSSEQLTSGG ASVVCFLNNF YPKDINVKWK
 5 151 IDGSERQNGV LNSWTDQDSK DSTYSMSSTL TLTKDEYERH NSYTCEATHK
 201 TSTSPIVKSF NRNEC

SEQ ID NO:49 (HC; HEFLB)

1 EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKASGYSFT SYWVHWVRQM PGKGLEWMGN
 51 IDPSDS DTHY SPSFQGHVTL SVDKSISTAY LQLSSLKASD TAMYYCVRGG
 10 101 TGTLAYFAYW GQGLTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK
 151 DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGKTK
 201 YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT
 251 LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
 301 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
 15 351 LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 401 DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

SEQ ID NO:50 (LC; HEFLB)

1 DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HSYGNTYLYW FQQRPGQSPR
 51 LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQGTHTVP
 20 101 YTFGGGKTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
 151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
 201 VTHQGLSSPV TKSFNREGC

SEQ ID NO:51 (человеческий SIRP α_1 , внеклеточный домен 1-370, *Avi-FXa-Fc-метка*)

MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTV
 25 TSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGT
 YYCVKFRKGSPTDEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFSPR
 DITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTR EDVHSQVICEVAHVTLQG
 DPLRGTANLSETIRVPPTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVS
 TETASTVTENKDGTYNWM SWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVS
 30 HPKEQGSNTAAENTGSNERN GGGLNDIFEAQKIEWHEIEGRDKTHTCPPCPAPELLGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:52 (человеческий SIRP α_{IIIT} , внеклеточный домен 1-370, *Avi-FXa-Fc-метка*)

MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTA
 TSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLT KRNNMDFSIRIGNITPADAGT
 YYCVKFRKGSPTDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFSP
 40 RDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTR EDVHSQVICEVAHVTLQ
 GDPLRGTANLSETIRVPPTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVS
 RTETASTVTENKDGTYNWM SWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVS
 AHPKEQGSNTAAENTGSNERN GGGLNDIFEAQKIEWHEIEGRDKTHTCPPCPAPELLGG
 PVSFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 45 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTV
 KSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:53 (человеческий SIRP β_{1V1} , внеклеточный домен, *Avi-FXa-Fc-метка*)

MPVPASWPHLPSFLLMTLLLGRLTGVAGEDELQVIQPEKSVSVAAGESATLRCAMT
 SLIPVGPIMWFRGAGAGRELIYNQKEGHFPRVTTVSELTKRNNLDFSISISNITPADAGTY
 YCVKFRKGGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAVRATPEHTVSFTCESHGFSR
 DITLKWFKNGNELSDFQTNVDPAGDSVSYSIHSTARVVLTRGDVHSQVICEIAHITLQGD
 5 PLRGTANLSEAIRVPPTLEVTQQPMRAENQANVTCQVSNFYPRGLQLTWLENGNVSR
 ETASTLIENKDGTYNWMWLLVNTCAHRDDVLTLCQVEHDGQQA VSKSYALEISAHQ
 KEHGS DITHEAALAPTAPLGGGLNDIFEAQKIEWHEIEGRDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
 10 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:54 (человеческий SIRP $\beta_{1/2}$, внеклеточный домен, *Avi-FXa-Fc-метка*)

MPVPASWPHLPSFLLMTLLLGRLTGVAGEEELQVIQPKSISVAAGESATLHCTVTS
 LIPVGP IQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRISNITPADAGTY
 15 YCVKFRKGGSPDHVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFSR
 DITLKWFKNGNELSDFQTNVDPAGDSVSYSIHSTAKVVLTRDVDHSQVICEVAHVTLQG
 DPLRGTANLSETIRVPPTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFY PQRQLTWLENGNVSR
 TETASTLTENKDGTYNWMWLLVNVSAHRDDVLTLCQVEHDGQPAVSKSHDLKVSA
 HPKEQGSNTAPGALASAAPLGGGLNDIFEAQKIEWHEIEGRDKTHTCPPCPAPELLGGP
 20 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:55 (человеческий SIRP γ , внеклеточный домен, *Avi-FXa-Fc-метка*)

MPVPASWPHPPGFLLLLTLLGLTEVAGEEELQMIQPEKLLLVTVGKTATLHCTVTS
 LPVGPVLWFRGVGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRISSITPADVGTYY
 CVKFRKGGSPENVEFKSGPGTEMALGAKPSAPVVLGPAARTTPEHTVSFTCESHGFSRDI
 TLKWFKNGNELSDFQTNVDPTGQSVAYSIRSTARVVLDPWDVRSQVICEVAHVTLQGD
 30 PLRGTANLSEAIRVPPTLEVTQQPMRVGNQVNVTCQVRKFY PQLSLTWSENGNVQCR
 ETASTLTENKDGTYNWTWFLVNSDQRDDVLTLCQVKHDGQLAVSKRLALEVTVHQ
 KDQSSDATPKGQDNSADIQHSGGRSSLEGPRFEGKPIPNPLLGLDSTRTGGGGLNDIFEA
 QKIEWHEIEGRDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 35 QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK

SEQ ID NO:56 (SIRP α яванского макака, внеклеточный домен, *Avi-FXa-Fc-метка*)

MEPAGPAPGRLGPLLCLLLTASCAWSGVLGEEELQVIQPEKSVSVAAGDSATLNCTV
 SSLIPVGP IQWFRGAGPGRELIYNLKEGHFPRVTAVSDPTKRNNMDFSIRISNITPADAGT
 40 YYCVKFRKGGSPDVELKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAVRATAEHTVSFTCESHGFSR
 DITLKWFKNGNELSDVQTNVDPAGKSVSYIRSTARVLLTRRDVHSQVICEVAHVTLQG
 DPLRGTANLSEAIRVPPFLEVTQQSMRADNQVNVTCQVTKFY PQRQLTWLENGNVSR
 TEMASALPENKDGTYNWTWLLVNVSAHRDDVLTLCQVEHDGQPAVNKSFSVKVSA
 HPKEQGSNTAAENTGTNERNGGGLNDIFEAQKIEWHEIEGRDKTHTCPPCPAPELLGGP
 45 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:57 (HC; 1H9; включая лидерную последовательность [подчеркнута]; константную область [*курсив*])

MACPGFLWALVISTCLEFSMAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWIT
 WVKQAPGQGLEWIGDIYPGSGSTNHIEKFKSKATLTVDTISISTAYMELSRRLRSDDTAVY
 5 YCATGYGSSYGYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
 FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 10 QPENNYKTTTPVLDSGDFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK

SEQ ID NO:58 (LC; 1H9; включая лидерную последовательность [подчеркнута]; константную область [*курсив*])

MACPGFLWALVISTCLEFSMADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQ
 15 QKPGKAPKLLIYATAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHGYGPPFTF
 GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
 NSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:59 (HC; 40A-1; включая лидерную последовательность [подчеркнута]; константную область [*курсив*])

MACPGFLWALVISTCLEFSMAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWIT
 WVKQAPGQGLEWIGDIYPGSGSTNHIEKFKSKATLTVDTISISTAYMELSRRLRSDDTAVY
 YCATGYGSSYGYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
 FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 20 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSGDFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 25 SPGK

SEQ ID NO:60 (LC; 40A-1; включая лидерную последовательность [подчеркнута]; константную область [*курсив*])

MACPGFLWALVISTCLEFSMADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWLQ
 QKPGKAPKRLIYATSSLDGVPFRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYASSPFTF
 GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
 NSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:61 (HC; 40A-2; включая лидерную последовательность [подчеркнута]; константную область [*курсив*])

MACPGFLWALVISTCLEFSMAEVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGSTFTSYWMH
 WVKQAPGQGLEWIGAIYPVNSDTTYNQKFKGKATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDYAV
 YYCTRSFYYSLDAWFVYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
 40 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKP
 SNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHED
 PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK
 GLPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPMLDSGDFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 45 PGK

SEQ ID NO:62 (LC; 40A-2; включая лидерную последовательность [подчеркнута]; константную область [*курсив*])

MACPGFLWALVISTCLEFSMADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWLQ

QKPGKAPKRLIYATSSLD SGVPSRFS GSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQYASSPFTF
GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5 SEQ ID NO:63 (HC; AB3-LALA; включая лидерную последовательность [подчеркнута];
константную область [курсив])

MACPGFLWALVISTCLEFSMAAVTLDES GGGGLQTPGGALSLVCKASGFIFSDYGMN
WVRQAPGKGLEFVAQITSGSRTYYGA AVKGRATISRDNRQSTVKLQLNNLRAEDTGIY
FCARDFGSGVGSIDAWGNGTEVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
10 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETVCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

15 SEQ ID NO:64 (LC; AB3-LALA; включая лидерную последовательность [подчеркнута];
константную область [курсив])

MACPGFLWALVISTCLEFSMAALTQPASVSANLGGTVKITCSGSRGRYGWYQQRSP
GSAPVTVIYRDNQRPSNIPSRFSSSTSGSTSTLTITGVQADDES VYFCGSYDGSIDIFGAGT
TLTVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
20 SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:65 (HC; AB25-LALA; включая лидерную последовательность
[подчеркнута]; константную область [курсив])

MACPGFLWALVISTCLEFSMADVQLVESGGGVVRPGESLRLSCEASGFTFSSNAMSW
VRQAPGKGLEWVAGISSGSDTYYGDSVKGRLTISRDN SKNILYLQMNSLTAEDTAVYY
25 CARETWNHLFDYWGLGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETVCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
30 NNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:66 (LC; AB25-LALA; включая лидерную последовательность
[подчеркнута]; константную область [курсив])

MACPGFLWALVISTCLEFSMASYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSYSSYYYAWYQ
QKPGQAPVTLIYSDDKRPSNIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADY YCGGYDQSSYT
35 NPFGGGTKLTVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

SEQ ID NO:67 (HC; AB115-LALA; включая лидерную последовательность
[подчеркнута]; константную область [курсив])

MACPGFLWALVISTCLEFSMAVQLVESGGGVVRPGESLRLSCAASGFSSSYAMNW
VRQAPGEGLEWVSRINSGGGGTDYAESVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVY
YCAKQYDWN SFFDYWGLGALTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETVCVVVDVSH
45 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

SEQ ID NO:68 (LC; AB115-LALA; включая лидерную последовательность [подчеркнута]; константную область [курсив])

MACPGFLWALVISTCLEFSMAETVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQTVGSKLAWH
 QKPGQAPRLLIYDATNRATGISDRFSGSGSGTDFTLTISSLQTEDSAVYYCQQYYYWPP
 5 YRFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
 QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 EC

SEQ ID NO:69 (HC; AB119-LALA; включая лидерную последовательность [подчеркнута]; константную область [курсив])

MACPGFLWALVISTCLEFSMAVQLLESGGGVVPQGGSLRLSCAASGFSFSNFAMTW
 VRQAPGEGLEWVSTIGSGDTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
 AKDSTVSWSGDFFDYWGLGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
 PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 15 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSL
 SPGK

SEQ ID NO:70 (LC; AB119-LALA; включая лидерную последовательность [подчеркнута]; константную область [курсив])

MACPGFLWALVISTCLEFSMAEIVLTQSPATLSVSPGERATFSCRASQNVKNDLAWY
 QQRPGQAPRLLIYAARIRETGIPERFSGSGSGTEFTLTITSLQSEDFAVYYCQQYYDWPPF
 TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 20 SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:71 (HC; AB136-LALA; включая лидерную последовательность [подчеркнута]; константную область [курсив])

MACPGFLWALVISTCLEFSMADVQLVESGGGVVVRPGESLRLSCAASGFTFSSYDMN
 WVRQAPGEGLEWVSLISGGEIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY
 YCAKENNRYRFFDDWGLGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 30 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSP
 35 GK

SEQ ID NO:72 (LC; AB136-LALA; включая лидерную последовательность [подчеркнута]; константную область [курсив])

MACPGFLWALVISTCLEFSMAETVLTQSPGTLTLPGERATLTCRASQSVYTYLAWY
 QEKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYYDRPPL
 40 TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:73 (HC; 3F9-LALA; включая лидерную последовательность [подчеркнута]; константную область [курсив])

MACPGFLWALVISTCLEFSMAEVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSW
 VRQTPEKRLEWVATISDYGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDALY
 YCARPPYDDYGGFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
 45 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
 TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV

*HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK*

5 SEQ ID NO:74 (LC; 3F9-LALA; включая лидерную последовательность [подчеркнута]; константную область [*курсив*])

MACPGFLWALVISTCLEFSMADIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSSGYSYM
HWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHNR
ELPCTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
10 NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC

SEQ ID NO:75 (HC; 7H9-LALA; включая лидерную последовательность [подчеркнута]; константную область [*курсив*])

MACPGFLWALVISTCLEFSMADVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGFSISRGYDWH
15 WIRHFPGNILEWMGYITYSGISNYPNSLKSRSITHTDTSKNHFFLRLNSVTAEDTATYYCA
RGGGAWFTYWGQGLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
20 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:76 (LC; 7H9-LALA; включая лидерную последовательность [подчеркнута]; константную область [*курсив*])

MACPGFLWALVISTCLEFSMADIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSIDSLHWYH
25 QKSHESPRLLIKYASQSIGIPSRFSAGGSGSDFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSLPWF
GGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDYSLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Таблица 8. Примеры замен аминокислотных остатков в FR1 тяжелой цепи

30	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	V R Q	Q S	L V	V E	E	S	G	G	R G	L	V G	Q	P	G	T G	S P	L	T R	L	S	C	T A	V A	S	G	F	S	L	S

Таблица 9. Примеры замен аминокислотных остатков в FR2 тяжелой цепи

35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
	W	F V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	Y W	I V	G

Таблица 10. Примеры замен аминокислотных остатков в FR3 тяжелой цепи

40	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82A	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
	R	F	T	I G	S	K	T	S	T S	T	M A	D Y	L M	K Q E	M L	N T S	S	L P	R T	S T A	E	D	T	A	T V	Y	F Y	C	A	R

Таблица 11. Примеры замен аминокислотных остатков FR4 в тяжелой цепи

45	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
	W	G	P Q	G	T	L	V	T	V	S	S

Таблица 12. Примеры замен аминокислотных остатков в FR1 легкой цепи

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

D	I	Q E V	M	T	Q	S	P	S	S	L V	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I L	T	C
---	---	-------------	---	---	---	---	---	---	---	--------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--------	---	---

Таблица 13. Примеры замен аминокислотных остатков в FR2 легкой цепи

35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
W	Y	Q	Q	K	P	G	K Q	A	P	K	L	L	I	Y

Таблица 14. Примеры замен аминокислотных остатков в FR4 легкой цепи

98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

(57) Формула изобретения

1. Гуманизованное анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит:

- a. HCDR1, содержащую SEQ ID NO:36;
- b. HCDR2, содержащую SEQ ID NO:44;
- c. HCDR3, содержащую SEQ ID NO:45;
- d. LCDR1, содержащую SEQ ID NO:39;
- e. LCDR2, содержащую SEQ ID NO:40; и
- f. LCDR3, содержащую SEQ ID NO:41.

2. Гуманизованное анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, имеет одно или более свойств из группы, состоящей из следующего:

a. анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывает человеческий SIRP α_1 с аффинностью связывания, составляющей по меньшей мере 10^{-10} M, предпочтительно, по меньшей мере 10^{-11} M, при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C с использованием внеклеточного домена человеческого SIRP α_1 с последовательностью SEQ ID NO:51;

b. анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывает человеческий SIRP α_{B1T} с аффинностью связывания, составляющей по меньшей мере 10^{-10} M, предпочтительно, по меньшей мере 10^{-11} M, при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C с использованием внеклеточного домена человеческого SIRP α_{B1T} с последовательностью SEQ ID NO:52;

c. анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывает SIRP α яванского макака с аффинностью связывания, составляющей по меньшей мере 10^{-8} M, предпочтительно, по меньшей мере 10^{-9} M, при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C с использованием внеклеточного домена SIRP α яванского макака с последовательностью SEQ ID NO:56;

d. анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, не связывает человеческий SIRP γ при измерении методом Т-клеточного связывания с использованием проточной цитометрии, предпочтительно, с использованием окрашивания и активированной флуоресценцией сортировки клеток;

e. анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, не связывает

человеческий SIRP γ при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C с использованием внеклеточного домена человеческого SIRP γ с последовательностью SEQ ID NO:55; и

f. анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, не является иммуногенным при определении IL-2 методом иммуноферментных пятен (ELISpot) и/или в анализе Т-клеточной пролиферации.

3. Гуманизованное анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по п. 1 или 2, где:

a. анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывает человеческий SIRP α_1 с аффинностью связывания, составляющей по меньшей мере 10^{-10} М, предпочтительно, по меньшей мере 10^{-11} М, при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C с использованием внеклеточного домена человеческого SIRP α_1 с последовательностью SEQ ID NO:51;

b. анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывает человеческий SIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$ с аффинностью связывания, составляющей по меньшей мере 10^{-10} М, предпочтительно, по меньшей мере 10^{-11} М, при анализе методом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C с использованием внеклеточного домена человеческого SIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$ с последовательностью SEQ ID NO:52;

c. блокирует связывание CD47 с SIRP α_1 и SIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$ в анализе диссоциации от иммобилизованного CD47 методом поверхностного плазмонного резонанса; и

d. анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, не связывает человеческий SIRP γ при измерении в анализе окрашивания и проточной цитометрии Т-клеток, предпочтительно, при окрашивании с активированной флуоресценцией сортировкой клеток.

4. Гуманизованное анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предшествующих пунктов, где:

a. переменный домен тяжелой цепи антитела содержит 4 каркасные области тяжелой цепи, HFR1-HFR4, и 3 определяющие комплементарность области HCDR1-HCDR3, которые функционально связаны в следующем порядке: HFR1-HCDR1-HFR2-HCDR2-HFR3-HCDR3-HFR4, где каждая из каркасных областей тяжелой цепи по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности каркаса SEQ ID NO:8, или где HFR1-HFR4 отличаются от SEQ ID NO:8 одной или более аминокислотными заменами, как указано в Таблицах 8-11; и

b. переменный домен легкой цепи антитела содержит 4 каркасные области легкой цепи, LFR1-LFR4, и 3 определяющие комплементарность области LCDR1-LCDR3, которые функционально связаны в следующем порядке: LFR1-LCDR1-LFR2-LCDR2-LFR3-LCDR3-LFR4, где каждая из каркасных областей легкой цепи по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности каркаса SEQ ID NO:9, или где LFR1, LFR2 и/или LFR4 отличаются от SEQ ID NO:9 одной или более аминокислотными заменами, как указано в Таблицах 12-14.

5. Гуманизованное анти-SIRP α антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предшествующих пунктов, содержащее переменную область тяжелой цепи (HCVR) и переменную область легкой цепи (LCVR), где антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID NO:8 и аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO:9.

6. Гуманизованное анти-SIRP α антитело по любому из предшествующих пунктов,

содержащее модифицированную Fc-область, которая проявляет пониженное связывание с человеческим Fc α или Fc γ -рецептором в сравнении с таким же анти-SIRP α антителом, содержащим Fc-область дикого типа.

5 7. Гуманизованное анти-SIRP α антитело по любому из предшествующих пунктов, содержащее модифицированную Fc-область человеческого IgG1 с аминокислотной заменой в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из L234, L235, G237, D265, D270, N297, A327, P328 и P329 в соответствии с нумерацией Eu.

8. Гуманизованное анти-SIRP α антитело по п. 7, содержащее аминокислотные замены L234A и L235A; L234E и L235A; L234A, L235A и P329A; или L234A, L235A и P329G.

9. Фармацевтическая композиция для применения в качестве лекарственного средства для лечения рака, содержащая гуманизованное анти-SIRP α антитело по любому из пп. 1-8, или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

15 10. Гуманизованное анти-SIRP α антитело по любому из пп. 1-8, или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, для применения в качестве лекарственного препарата.

11. Молекула нуклеиновой кислоты для экспрессии кодирующей нуклеотидной последовательности в клетке-хозяине, где молекула содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гуманизованное анти-SIRP α антитело по любому из пп. 1-8, или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5.

12. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 11, где молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере одну из HCVR и LCVR антитела.

25 13. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 11 или 12, где кодирующая нуклеотидная последовательность функционально связана с регуляторными последовательностями для экспрессии кодирующей нуклеотидной последовательности в клетке-хозяине.

14. Клетка-хозяин для получения антитела по любому из пп. 1-8, где клетка содержит молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 11-13.

30 15. Применение гуманизованного анти-SIRP α антитела по любому из пп. 1-8, его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-5 или фармацевтической композиции по п. 9 для получения лекарственного средства для лечения рака, где лечение также включает введение терапевтического антитела.

35 16. Применение по п. 15, где рак представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование у человека.

17. Применение по любому из пп. 15 или 16, где терапевтическое антитело направлено против связанной с мембраной мишени на поверхности опухолевых клеток и содержит человеческую Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках.

40 18. Применение по любому из пп. 15-17, где связанная с мембраной мишень выбрана из группы, состоящей из аннексина A1, AMHR2, AXL, BCMA, B7H3, B7H4, CA6, CA9, CA15-3, CA19-9, CA27-29, CA125, CA242, CCR2, CCR4, CCR5, CD2, CD4, CD16, CD19, CD20, CD22, CD27, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD47, CD52, CD56, CD70, CD74, CD79, CD98, CD115, CD123, CD138, CD203c, CD303, CD333, CEACAM, CLCA-1, CLL-1, c-MET, Cripto, CTLA-4, DLL3, EGFL, EGFR, EPCAM, Eph, рецептора эндотелина B (ETBR), FAP, FcRL5 (CD307), FGF, FGFR, FOLR1, фукозил-GM1, GCC, GD2, GPNMB, gp100, HER2, HER3, HMW-MAA, интегрин α , IGF1R, IL1RAP, антигена каппа-миеломы, TM4SF1, Льюис А-подобного углевода, Льюис X, Льюис Y, LIV1, мезотелина, MUC1,

MUC16, NaPi2b, нектин-4, PD-1, PD-L1, рецептора пролактина, PSMA, PTK7, SLC44A4, STEAP-1, антигена 5T4, тканевого фактора (TF), антигена Томсена-Фриденрайха (TF-Ag), Tag72, TNF, TNFR, TROP2, VEGF, VEGFR и VLA.

19. Применение по п. 16, где солидная опухоль человека выбрана из группы, состоящей из (HER2-положительного) рака молочной железы, (EGFR-положительной) карциномы толстой кишки, (GD2-положительной) нейробластомы, меланомы, остеосаркомы, (CD20-положительных) В-клеточных лимфом, (CD38-положительной) множественной миеломы, (CD52-положительной) лимфомы, (CD33-положительного) острого миелоидного лейкоза (AML), хронического миелоидного лейкоза (CML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), неходжскинской лимфомы (NHL), включая фолликулярную лимфому (FL) и диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), печеночно-клеточной карциномы, множественной миеломы (MM), рака мочевого пузыря, рака желудка, рака яичника, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, почечной карциномы, рака предстательной железы, печеночно-клеточной карциномы и рака легкого.

20. Применение по любому из пп. 15-19, где лечение включает введение дополнительного противоракового терапевтического соединения.

21. Применение по п. 20, где дополнительное противораковое терапевтическое соединение представляет собой направленное терапевтическое средство, предпочтительно, иммунотерапевтическое средство.

25

30

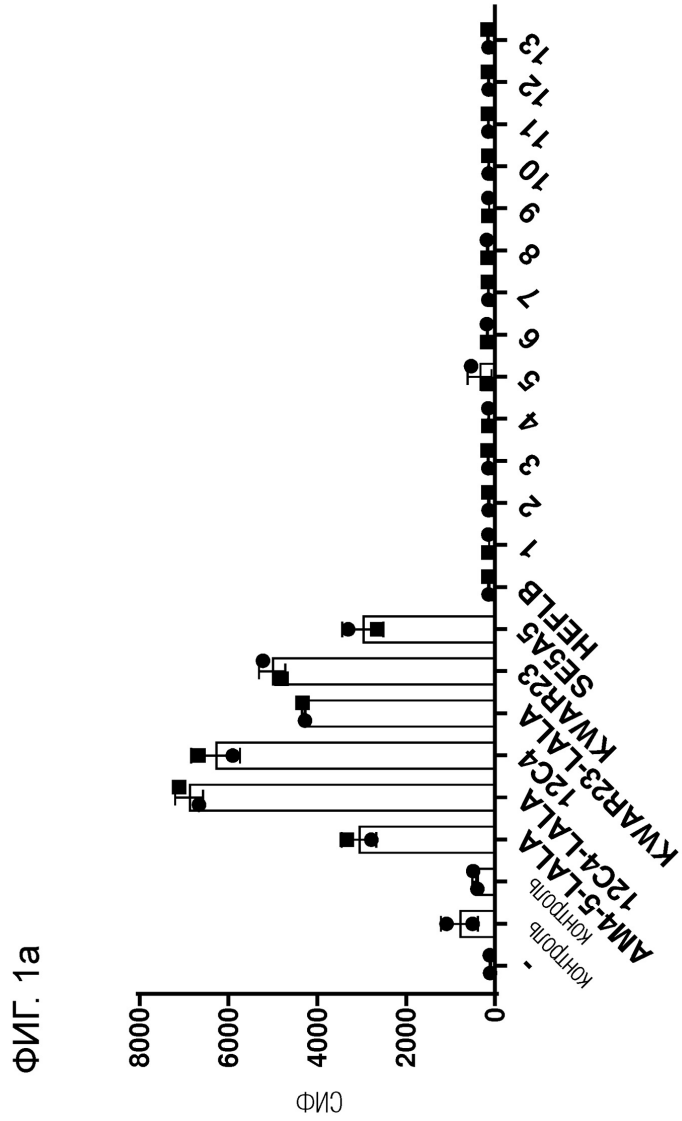
35

40

45

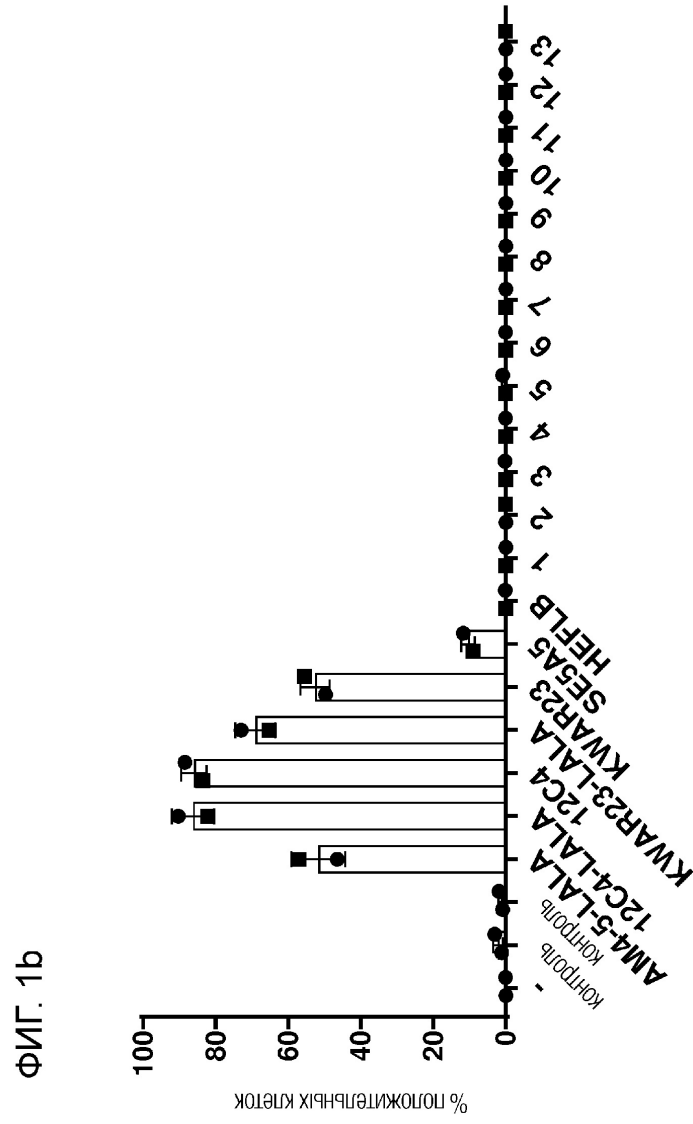
1

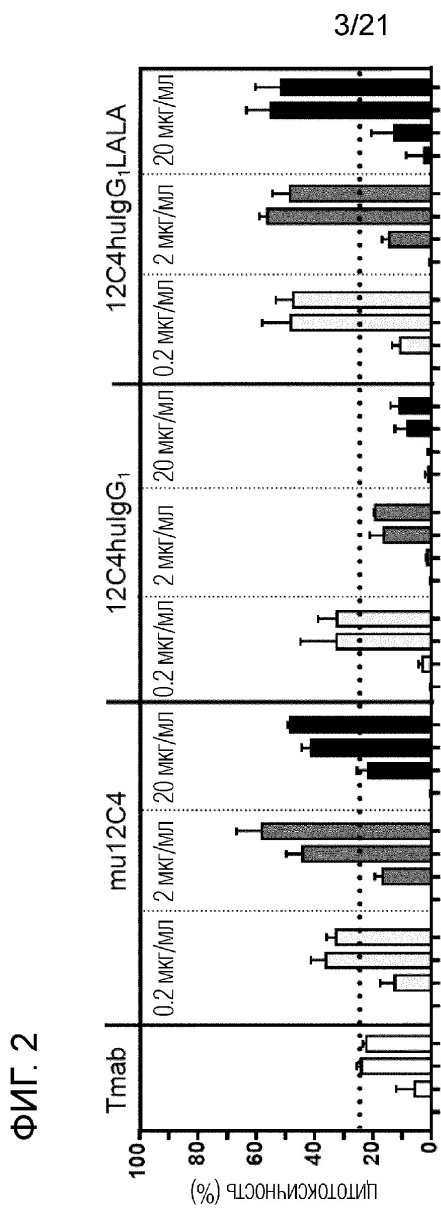
1/21



2

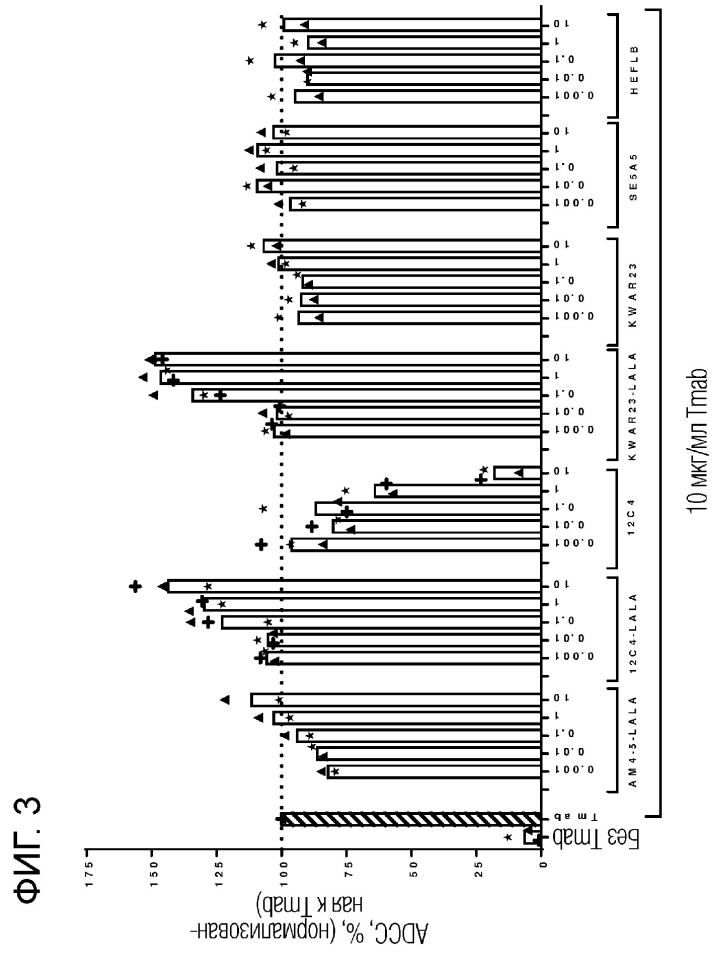
2/21



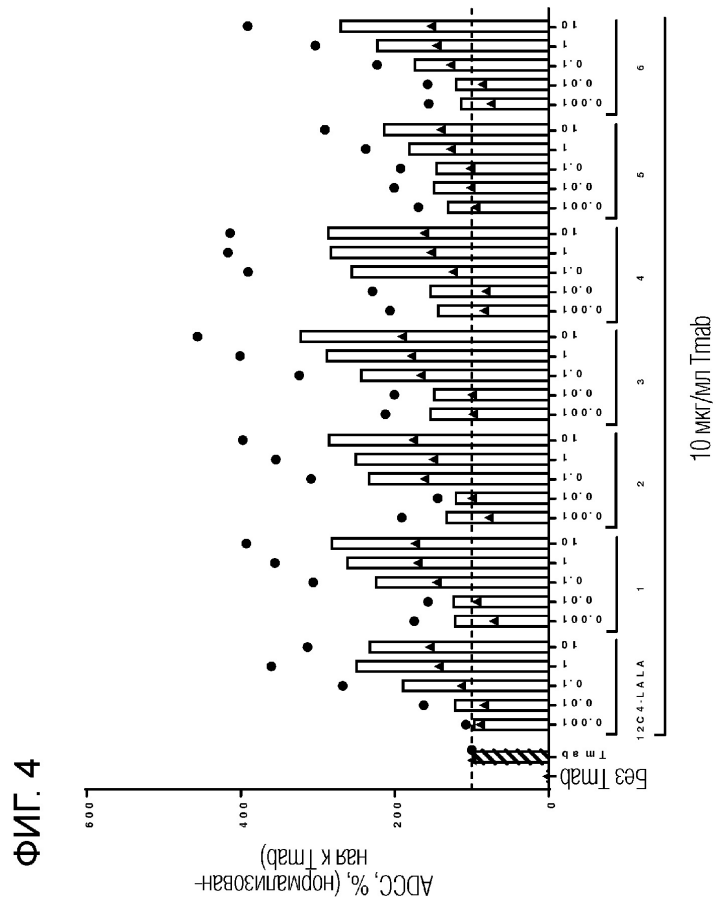


возрастающие концентрации трастузумаба слева направо (0, 0.05, 0.5 и 5 мкг/мл)

4/21

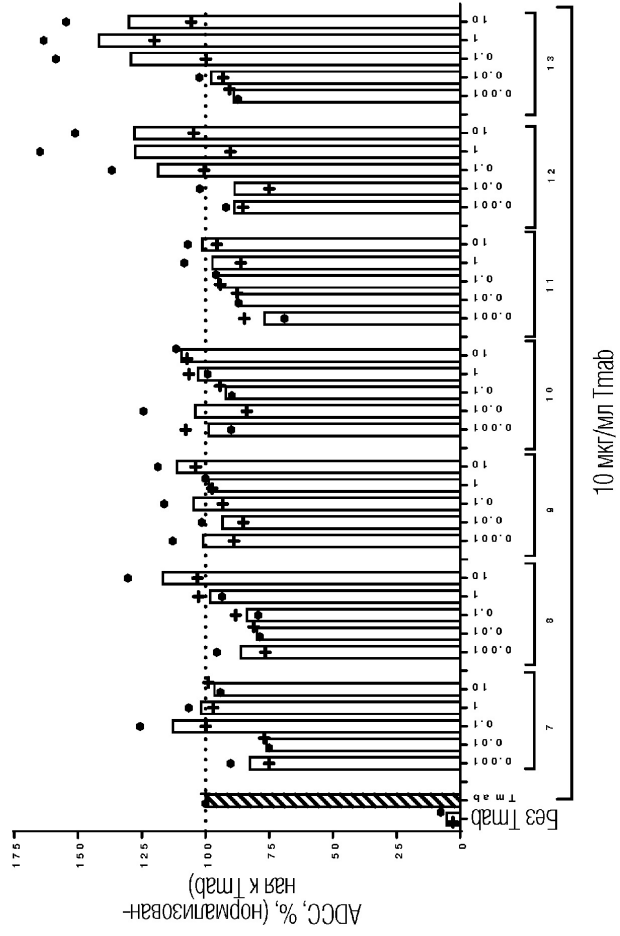


5/21

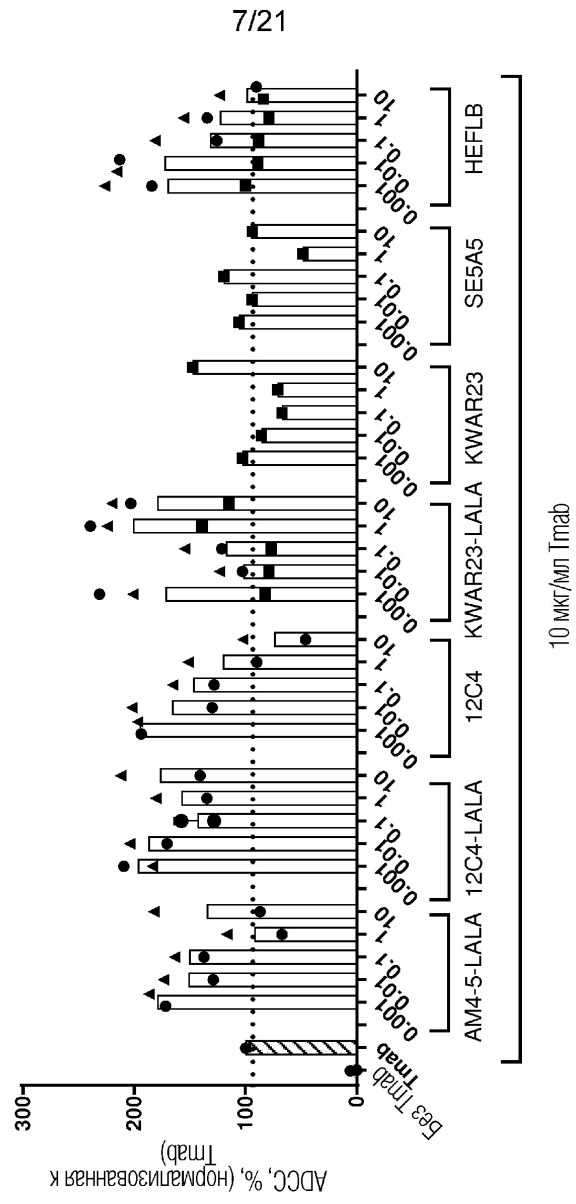


6/21

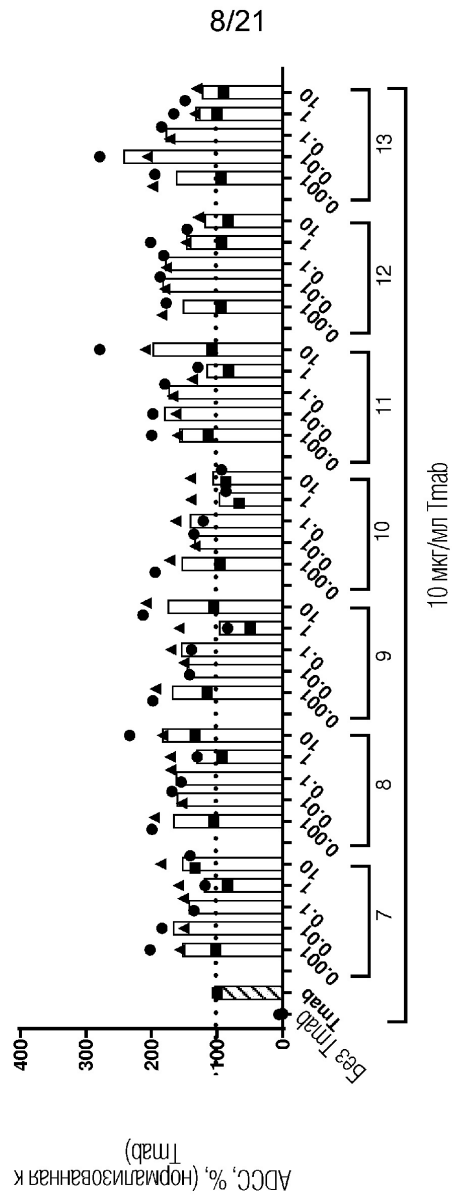
ФИГ. 5



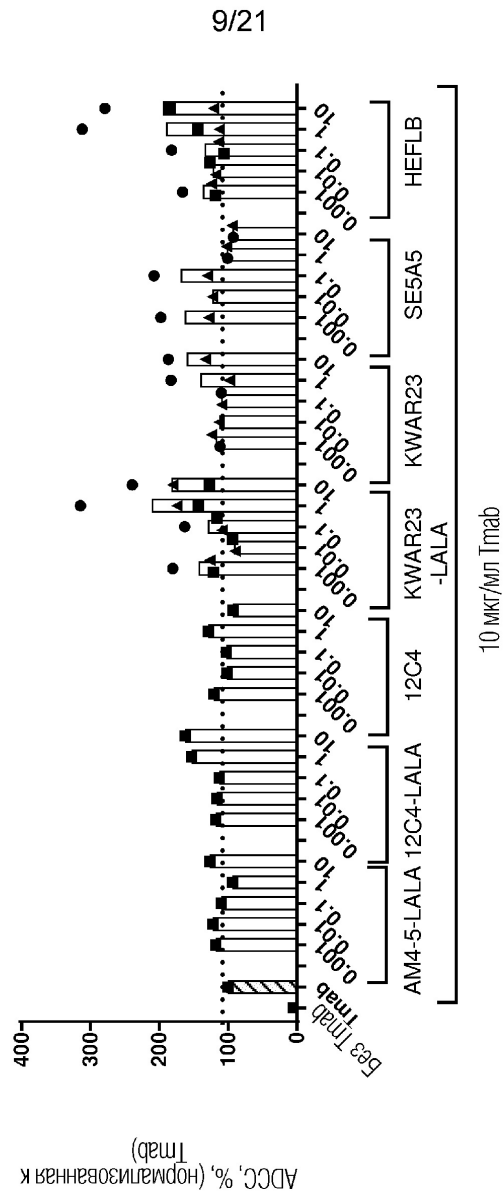
ФИГ. 6



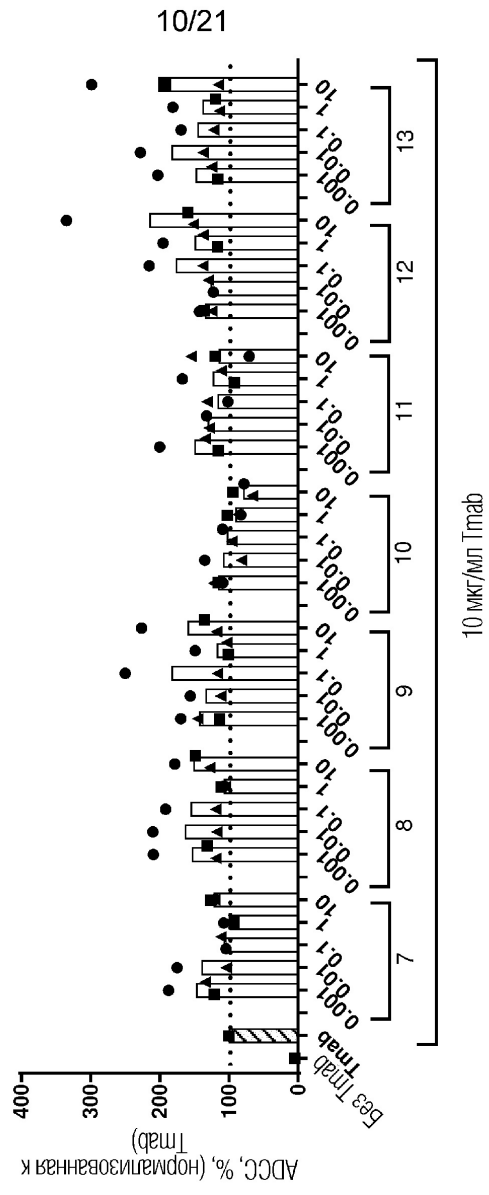
ФИГ. 7



ФИГ. 8

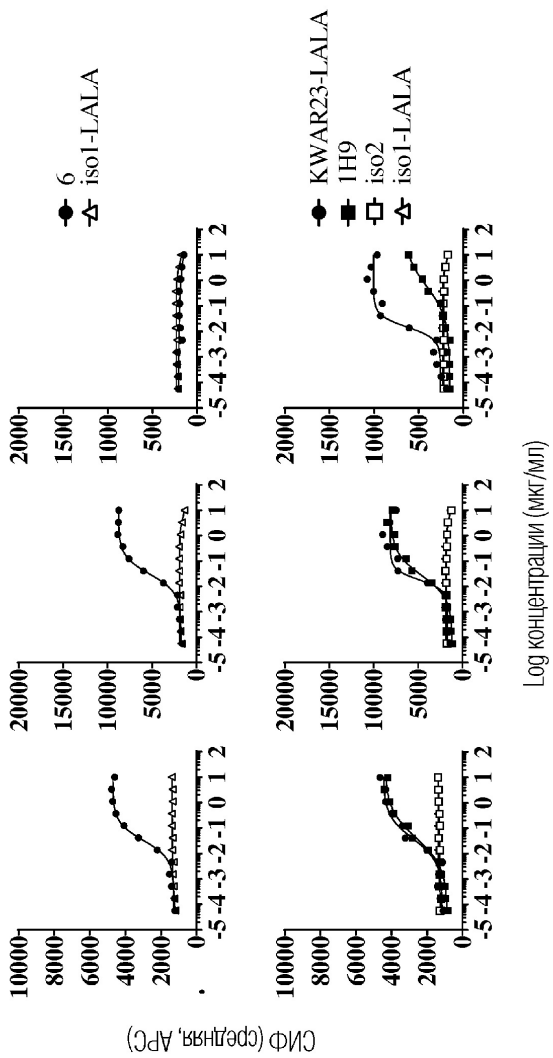


ФИГ. 9



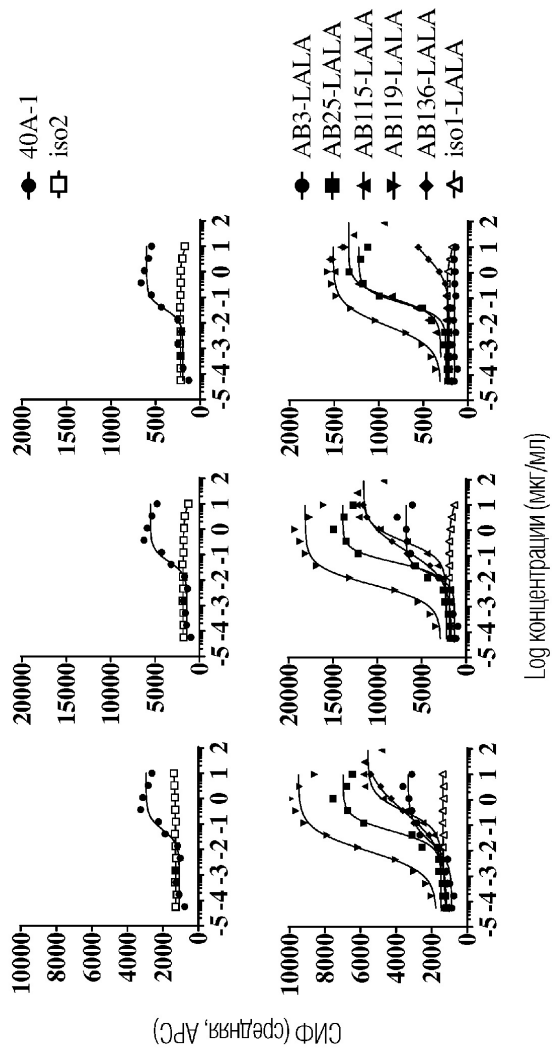
11/21

ФИГ. 10а



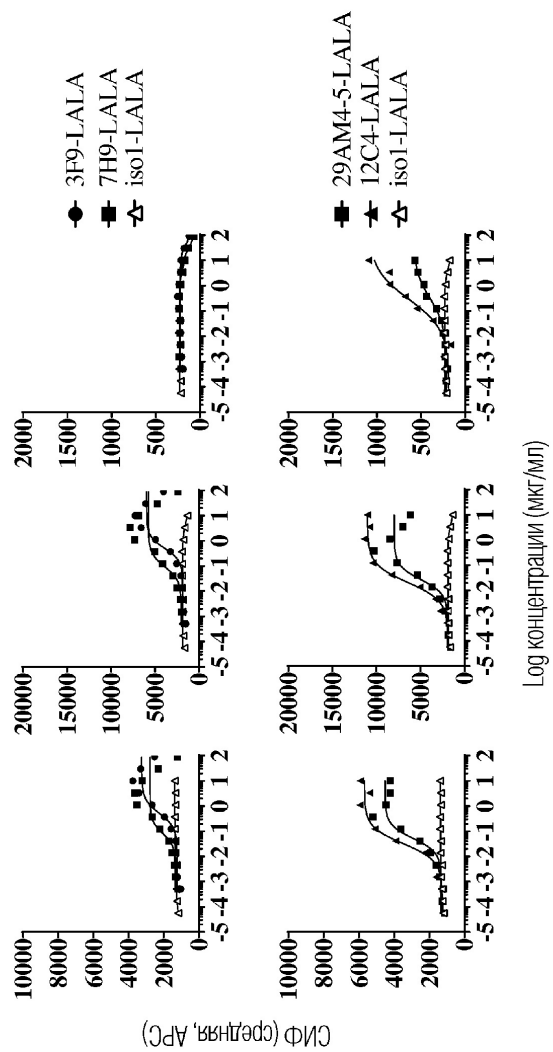
12/21

ФИГ. 10b



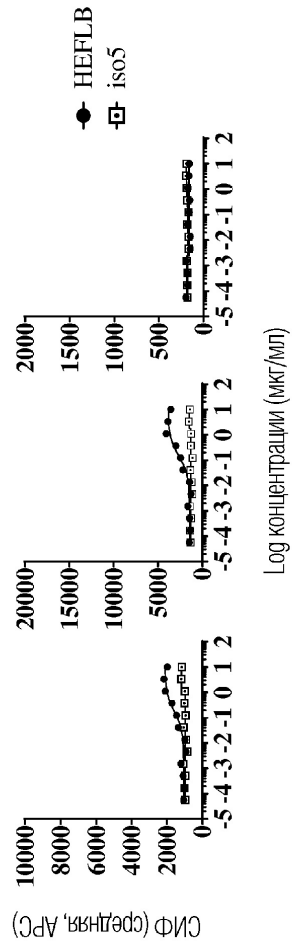
13/21

ФИГ. 10с



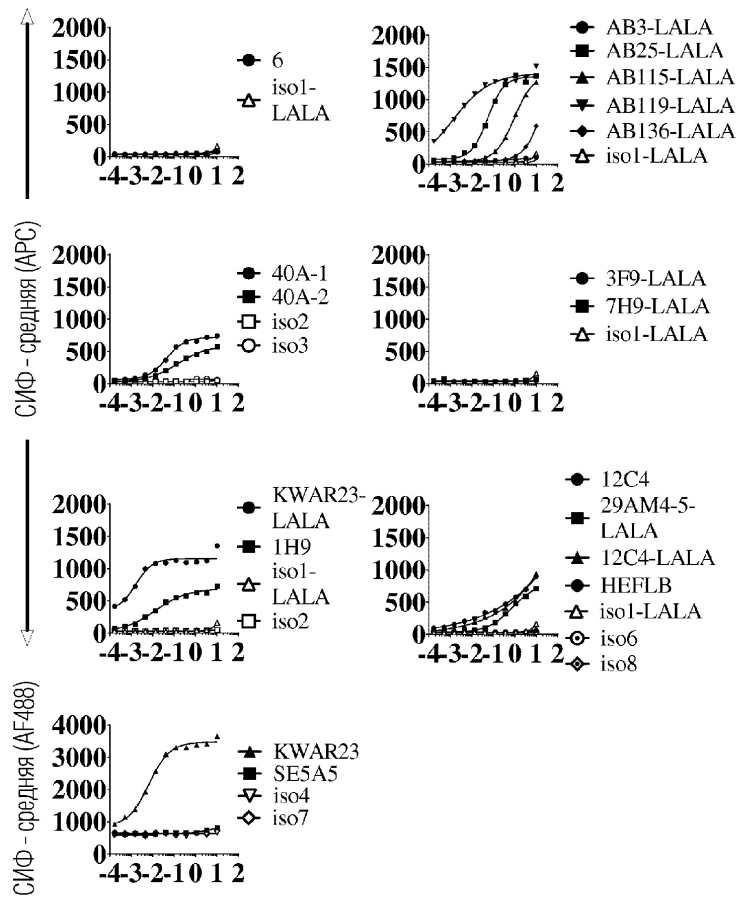
14/21

ФИГ. 10d



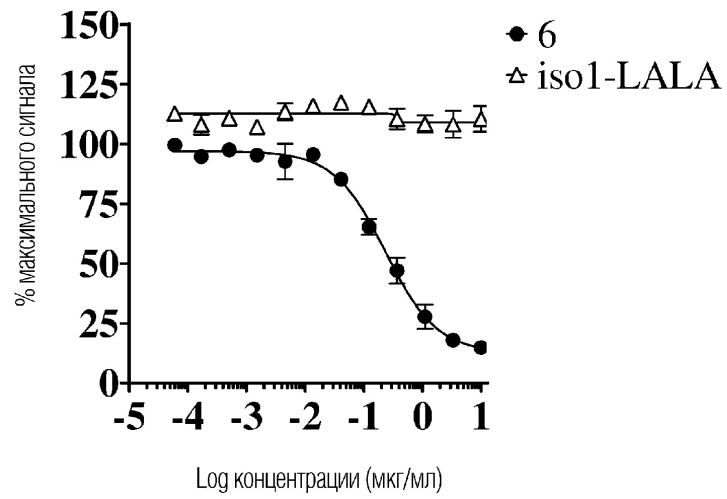
15/21

ФИГ. 11



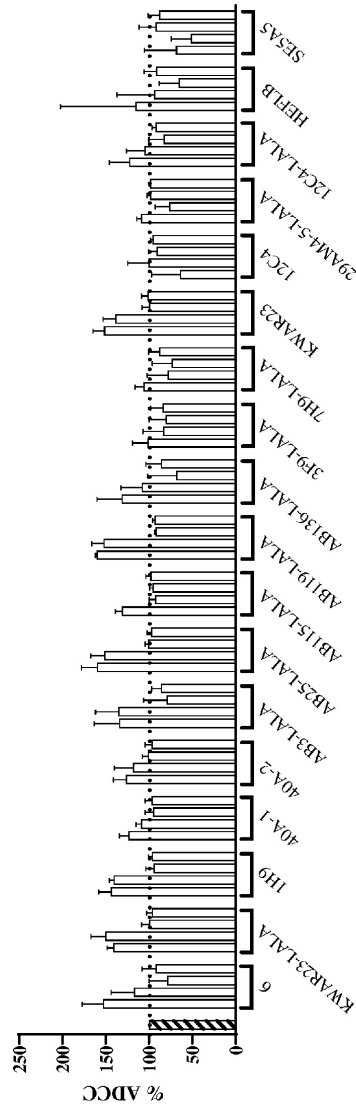
16/21

ФИГ. 12а



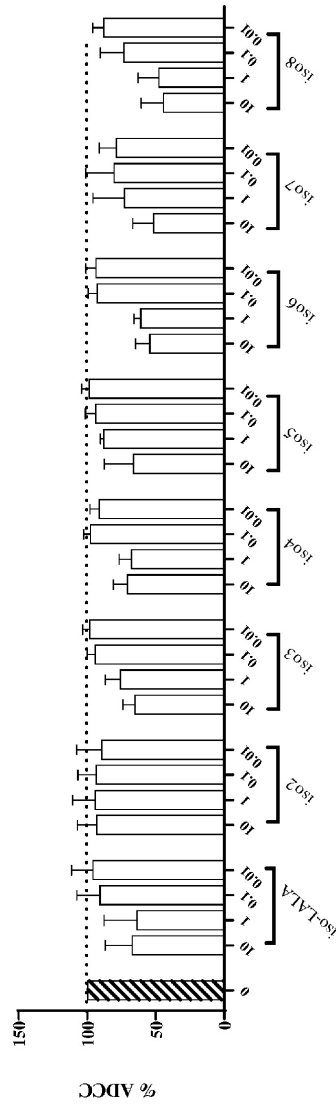
18/21

ФИГ. 13а

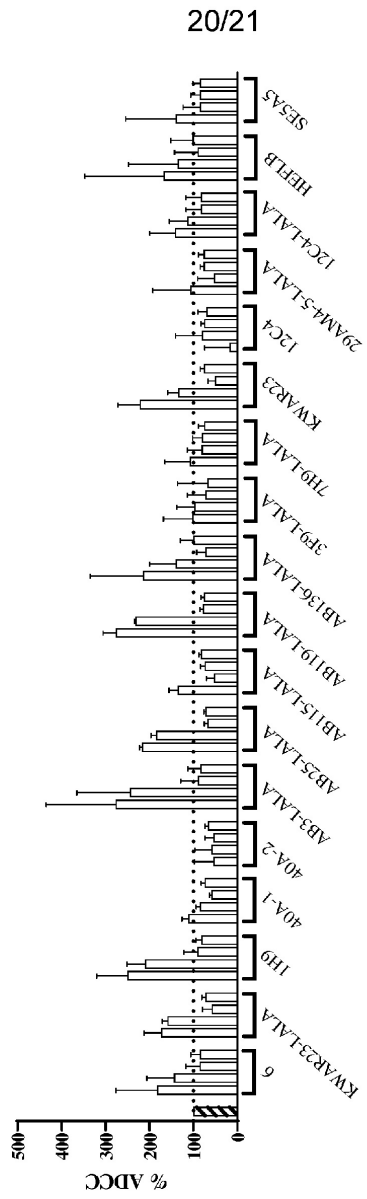


19/21

ФИГ. 13b



ФИГ. 14а



21/21

ФИГ. 14b

