

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034582**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.21

(21) Номер заявки
201691384

(22) Дата подачи заявки
2016.08.03

(51) Int. Cl. **C07K 14/705** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОНСТРУКЦИИ ВАРИАНТА SIRP-АЛЬФА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **104125902; 14/971,931; 62/202,772;
62/202,775; 62/202,779**

(32) **2015.08.10; 2015.12.16; 2015.08.07;
2015.08.07; 2015.08.07**

(33) **TW; US; US; US; US**

(43) **2017.02.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АЭлЭкс ОНКОЛОДЖИ ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Деминг Лаура, Гудман Кори, Понс
Хайме, Сим Бан Жанет, Врлийк
Мария (US)**

(74) Представитель:
**Строкова О.В., Угрюмов В.М.,
Карпенко О.Ю., Гизатуллина Е.М.
(RU)**

(56) **WO-A1-2013109752
EA-A1-201100947
US-A1-20140140926**

**LIN Yan et al. Soluble extracellular domains
of human SIRP α and CD47 expressed in Escherichia
coli enhances the phagocytosis of leukemia cells
by macrophages in vitro. Protein Expression and
Purification, 2012, 85, p. 109-116**

**US-A1-20100239579
US-A1-20140010810
US-A1-20140113348**

(57) Изобретение относится к композициям и способам получения конструкций варианта SIRP- α , включающих варианты SIRP- α . Конструкции варианта SIRP- α могут быть сконструированы различными способами для ответа на средовые факторы, такие как pH, гипоксия и/или присутствие опухоль-ассоциированных ферментов или опухоль-ассоциированных антигенов. Конструкции варианта SIRP- α могут быть использованы для лечения различных заболеваний, таких как рак, предпочтительно солидной опухоли или гематологической злокачественной опухоли.

B1**034582****034582****B1**

Уровень техники

Сигнальный регуляторный белок альфа (SIRP- α) представляет собой белок, широко экспрессирующийся на мембране миелоидных клеток. SIRP- α взаимодействует с CD47, белком, который широко экспрессируется на поверхности клеток разных типов в организме. Взаимодействие SIRP- α с CD47 предотвращает поглощение "собственных" клеток, которые в иных случаях могут быть распознаны иммунной системой. Впервые SIRP- α был открыт как связующее SHP-2 (домен SH-2, содержащий тирозинфосфатазу). Ранее CD47 характеризовался как сверхэкспрессированный антиген на поверхности клеток карциномы яичников.

В 2000 году в работе Oldenborg et al. было продемонстрировано, что введение CD47-дефицитных эритроцитов (RBC) в мышиную модель привело к быстрому клиренсу RBC из системы, подтверждая, что CD47 является "защитным" сигналом на некоторых поднаборах "собственных" клеток. В дальнейшем была дополнительно изучена потенциальная связь между SIRP- α и раком. Было обнаружено, что высокая экспрессия CD47 на опухолевых клетках при остром миелоцитарном лейкозе (AML) и некоторых солидных злокачественных опухолях служит отрицательным прогностическим фактором в отношении выживания. В качестве потенциальных противораковых терапий использовали стратегии, направленные на разрушение взаимодействия между CD47 и SIRP- α , например введение агентов, которые маскируют CD47 или SIRP- α .

Однако при рассмотрении этих терапевтических стратегий настораживает то, что SIRP- α может связываться с CD47 на поверхности клеток разных типов в организме человека. Таким образом, существует потребность в конструировании SIRP- α , который предпочтительно связывается с CD47 только на пораженных заболеванием клетках или на клетках в пораженном заболеванием участке.

Краткое описание изобретения

В изобретении предлагаются конструкции варианта сигнального регуляторного белка альфа (SIRP- α). Конструкции варианта SIRP- α включают варианты SIRP- α . В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α обладают предпочтительной активностью в пораженном заболеванием участке (например, в участке локализации опухоли, чем в непораженном заболеванием участке). В определенных вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α обладают более высокой аффинностью связывания с CD47 на пораженных заболеванием клетках (например, опухолевых клетках). В некоторых вариантах осуществления варианты SIRP- α связываются с более высокой аффинностью с CD47 в условиях кислого pH (например, pH менее чем около 7) и/или в условиях гипоксии, чем в физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления варианты SIRP- α содержат одну или несколько замен аминокислот на остатки гистидина или другие аминокислоты, которые обеспечивают возможность предпочтительного связывания конструкций варианта SIRP- α в пораженном заболеванием участке. В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α защищены от связывания с CD47 в непораженном заболеванием участке с помощью блокирующего пептида. В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α нацелены на пораженный заболеванием участок (например, опухоль) с помощью нацеливающего фрагмента (например, антитела, направленного на опухоль-ассоциированный антиген или антигенсвязывающий пептид). В изобретении также предлагаются способы и фармацевтические композиции, содержащие конструкции варианта SIRP- α , для лечения различных заболеваний, таких как рак, предпочтительно солидных опухолей и гематологических злокачественных опухолей.

В одном аспекте в изобретении предлагается конструкция варианта сигнального регуляторного белка альфа (SIRP- α), при этом конструкция варианта SIRP- α предпочтительно связывается с CD47 на пораженных заболеванием клетках или в пораженном заболеванием участке, чем на непораженных заболеванием клетках. В некоторых вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α связывается с CD47 на пораженных заболеванием клетках или в пораженном заболеванием участке с более высокой аффинностью, чем она связывается с CD47 на непораженных заболеванием клетках.

В некоторых вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α включает вариант SIRP- α , присоединенный к блокирующему пептиду. В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид связывается с более высокой аффинностью с SIRP- α дикого типа, чем с вариантом SIRP- α . В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α связывается с более высокой аффинностью с CD47 дикого типа, чем с блокирующим пептидом.

В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид представляет собой блокирующий пептид на основе CD47. В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид на основе CD47 включает часть, которая имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности IgSF-домена CD47 дикого типа (SEQ ID NO: 35) или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид на основе CD47 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38 или 40.

В настоящем документе предлагаются конструкции варианта SIRP- α , содержащие вариант SIRP- α , описанный здесь, при этом указанный вариант SIRP- α присоединен к блокирующему пептиду, описан-

ному здесь, с помощью по меньшей мере одного линкера (например, расщепляемого линкера). В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α может содержать такой же участок связывания с CD47, как SIRP- α дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α может содержать одну или несколько мутаций или вставок по сравнению с SIRP- α дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α может представлять собой усеченную форму SIRP- α дикого типа. В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид может представлять собой миметик CD47, вариант или фрагмент, описанный здесь. В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид может проявлять более высокую аффинность в отношении SIRP- α дикого типа по сравнению с вариантом SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α . В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид может представлять собой полипептид варианта CD47, который демонстрирует более низкую аффинность в отношении варианта SIRP- α по сравнению с CD47 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления линкер между вариантом SIRP- α и блокирующим пептидом может представлять собой по меньшей мере один линкер, который необязательно расщепляется одной или несколькими протеазами. В некоторых вариантах осуществления линкер необязательно также содержит один или несколько спейсеров.

В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α присоединен к блокирующему пептиду посредством расщепляемого линкера и необязательно одного или нескольких спейсеров. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер расщепляется в условиях кислого pH и/или гипоксии. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер расщепляется опухоль-ассоциированным ферментом. В некоторых вариантах осуществления опухоль-ассоциированный фермент представляет собой протеазу. В некоторых вариантах осуществления протеаза выбрана из группы, состоящей из матрипазы (MTSP1), активатора плазминогена урокиназного типа (uPA), легумаина, PSA (также называемого KLK3, калликреин-связанная пептидаза-3), матриксной металлопротеиназы-2 (MMP-2), MMP9, человеческой нейтрофильной эластазы (HNE) и протеиназы 3 (Pr3). В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой матрипазу. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер имеет последовательность LSGRSDNH (SEQ ID NO: 47) или любую из последовательностей, перечисленных в табл. 7. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает одну или комбинацию следующих последовательностей (см., например, табл. 7):

PRFKIIGG, PRFRIIGG, SSRHRRALD, RKSSIIIRMRDVVL, SSSFDKGGKYKKGDDA, SSSFDKGGKYKRGDDA, IEGR, IDGR, GGSIDGR, PLGLWA, GPLGIAGI, GPEGLRVG, YGAGLGVV, AGLGVVER, AGLGISST, DVAQFVLT, VAQFVLTE, AQFVLTEG, PVQPIGPQ, L/S/G/R--/S-/D/N/H, -/s/gs/Rk-/rv/-/-/, SGR-SA, L/S/G/R--/S-/D/N/H, r/-/-/Rk-/v/-/-/g/-, RQAR-VV, r/-/-/Rk/v/-/-/g, /Kr/RKQ/gAS/RK/A, L/S/G/R-/S-/D/N/H, -/-/-/N/-/-/-, AAN-L, ATN-L, si/sq/-/yqrs/s/-/-, S/S/K/L/Q, -/p/-/-/li/-/-/-, g/pa/-/gl/-/g/-, G/P/L/G/I/A/G/Q, P/V/G/L/I/G, H/P/V/G/L/L/A/R, -/-/-/viat/-/-/- и -/y/y/vta -/-/-/-,

где "-" означает любую аминокислоту (т.е. любую природную аминокислоту), прописные буквы обозначают сильное предпочтение этой аминокислоте, строчные буквы обозначают незначительное предпочтение этой аминокислоте и "/" отделяет положения аминокислот в случаях, когда возможно более одной аминокислоты в положении, соседнем с "/".

В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α присоединен к антитело-связывающему пептиду. В некоторых вариантах осуществления антитело-связывающий пептид связывается с константной областью антитела обратимо или необратимо. В некоторых вариантах осуществления антитело-связывающий пептид связывается с антигенсвязывающим фрагментом антитела (Fab) обратимо или необратимо. В некоторых вариантах осуществления антитело-связывающий пептид связывается с вариабельной областью антитела обратимо или необратимо. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой цетуксимаб. В некоторых вариантах осуществления антитело-связывающий пептид имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична последовательности пептида, локализованного в участке заболевания (DLP) (CQFDLSTRRLKC (SEQ ID NO: 64) или CQYNLSS-RALKC (SEQ ID NO: 65)), или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления антитело-связывающий пептид имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64.

В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α присоединен к мономеру Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α присоединен к человеческому сывороточному альбумину (HSA). В некоторых вариантах осуществления HSA включает аминокислотное замещение C34S и/или K573P относительно SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления HSA имеет последовательность

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLV
RPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADK
AACLLPKLDELDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS
KLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAE
VENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRL
AKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQGEYKFQNALL
VRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK
TPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ
TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKCKADDKETCF AEEGKKLV AASQAAL
GL (SEQ ID NO: 68).

В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α присоединен к альбумин-связывающему пептиду. В некоторых вариантах осуществления альбумин-связывающий пептид имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α присоединен к полимеру, при этом полимер представляет собой цепь полиэтиленгликоля (PEG) или цепь полисиаловой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α присоединен к антителу. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой опухоль-специфическое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело (например, опухоль-специфическое антитело) выбрано из группы, состоящей из цетуксимаба, пембролизумаба, ниволумаба, пидилизумаба, MEDI0680, MEDI6469, ипилимумаба, тремелизумаба, урелумаба, вантуктумаба, варлилумаба, могамализумаба, анти-CD20 антитела, анти-CD19 антитела, анти-CS1 антитела, герцептина, трастузумаба и пертузумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело (например, опухоль-специфическое антитело) может связываться с одним или более из следующего: 5T4, AGS-16, ALK1, ANG-2, B7-H3, B7-H4, c-fms, c-Met, CA6, CD123, CD19, CD20, CD22, EpCAM, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD70, CD74, CD79b, CD98, CEA, CEACAM5, CLDN18.2, CLDN6, CS1, CXCR4, DLL-4, EGFR, EGP-1, ENPP3, EphA3, ETBR, FGFR2, фибронектин, FR-альфа, GCC, GD2, глипикан-3, GPNMB, HER-2, HER3, HLA-DR, ICAM-1, IGF-1R, IL-3R, LIV-1, мезотелин, MUC16, MUC1, NaPi2b, нектин-4, Notch 2, Notch 1, PD-L1, PD-L2, PDGFR- α , PS, PSMA, SLITRK6, STEAP1, TEM1, VEGFR, CD25, CD27L, DKK-1 и/или CSF-1R.

В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α имеет последовательность, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична последовательности любой из SEQ ID NO: 3-12 и 24-34.

В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α имеет последовательность:

EEEX₁QX₂IQPDKSVLVAAGETX₃TLRCTX₄TS LX₅PVGPIQWFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈G
X₉FPRVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFSIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYXCX₁₄KX₁₅RKGSPDDVEX₁₆KS

GAGTELSVRAKPS (SEQ ID NO: 13),

в которой X₁ представляет собой L, I или V;

X₂ представляет собой V, L или I;

X₃ представляет собой A или V;

X₄ представляет собой A, I или L;

X₅ представляет собой I, T, S или F;

X₆ представляет собой E, V или L;

X₇ представляет собой K или R;

X₈ представляет собой E или Q;

X₉ представляет собой H, P или R;

X₁₀ представляет собой L, T или G;

X₁₁ представляет собой K или R;

X₁₂ представляет собой N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y;

X₁₃ представляет собой P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y;

X₁₄ представляет собой V или I;

X₁₅ представляет собой F, L или V;

X₁₆ представляет собой F или V.

В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α имеет последовательность:

EEGX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILHCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈G

X₉FPRVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFSIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYX₁₄KX₁₅RKGSPPDDVEX₁₆KS

GAGTELSVRAKPS (SEQ ID NO: 16),

в которой X₁ представляет собой L, I или V;

X₂ представляет собой V, L или I;

X₃ представляет собой A или V;

X₄ представляет собой A, I или L;

X₅ представляет собой I, T, S или F;

X₆ представляет собой E, V или L;

X₇ представляет собой K или R;

X₈ представляет собой E или Q;

X₉ представляет собой H, P или R;

X₁₀ представляет собой L, T или G;

X₁₁ представляет собой K или R;

X₁₂ представляет собой N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y;

X₁₃ представляет собой P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y;

X₁₄ представляет собой V или I;

X₁₅ представляет собой F, L или V;

X₁₆ представляет собой F или V.

В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α имеет последовательность:

EEEX₁QX₂IQPDKFVLVAAGETX₃TLRCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈G

X₉FPRVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFSIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYX₁₄KX₁₅RKGSPPDDVEX₁₆KS

GAGTELSVRAKPS (SEQ ID NO: 17),

в которой X₁ представляет собой L, I или V;

X₂ представляет собой V, L или I;

X₃ представляет собой A или V;

X₄ представляет собой A, I или L;

X₅ представляет собой I, T, S или F;

X₆ представляет собой E, V или L;

X₇ представляет собой K или R;

X₈ представляет собой E или Q;

X₉ представляет собой H, P или R;

X₁₀ представляет собой L, T или G;

X₁₁ представляет собой K или R;

X₁₂ представляет собой N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y;

X₁₃ представляет собой P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y;

X₁₄ представляет собой V или I;

X₁₅ представляет собой F, L или V;

X₁₆ представляет собой F или V.

В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α имеет последовательность:

EEEX₁QX₂IQPDKSVLVAAGETX₃TLRCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈G

X₉FPRVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFPIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYX₁₄KX₁₅RKGSPPDDVEX₁₆KS

GAGTELSVRAKPS (SEQ ID NO: 18),

в которой X₁ представляет собой L, I или V;

X₂ представляет собой V, L или I;

X₃ представляет собой A или V;

X₄ представляет собой A, I или L;

X₅ представляет собой I, T, S или F;

X₆ представляет собой E, V или L;

X₇ представляет собой K или R;

X₈ представляет собой E или Q;

X₉ представляет собой H, P или R;

X₁₀ представляет собой L, T или G;

X₁₁ представляет собой K или R;

X₁₂ представляет собой N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y;

X₁₃ представляет собой P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y;

X₁₄ представляет собой V или I;
 X₁₅ представляет собой F, L или V;
 X₁₆ представляет собой F или V.

В некоторых вариантах осуществления вариант S1RP-α в конструкции варианта S1RP-α имеет последовательность:

EEEX₁QX₂IQPDKSVLVAAGETX₃TLRCTX₄TS LX₅PVGPIQWFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈G
 X₉FPRVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFSIRISX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDDVEX₁₆KS

GAGTELSVRAKPS (SEQ ID NO: 21),

в которой X₁ представляет собой L, I или V;

X₂ представляет собой V, L или I;
 X₃ представляет собой A или V;
 X₄ представляет собой A, I или L;
 X₅ представляет собой I, T, S или F;
 X₆ представляет собой E, V или L;
 X₇ представляет собой K или R;
 X₈ представляет собой E или Q;
 X₉ представляет собой H, P или R;
 X₁₀ представляет собой L, T или G;
 X₁₁ представляет собой K или R;
 X₁₂ представляет собой N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y;
 X₁₃ представляет собой P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y;
 X₁₄ представляет собой V или I;
 X₁₅ представляет собой F, L или V;
 X₁₆ представляет собой F или V.

В некоторых вариантах осуществления вариант S1RP-α в конструкции варианта S1RP-α имеет последовательность:

EEEX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILHCTX₄TS LX₅PVGPIQWFRGAGPARX₆LIYNQX₇X₈G
 X₉FPRVTTVSEX₁₀TX₁₁RENMDFSISISX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDTEX₁₆KSGA

GTELSVRAKPS (SEQ ID NO: 14),

в которой X₁ представляет собой L, I или V;

X₂ представляет собой V, L или I;
 X₃ представляет собой A или V;
 X₄ представляет собой V, I или L;
 X₅ представляет собой I, T, S или F;
 X₆ представляет собой E, V или L;
 X₇ представляет собой K или R;
 X₈ представляет собой E или Q;
 X₉ представляет собой H, P или R;
 X₁₀ представляет собой S, T или G;
 X₁₁ представляет собой K или R;
 X₁₂ представляет собой N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y;
 X₁₃ представляет собой P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y;
 X₁₄ представляет собой V или I;
 X₁₅ представляет собой F, L или V;
 X₁₆ представляет собой F или V.

В некоторых вариантах осуществления вариант S1RP-α в конструкции варианта S1RP-α имеет последовательность:

EEEX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILLCTX₄TS LX₅PVGPIQWFRGAGPARX₆LIYNQX₇X₈G
 X₉FPRVTTVSEX₁₀TX₁₁RENMDFSISISX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDTEX₁₆KSGA

GTELSVRAKPS (SEQ ID NO: 15),

в которой X₁ представляет собой L, I или V;

X₂ представляет собой V, L или I;
 X₃ представляет собой A или V;
 X₄ представляет собой V, I или L;
 X₅ представляет собой I, T, S или F;
 X₆ представляет собой E, V или L;
 X₇ представляет собой K или R;
 X₈ представляет собой E или Q;
 X₉ представляет собой H, P или R;
 X₁₀ представляет собой S, T или G;

X_{11} представляет собой К или R;
 X_{12} представляет собой N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y;
 X_{13} представляет собой P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y;
 X_{14} представляет собой V или I;
 X_{15} представляет собой F, L или V;
 X_{16} представляет собой F или V.

В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α имеет последовательность:

EEEX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILHCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPARX₆LIYNQX₇X₈G

X₉FPRVTTVSEX₁₀TX₁₁RENMDFSISISX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDTEX₁₆KSGA

GTELSVRGKPS (SEQ ID NO: 19),

в которой X_1 представляет собой L, I или V;

X_2 представляет собой V, L или I;

X_3 представляет собой A или V;

X_4 представляет собой V, I или L;

X_5 представляет собой I, T, S или F;

X_6 представляет собой E, V или L;

X_7 представляет собой К или R;

X_8 представляет собой E или Q;

X_9 представляет собой H, P или R;

X_{10} представляет собой S, T или G;

X_{11} представляет собой К или R;

X_{12} представляет собой N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y;

X_{13} представляет собой P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y;

X_{14} представляет собой V или I;

X_{15} представляет собой F, L или V;

X_{16} представляет собой F или V.

В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α имеет последовательность:

EEEX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILHCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPARX₆LIYNQX₇X₈G

X₉FPRVTTVSEX₁₀TX₁₁RENMDFSISISX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDTEX₁₆KSGA

GTELSVRAKPS (SEQ ID NO: 22),

в которой X_1 представляет собой L, I или V;

X_2 представляет собой V, L или I;

X_3 представляет собой A или V;

X_4 представляет собой V, I или L;

X_5 представляет собой I, T, S или F;

X_6 представляет собой E, V или L;

X_7 представляет собой К или R;

X_8 представляет собой E или Q;

X_9 представляет собой H, P или R;

X_{10} представляет собой S, T или G;

X_{11} представляет собой К или R;

X_{12} представляет собой N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y;

X_{13} представляет собой P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y;

X_{14} представляет собой V или I;

X_{15} представляет собой F, L или V;

X_{16} представляет собой F или V.

В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α имеет последовательность:

EEEX₁QX₂IQPDKSVLVAAGETX₃TLRCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPARX₆LIYNQX₇X₈G

X₉FPRVTTVSEX₁₀TX₁₁RENMDFSISISX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄KX₁₅RKGSPDTEX₁₆KSGA

GTELSVRAKPS (SEQ ID NO: 20),

в которой X_1 представляет собой L, I или V;

X_2 представляет собой V, L или I;

X_3 представляет собой A или V;

X_4 представляет собой A, I или L;

X_5 представляет собой I, T, S или F;

X_6 представляет собой E, V или L;

X_7 представляет собой К или R;

X_8 представляет собой E или Q;
 X_9 представляет собой H, P или R;
 X_{10} представляет собой S, T или G;
 X_{11} представляет собой K или R;
 X_{12} представляет собой N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y;
 X_{13} представляет собой P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y;
 X_{14} представляет собой V или I;
 X_{15} представляет собой F, L или V;
 X_{16} представляет собой F или V.

В некоторых вариантах осуществления вариант S1RP- α в конструкции варианта S1RP- α имеет последовательность:

EEEX₁X₂QX₃IQPDKX₄VX₅VAAGEX₆X₇X₈LX₉CTX₁₀TSLX₁₁PVGPIQWFRGAGPX₁₂RX₁₃LIY

NQX₁₄X₁₅GX₁₆FPRVTTVSX₁₇X₁₈TX₁₉RX₂₀NMDFX₂₁IX₂₂IX₂₃X₂₄ITX₂₅ADAGTYCYCX₂₆KX₂₇

RGKSPDX₂₈X₂₉EX₃₀KSGAGTELSVRX₃₁KPS (SEQ ID NO: 23),

в которой X_1 представляет собой E или G;

X_2 представляет собой L, I или V;
 X_3 представляет собой V, L или I;
 X_4 представляет собой S или F;
 X_5 представляет собой L или S;
 X_6 представляет собой S или T;
 X_7 представляет собой A или V;
 X_8 представляет собой I или T;
 X_9 представляет собой H или R;
 X_{10} представляет собой A, V, I или L;
 X_{11} представляет собой I, T, S или F;
 X_{12} представляет собой A или G;
 X_{13} представляет собой E, V или L;
 X_{14} представляет собой K или R;
 X_{15} представляет собой E или Q;
 X_{16} представляет собой H, P или R;
 X_{17} представляет собой D или E;
 X_{18} представляет собой S, L, T или G;
 X_{19} представляет собой K или R;
 X_{20} представляет собой E или N;
 X_{21} представляет собой S или P;
 X_{22} представляет собой S или R;
 X_{23} представляет собой S или G;
 X_{24} представляет собой N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y;
 X_{25} представляет собой P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y;
 X_{26} представляет собой V или I;
 X_{27} представляет собой F, L, V;
 X_{28} представляет собой D или отсутствует;
 X_{29} представляет собой T или V;
 X_{30} представляет собой F или V;
 X_{31} представляет собой A или G.

В некоторых вариантах осуществления вариант S1RP- α в конструкции варианта S1RP- α имеет последовательность, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 13-23.

В некоторых вариантах осуществления вариант S1RP- α в конструкции варианта S1RP- α не включает последовательность любой из SEQ ID NO: 3-12 и 24-34.

В некоторых вариантах осуществления вариант S1RP- α в конструкции варианта S1RP- α включает одну или несколько замен аминокислотных остатков на остатки гистидина. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько замен аминокислотных остатков на остатки гистидина расположены в одном или нескольких из следующих аминокислотных положений: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 52, 53, 54, 66, 67, 68, 69, 74, 93, 96, 97, 98, 100, 4, 6, 27, 36, 39, 47, 48, 49, 50, 57, 60, 72, 74, 76, 92, 94, 103 относительно последовательности любой из SEQ ID NO: 3-12.

В некоторых вариантах осуществления конструкция варианта S1RP- α связывается с CD47 с по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в четыре раза или по меньшей мере в шесть раз более высокой аффинностью на пораженных заболеванием клетках или в пораженном заболеванием участке, чем на непораженных заболеванием клетках.

В некоторых вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α связывается с CD47 с по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в четыре раза или по меньшей мере в шесть раз более высокой аффинностью в условиях кислого pH, чем в условиях нейтрального pH.

В некоторых вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α связывается с CD47 с по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в четыре раза или по меньшей мере в шесть раз более высокой аффинностью в условиях гипоксии, чем в физиологических условиях.

В некоторых вариантах осуществления пораженные заболеванием клетки представляют собой раковые клетки ракового заболевания.

В некоторых вариантах осуществления кислое значение pH представляет собой pH в диапазоне примерно от 4 до 7.

В другом аспекте в изобретении предлагается молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая описанную здесь конструкцию варианта SIRP- α .

В другом аспекте в изобретении предлагается вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую описанную здесь конструкцию варианта SIRP- α .

В другом аспекте в изобретении предлагается клетка-хозяин, которая экспрессирует конструкцию варианта SIRP- α , описанную здесь, при этом клетка-хозяин включает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую описанную здесь конструкцию варианта SIRP- α , или вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, при этом молекула нуклеиновой кислоты или вектор экспрессируется в клетке-хозяине.

В другом аспекте в изобретении предлагается способ получения описанной здесь конструкции варианта SIRP- α , при этом способ включает а) обеспечение клетки-хозяина, включающей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую описанную здесь конструкцию варианта SIRP- α , или вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты; б) экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты или вектора в клетке-хозяине в условиях, которые обеспечивают возможность формирования конструкции варианта SIRP- α ; и с) извлечение конструкции варианта SIRP- α .

В другом аспекте в изобретении предлагается фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество описанной здесь конструкции варианта SIRP- α . В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает один или несколько фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных веществ.

В другом аспекте в изобретении предлагается способ увеличения фагоцитоза клетки-мишени у субъекта, включающий введение субъекту описанной здесь конструкции варианта SIRP- α или фармацевтической композиции, включающей терапевтически эффективное количество описанной здесь конструкции варианта SIRP- α . В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой раковую клетку.

В другом аспекте в изобретении предлагается способ выведения регуляторных Т-клеток у субъекта, включающий введение субъекту описанной здесь конструкции варианта SIRP- α или фармацевтической композиции, включающей терапевтическое количество описанной здесь конструкции варианта SIRP- α .

В другом аспекте в изобретении предлагается способ уничтожения раковых клеток, при этом способ включает контактирование раковой клетки с описанной здесь конструкцией варианта SIRP- α или фармацевтической композицией, включающей терапевтически эффективное количество описанной здесь конструкции варианта SIRP- α .

В другом аспекте в изобретении предлагается способ лечения заболевания, связанного с активностью SIRP- α и/или CD47 у субъекта, при этом способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества описанной здесь конструкции варианта SIRP- α или фармацевтической композиции, включающей терапевтически эффективное количество описанной здесь конструкции варианта SIRP- α .

В другом аспекте в изобретении предлагается способ лечения заболевания, связанного с активностью SIRP- α и/или CD47 у субъекта, при этом способ включает (а) определение аминокислотных последовательностей SIRP- α субъекта и (б) введение субъекту терапевтически эффективного количества описанной здесь конструкции варианта SIRP- α ; при этом вариант SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α имеет такую же аминокислотную последовательность, как аминокислотная последовательность SIRP- α субъекта.

В другом аспекте в изобретении предлагается способ лечения заболевания, связанного с активностью SIRP- α и/или CD47 у субъекта, при этом способ включает (а) определение аминокислотных последовательностей SIRP- α субъекта и (б) введение субъекту терапевтически эффективного количества описанной здесь конструкции варианта SIRP- α ; при этом вариант SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α обладает минимальной иммуногенностью у субъекта.

В другом аспекте в изобретении предлагается способ лечения заболевания, связанного с активностью SIRP- α и/или CD47 у субъекта, при этом способ включает введение субъекту описанной здесь конструкции варианта SIRP- α , при этом конструкция варианта SIRP- α предпочтительно связывается с CD47

на пораженных заболеванием клетках или в пораженном заболеванием участке, чем с CD47 на непораженных заболеванием клетках.

В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из рака с солидной опухолью, гематологической злокачественной опухоли, острого миелоцитарного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, неходжкинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, множественной миеломы, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака эндометрия, рака легких, рака бронхов, рака печени, рака яичников, рака толстой и прямой кишки, рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта, рака желчного пузыря, рака с гастроинтестинальной стромальной опухолью, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, рака ротоглотки, рака пищевода, меланомы, немеланомного рака кожи, карциномы из клеток Меркеля, индуцированного вирусами рака, нейробластомы, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака почки, почечно-клеточного рака, рака почечной лоханки, лейкоза, лимфомы, саркомы, глиомы, опухоли головного мозга и карциномы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гематологическую злокачественную опухоль.

В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой иммунологическое заболевание. В некоторых вариантах осуществления иммунологическое заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание или воспалительное заболевание. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание или воспалительное заболевание представляет собой множественный склероз, ревматоидный артрит, спондилоартропатию, системную красную волчанку, опосредованное антителом воспалительное или аутоиммунное заболевание, реакцию трансплантат против хозяина, сепсис, диабет, псориаз, атеросклероз, синдром Шегрена, прогрессирующий системный склероз, склеродермию, острый коронарный синдром, ишемию-реперфузию, болезнь Крона, эндометриоз, гломерулонефрит, миастению гравис, идиопатический легочный фиброз, астму, синдром острой дыхательной недостаточности (ARDS), васкулит или воспалительный аутоиммунный миозит.

В другом аспекте в изобретении предлагается способ улучшения приживления гематopoэтических стволовых клеток у субъекта, включающий модулирование взаимодействия между SIRP- α и CD47 у субъекта путем введения субъекту варианта SIRP- α , описанного здесь, или фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество описанного здесь варианта SIRP- α .

В другом аспекте в изобретении предлагается способ изменения иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту описанной здесь конструкции варианта SIRP- α или фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество описанной здесь конструкции варианта SIRP- α , изменяя тем самым иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ включает подавление иммунного ответа.

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно млекопитающее представляет собой человека.

Определения

Используемый здесь термин "пораженные заболеванием клетки" и "пораженная заболеванием ткань" относится, например, к злокачественным клеткам и ткани. В частности, рак может представлять собой солидную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль. Например, если рак представляет собой солидную опухоль, пораженные заболеванием клетки представляют собой клетки солидной опухоли. Пораженные заболеванием клетки часто существуют в условиях, характерных для пораженного заболеванием участка, таких как кислое значение pH и гипоксия. "Пораженные заболеванием клетки" и "пораженная заболеванием ткань" могут быть также связаны с другими заболеваниями, включая, но без ограничения, рак. "Пораженные заболеванием клетки" и "пораженная заболеванием ткань" могут быть также связаны с иммунологическим заболеванием или нарушением, сердечно-сосудистым заболеванием или нарушением, метаболическим заболеванием или нарушением или пролиферативным заболеванием или нарушением. Иммунологическое нарушение включает воспалительное заболевание или нарушение и аутоиммунное заболевание или нарушение.

Используемый здесь термин "непораженные заболеванием клетки" относится к нормальным здоровым клеткам организма. Непораженные заболеванием клетки часто существуют в физиологических условиях, таких как нейтральное значение pH и адекватная концентрация кислорода, которая поддерживает нормальный метаболизм и регуляторные функции клеток.

Используемый здесь термин "пораженный заболеванием участок" относится к локализации или области, расположенной в непосредственной близости от локализации заболевания в организме. Например, если заболевание представляет собой локализованную в печени солидную опухоль, то пораженный заболеванием участок представляет собой участок локализации опухоли в печени и области, расположенные в непосредственной близости от опухоли в печени. Клетки в пораженном заболеванием участке могут включать пораженные заболеванием клетки, а также клетки, которые способствуют заболеванию в пораженном заболеванием участке. Например, если пораженный заболеванием участок представляет собой участок локализации опухоли, клетки в участке локализации опухоли включают как пораженные заболе-

ванием клетки (например, опухолевые клетки), так и клетки, способствующие росту опухоли в участке локализации опухоли. Аналогично, термин "участок локализации рака" относится к локализации рака в организме.

Используемый здесь термин "D1-домен SIRP- α " или "D1-домен" относится к расположенному дистально по отношению к мембране внеклеточному домену SIRP- α . D1-домен SIRP- α расположен на N-конце полноразмерного SIRP- α дикого типа и опосредует связывание с CD47. Аминокислотные последовательности D1-домена показаны в табл. 1.

Используемый здесь термин "D2-домен SIRP- α " или "D2-домен" относится ко второму внеклеточному домену SIRP- α . D2-домен SIRP- α включает аминокислоты приблизительно с 119 по 220 полноразмерного SIRP- α дикого типа.

Используемый здесь термин "D3-домен SIRP- α " или "D3-домен" относится к третьему внеклеточному домену SIRP- α . D3-домен SIRP- α включает аминокислоты приблизительно с 221 по 320 полноразмерного SIRP- α дикого типа.

Используемый здесь термин "полипептид SIRP- α " относится к SIRP- α дикого типа, а также варианту SIRP- α , и каждый термин определен и описан в настоящем документе.

Используемый здесь термин "вариант SIRP- α " относится к полипептиду, содержащему D1-домен SIRP- α или CD47-связывающую часть полноразмерного SIRP- α . В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α имеет последовательность, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична последовательности любой из SEQ ID NO: 3-12 и 24-34. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α обладает более высокой аффинностью в отношении CD47, чем SIRP- α дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α содержит часть человеческого SIRP- α дикого типа (предпочтительно CD47-связывающую часть SIRP- α дикого типа) и/или имеет одну или несколько аминокислотных замен. Например, вариант SIRP- α может содержать замены одного или нескольких (например, одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти и т.д. до максимум 20) аминокислотных остатков относительно SIRP- α дикого типа. Например, вариант SIRP- α может содержать замены одного или нескольких (например, одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти и т.д. до максимум 20) аминокислотных остатков на остатки гистидина. В некоторых вариантах осуществления варианты SIRP- α содержат часть, которая имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичную последовательности человеческого SIRP- α дикого типа или любого из вариантов SIRP- α , описанных здесь (например, последовательности CD47-связывающей части человеческого SIRP- α дикого типа). CD47-связывающая часть SIRP- α дикого типа включает D1-домен SIRP- α дикого типа (последовательность любой из SEQ ID NO: 3-12).

Используемый здесь термин "конструкция варианта SIRP- α " относится к полипептиду, содержащему вариант SIRP- α , присоединенный, например, к блокирующему пептиду, мономеру Fc-домена, HSA, альбумин-связывающему пептиду, полимеру, антитело-связывающему пептиду, антителу. В некоторых вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α обладает предпочтительной активностью в пораженном заболевании участке. В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α обладают предпочтительной активностью в пораженном заболевании участке и включают вариант SIRP- α , содержащий часть, которая имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичную последовательности человеческого SIRP- α дикого типа или любому из вариантов SIRP- α , описанных здесь (например, последовательности CD47-связывающей части человеческого SIRP- α дикого типа).

Используемый здесь термин "процент (%) идентичности" относится к процентному содержанию аминокислотных (или нуклеотидных) остатков в последовательности-кандидате, например варианте SIRP- α , которые идентичны аминокислотным (или нуклеотидным) остаткам в референсной последовательности, например человеческом SIRP- α дикого типа или его CD47-связывающей части, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если это необходимо для достижения максимального процента идентичности последовательностей (т.е. гэпы могут быть введены в одну или обе, кандидатную и референсную, последовательности для оптимального выравнивания, и негомологичные последовательности могут не учитываться в целях сравнения). Выравнивание с целью определения процента идентичности может быть осуществлено различными путями, известными специалисту в данной области, например с использованием общедоступной компьютерной программы, такой как BLAST, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. В некоторых вариантах осуществления процент идентичности аминокислотной (нуклеотидной) последовательности данной последовательности-кандидата к, с или против данной референсной последовательности (которая

альтернативно может быть названа как данная последовательность-кандидат, которая имеет или содержит определенный процент идентичности аминокислотной (нуклеотидной) последовательности к, с или против данной референсной последовательности) рассчитывается следующим образом:

$$100 \times \text{фракцию } A/B,$$

где А представляет собой число аминокислотных (или нуклеотидных) остатков, оцененных как идентичные при выравнивании последовательности-кандидата и референсной последовательности; и

В представляет собой общее число аминокислотных (или нуклеотидных) остатков в референсной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления, когда длина последовательности-кандидата не равна длине референсной последовательности, процент идентичности аминокислотной (или нуклеотидной) последовательности последовательности-кандидата по отношению к референсной последовательности не равен проценту идентичности аминокислотной (или нуклеотидной) последовательности референсной последовательности по отношению к последовательности-кандидату.

В конкретных вариантах осуществления референсная последовательность, выровненная для сравнения с последовательностью-кандидатом, может показать, что последовательность-кандидат проявляет от 50 до 100% идентичности по всей длине последовательности-кандидата или выбранной части смежных аминокислотных (или нуклеотидных) остатков последовательности-кандидата. Длина последовательности-кандидата, выровненной в целях сравнения, составляет по меньшей мере 30%, например по меньшей мере 40%, например по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90 или 100% от длины референсной последовательности. Когда положение в последовательности-кандидате занято таким же аминокислотным (или нуклеотидным) остатком как соответствующее положение в референсной последовательности, то молекулы являются идентичными в этом положении.

Используемый здесь термин "опухоль-ассоциированная протеаза" или "опухолевый фермент" относится к ферменту, например, протеазе, которая присутствует на повышенном уровне при раке, например, в солидной опухоли. В некоторых вариантах осуществления опухоль-ассоциированная протеаза может расщеплять расщепляемый линкер.

Используемый здесь термин "блокирующий пептид" относится к пептиду, который может связываться с вариантом SIRP- α и блокировать или "маскировать" CD47-связывающую часть варианта SIRP- α . В конструкции варианта SIRP- α блокирующий пептид может быть присоединен к варианту SIRP- α с помощью линкера, который является необязательно расщепляемым, и необязательно одного или нескольких спейсеров. Блокирующий пептид может быть связан посредством нековалентных связей с вариантом SIRP- α и расщепляться в пораженном заболеванием участке или пораженной заболеванием клетке. В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид может связываться с SIRP- α дикого типа в пораженном заболеванием участке или пораженной заболеванием клетке. Блокирующий пептид может быть использован для уменьшения или сведения к минимуму связывания варианта SIRP- α с CD47 дикого типа в нормальных физиологических условиях или в непораженном заболеванием участке. В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид обладает более высокой аффинностью связывания с SIRP- α дикого типа, чем вариантом SIRP- α . Блокирующий пептид может диссоциировать от варианта SIRP- α для связывания с SIRP- α дикого типа, например, в пораженном заболеванием участке или в нефизиологических условиях. Примером блокирующего пептида является блокирующий пептид на основе CD47, который представляет собой пептид, полученный из CD47 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид на основе CD47 представляет собой внеклеточную связывающую SIRP- α часть CD47 (т.е. IgSF-домен CD47). В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид на основе CD47 включает одну или несколько аминокислотных замен, добавок и/или делеций по сравнению с CD47 дикого типа.

Используемый здесь термин "расщепляемый линкер" относится к линкеру между двумя частями конструкции варианта SIRP- α . В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер может ковалентно присоединять блокирующий пептид к варианту SIRP- α для блокирования связывания варианта SIRP- α с CD47 в физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер может быть введен в пределах блокирующего пептида, который может быть нековалентно связан с вариантом SIRP- α для блокирования связывания варианта SIRP- α с CD47 в физиологических условиях. Расщепляемый линкер может быть расщеплен в определенных условиях. Если расщепляемый линкер находится в пределах блокирующего пептида, расщепление линкера будет инактивировать блокирующий пептид. Расщепляемый линкер содержит фрагмент, который способствует расщеплению или индукции расщепления линкера в условиях, характерных для пораженного заболеванием участка, такого как участок локализации рака, например, внутри солидной опухоли. Расщепляемый линкер является стабильным в здоровых физиологических условиях (например, нейтральных значениях pH и адекватной концентрации кислорода). Фрагмент может представлять собой pH-чувствительную химическую функциональную группу (например, ацетали, кетали, тиомалеаматы, гидразоны, дисульфидные связи), которая способна гидролизироваться в условиях кислого pH. Фрагмент может также представлять собой чувствительную к гипоксии функциональную группу (например, хиноны, N-оксиды и гетероароматические

нитрогруппы) или аминокислоту, способную к восстановлению в условиях гипоксии. Фрагмент в расщепляемом линкере может также представлять собой белковый субстрат, который может быть распознан и расщеплен опухоль-ассоциированной протеазой, ферментом или пептидазой.

Используемый здесь термин "спейсер" относится к ковалентной или нековалентной связи между двумя частями конструкции варианта SIRP- α , такими как линкер (например, расщепляемый линкер) и вариант SIRP- α , или антитело-связывающий пептид и вариант SIRP- α . Предпочтительно спейсер представляет собой ковалентную связь. Спейсер может представлять собой простую химическую связь, например амидную связь или аминокислотную последовательность (например, последовательность из 3-200 аминокислот). Аминокислотный спейсер является частью первичной последовательности полипептида (например, присоединенный к расположенным с промежутками полипептидами или полипептидными доменами посредством полипептидного остова). Спейсер обеспечивает пространство и/или гибкость между двумя частями. Спейсер является стабильным в физиологических условиях (например, нейтральном pH и адекватной концентрации кислорода), а также в условиях, характерных для пораженного заболеванием участка, например кислом pH и гипоксии. Спейсер является стабильным в пораженном заболеванием участке, таком как участок локализации рака, например внутри опухоли. Описания спейсеров представлены подробно далее в настоящем документе.

Используемый здесь термин "антитело" относится к интактным антителам, фрагментам антител, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность, моноклональным антителам, поликлональным антителам, моноспецифическим антителам и мультиспецифическим антителам (например, биспецифическим антителам), образованным по меньшей мере из двух интактных антител. Предпочтительно антитело является специфическим в отношении пораженной заболеванием клетки, например опухолевой клетки. Например, антитело может специфически связываться с белком клеточной поверхности на пораженной заболеванием клетке, например опухолевой клетке.

Используемый здесь термин "альбумин-связывающий пептид" относится к аминокислотной последовательности из 12-16 аминокислот, которая обладает сродством к сывороточному альбумину и связывается с сывороточным альбумином. Альбумин-связывающий пептид может иметь различное происхождение, например, человеческое, мышинное или крысиное. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конструкция варианта SIRP- α может включать альбумин-связывающий пептид, который слит с С-концом варианта SIRP- α для увеличения периода полувыведения варианта SIRP- α из сыворотки. Альбумин-связывающий пептид может быть слит с вариантом SIRP- α напрямую или через спейсер.

Используемый здесь термин "человеческий сывороточный альбумин (HSA)" относится к белку альбумину, присутствующему в плазме крови человека. Человеческий сывороточный альбумин является наиболее распространенным белком в крови. Он составляет около половины от всех белков, содержащихся в сыворотке крови. В некоторых вариантах осуществления человеческого сывороточного альбумина имеет аминокислотную последовательность из аминокислот 25-609 (SEQ ID NO: 67) в банке данных UniProt с номером доступа P02768. В некоторых вариантах осуществления человеческого сывороточного альбумина, кроме того, содержит C34S по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 67.

Используемый здесь термин "мономер Fc-домена" относится к полипептидной цепи, которая включает второй и третий константные домены антитела (C_{H2} и C_{H3}). В некоторых вариантах осуществления мономер Fc-домена также включает шарнирный домен. Мономер Fc-домена может представлять собой иммуноглобулин любого изотипа, включая IgG, IgE, IgM, IgA или IgD. Кроме того, мономер Fc-домена может представлять собой подтип IgG (например, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 или IgG4). Мономер Fc-домена не включает какую-либо часть иммуноглобулина, которая способна действовать в качестве антиген-распознающей области, например, вариабельный домен или определяющую комплементарности область (CDR). Мономеры Fc-домена могут включать до десяти изменений из последовательности мономера Fc-домена дикого типа (например, 1-10, 1-8, 1-6, 1-4 аминокислотных замен, добавлений или deletions), которые изменяют взаимодействие между Fc-доменом и Fc-рецептором. Примеры подходящих изменений известны в данной области.

Используемый здесь термин "Fc-домен" относится к димеру, состоящему из двух мономеров Fc-домена. В Fc-домене дикого типа два мономера Fc-домена димеризуются путем взаимодействия между двумя константными доменами C_{H3} антитела, а также с помощью одной или нескольких дисульфидных связей, которые образуются между шарнирными доменами двух димеризующихся мономеров Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен может быть мутирован с потерей эффекторных функций, что характерно для "мертвого Fc-домена". В определенных вариантах осуществления каждый из мономеров Fc-домена в Fc-домене включает аминокислотные замены в константном домене C_{H2} антитела для уменьшения взаимодействия или связывания между Fc-доменом и Fc γ -рецептором.

Используемый здесь термин "аффинность" или "аффинность связывания" относится к силе связывающего взаимодействия между двумя молекулами. Как правило, аффинность связывания относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между молекулой и ее партнером по связыванию, таким как вариант SIRP- α и CD47. Если не указано иное, аффинность связывания относится к присущей

аффинности связывания, которая отражает взаимодействие в соотношении 1:1 между членами связывающейся пары. Аффинность связывания между двумя молекулами обычно описывается константой диссоциации (K_D) или константой аффинности (K_A). Две молекулы, которые имеют низкую аффинность связывания друг с другом, обычно связываются медленно, имеют тенденцию к легкой диссоциации и проявляют высокое значение K_D . Две молекулы, которые обладают высокой аффинностью в отношении друг друга, как правило, легко связываются, имеют тенденцию оставаться связанными более длительное время, и проявляют низкое значение K_D . Значение K_D двух взаимодействующих молекул может быть определено с использованием способов и методик, хорошо известных в данной области, например поверхностного плазмонного резонанса. Значение K_D рассчитывают как отношение k_{off}/k_{on} .

Используемый здесь термин "клетка-хозяин" относится к носителю, который включает необходимые клеточные компоненты, например органеллы, необходимые для экспрессии белков из их соответствующих нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты обычно включены в векторы на основе нуклеиновых кислот, которые могут быть введены в клетку-хозяина общепринятыми методами, известными в данной области (например, трансформацией, трансфекцией, электропорацией, осаждением фосфата кальция, прямой микроинъекцией и т.д.). Клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку, например бактериальную клетку, или эукариотическую клетку, например клетку млекопитающего (например, клетку яичника китайского хомяка (CHO)). Как описано здесь, клетка-хозяин используется для экспрессии одной или нескольких конструкций варианта SIRP- α .

Используемый здесь термин "фармацевтическая композиция" относится к лекарственному или фармацевтическому составу, который содержит активный ингредиент, а также вспомогательные вещества и разбавители для содействия активному ингредиенту, подходящему для способа введения. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению включает фармацевтически приемлемые компоненты, которые совместимы с конструкцией варианта SIRP- α . Фармацевтическая композиция может быть представлена в форме таблетки или капсулы для перорального введения или в водной форме для внутривенного или подкожного введения.

Используемый здесь термин "заболевание, связанное с активностью SIRP- α и/или CD47" относится к любому заболеванию или нарушению, которое вызвано и/или связано с активностью SIRP- α и/или CD47. Например, любое заболевание или нарушение, которое вызвано или связано с повышением и/или снижением активности SIRP- α и/или CD47. Примеры заболеваний, связанных с активностью SIRP- α и/или CD47, включают, но без ограничения, рак и иммунологические заболевания (например, аутоиммунные заболевания и воспалительные заболевания).

Используемый здесь термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству конструкции варианта SIRP- α согласно изобретению или фармацевтической композиции, содержащей конструкцию варианта SIRP- α согласно изобретению, эффективное для достижения желаемого терапевтического эффекта в лечении пациента, имеющего заболевание, такое как рак, например, солидную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль. В частности, терапевтически эффективное количество конструкции варианта SIRP- α не вызывает неблагоприятных побочных эффектов.

Используемый здесь термин "оптимизированная аффинность" или "оптимизированная аффинность связывания" относится к оптимизированной силе связывающего взаимодействия между вариантом SIRP- α и CD47. В некоторых вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α связывается преимущественно или с более высокой аффинностью с CD47 на клетках в пораженном заболеванием участке (т.е. раковых клетках) и значительно не связывается или связывается с более низкой аффинностью с CD47 на клетках в непораженном заболеванием участке (т.е. нераковых клетках). Аффинность связывания между вариантом SIRP- α и CD47 оптимизирована таким образом, что взаимодействие не вызывает клинически значимой токсичности. В некоторых вариантах осуществления для достижения оптимизированной аффинности связывания между вариантом SIRP- α и CD47 может быть разработан вариант SIRP- α с более низкой аффинностью связывания с CD47, чем максимально достигаемая.

Используемый здесь термин "иммуногенность" относится к свойству белка (например, терапевтического белка), который вызывает иммунный ответ у хозяина, как если бы он являлся чужеродным антигеном. Иммуногенность белка можно оценить *in vitro* различными способами, в частности с помощью анализов *in vitro* Т-клеточной пролиферации (см., например, Jawa et al., *Clinical Immunology*, 149:534-555, 2013), некоторые из которых являются коммерчески доступными (см., например, услуги по проведению анализа на иммуногенность, предлагаемые фирмой Proimmune).

Используемый здесь термин "минимальная иммуногенность" относится к иммуногенности белка (например, терапевтического белка), который был модифицирован, например, посредством аминокислотных замен, которая является более низкой (например, ниже по меньшей мере на 10, 25, 50 или 100%) по сравнению с иммуногенностью до введения аминокислотных замен. Белок (например, терапевтический белок), модифицированный таким образом, чтобы обладать минимальной иммуногенностью, означает, что он не вызывает или вызывает незначительный иммунный ответ даже в том случае, если он является чужеродным антигеном.

Используемый здесь термин "оптимизированная фармакокинетика" означает, что параметры, которые, как правило, связаны с фармакокинетикой белка, улучшены и модифицированы для получения оптимизированного белка для применения *in vitro* и/или *in vivo*. Параметры, которые связаны с фармакокинетикой белка, хорошо известны специалисту в данной области, например K_d , валентность и период полувыведения. В настоящем изобретении фармакокинетические параметры конструкции варианта SIRP- α согласно изобретению оптимизированы на ее взаимодействие с CD47 для применения в терапевтическом контексте.

Описание чертежей

На фиг. 1 показана часть совместно кристаллизованной структуры CD47: SIRP- α (PDB: 4KJY, 4CMM), N-конец CD47 существует в виде пироглутамата и осуществляет взаимодействия посредством водородного связывания с Thr66 варианта SIRP- α или Leu66 SIRP- α дикого типа.

На фиг. 2 показаны вычислительные модели участка взаимодействия между CD47, содержащим T102Q, и SIRP- α дикого типа, содержащем A27 (слева), и участка взаимодействия между CD47, содержащим T102Q, и вариантом SIRP- α , содержащим I27.

На фиг. 3 показан анализ SDS-PAGE конструкций варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 48-56).

На фиг. 4A показан анализ SDS-PAGE конструкции варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 54) после *in vitro* расщепления uPA и матриптазой.

На фиг. 4B показан анализ SDS-PAGE конструкции варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 54) после *in vitro* расщепления различными количествами матриптазы.

На фиг. 4C показан анализ SDS-PAGE различных конструкций варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 57-63) после *in vitro* расщепления матриптазой.

На фиг. 5A показана диаграмма, иллюстрирующая различные аффинности связывания различных конструкций варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 48-55) с CD47 до и после *in vitro* расщепления матриптазой.

На фиг. 5B показана диаграмма, иллюстрирующая различные аффинности связывания различных конструкций варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 52-63) и варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 31) с CD47 до и после *in vitro* расщепления матриптазой.

На фиг. 6 показана сенсограмма, демонстрирующая, что конструкция варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 66) может связываться одновременно с цетуксимабом и CD47.

На фиг. 7A показана схема четырехкомпонентного комплекса, содержащего EGFR, цетуксимаб, конструкцию варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 66) и CD47.

На фиг. 7B показана сенсограмма, демонстрирующая образование четырехкомпонентного комплекса, показанного на фиг. 7A.

На фиг. 7C показано изображение сенсограммы, показанной на фиг. 7B.

На фиг. 8 показан график разброса данных, показывающий фагоцитоз, индуцированный конструкцией варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 66) и варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 31).

Подробное описание изобретения

В изобретении предлагаются конструкции варианта сигнального регуляторного белка альфа (SIRP- α), обладающие предпочтительной активностью в пораженном заболеванием участке (например, участке локализации опухоли, чем не в непораженном заболеванием участке). В определенных вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α обладают более высокой аффинностью связывания с CD47 на пораженных заболеванием клетках (например, опухолевых клетках). В некоторых вариантах осуществления варианты SIRP- α могут содержать одну или несколько аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты могут быть заменены на остатки гистидина. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты могут быть заменены на другие негистидиновые аминокислотные остатки. В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α связываются с более высокой аффинностью с CD47 на пораженных заболеванием клетках или в пораженном заболеванием участке, чем на непораженных заболеванием клетках, и в условиях, характерных для пораженного заболеванием участка, такого как участок локализации рака, например в участке локализации опухоли или внутри опухоли. В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α связываются с более высокой аффинностью с CD47 в условиях кислого pH (например, pH менее чем около 7) и/или в условиях гипоксии, чем в физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α включают вариант SIRP- α и блокирующий пептид; вариант SIRP- α защищен от связывания с CD47 блокирующим пептидом, за исключением условий, характерных для пораженного заболеванием участка. В некоторых вариантах осуществления варианты SIRP- α слиты с мономером Fc-домена, человеческим сывороточным альбумином (HSA), альбумин-связывающим пептидом или полимером (например, полиэтиленгликолем (PEG) полимером). В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α обладают иммуногенностью, аффинностью и/или фармакокинетическими параметрами, оптимизированными для использования в терапевтическом контексте. В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α предпочтительно нацелены на пораженные заболеванием участки, например опухоль, с помощью нацеливающего фрагмента, например мишень-специфического антитела. В

изобретении предлагаются способы и фармацевтические композиции, содержащие конструкции варианта SIRP- α , для лечения различных заболеваний, таких как рак, предпочтительно солидной опухоли или гематологической злокачественной опухоли, а также способы уничтожения раковых клеток и способы изготовления конструкций варианта SIRP- α и фармацевтических композиций, содержащих такие конструкции варианта SIRP- α .

В некоторых вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α включает вариант SIRP- α , присоединенный к блокирующему пептиду. В некоторых вариантах осуществления предпочтительное связывание варианта SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α с CD47 на пораженных заболеванием клетках или пораженных заболеванием участках может быть получено путем присоединения блокирующего пептида к варианту SIRP- α путем использования расщепляемого линкера, который расщепляется на пораженных заболеванием клетках или в пораженных заболеванием участках. В некоторых вариантах осуществления предпочтительное связывание варианта SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α CD47 на пораженных заболеванием клетках или в пораженных заболеванием участках может быть получено путем присоединения блокирующего пептида к варианту SIRP- α , при этом блокирующий пептид может быть откреплён или легко диссоциирован от варианта SIRP- α на пораженных заболеванием клетках или в пораженных заболеванием участках.

I. Варианты SIRP- α .

Существует по меньшей мере десять природных вариантов человеческого SIRP- α дикого типа. Аминокислотные последовательности D1-доменов десяти человеческих вариантов SIRP- α дикого типа показаны в SEQ ID NO: 3-12 (см. табл. 1). В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α имеет последовательность, по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичную последовательности любой из SEQ ID NO: 3-12. В табл. 2 перечислены возможные аминокислотные замены в каждом варианте D1-домена (SEQ ID NO: 13-23). В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α связывается с оптимизированной аффинностью связывания с CD47. В некоторых вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α , включающая вариант SIRP- α , связывается в первую очередь или с более высокой аффинностью с CD47 на раковых клетках и значительно не связывается или связывается с более низкой аффинностью с CD47 на нераковых клетках. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания между конструкцией варианта SIRP- α и CD47 оптимизирована таким образом, что взаимодействие не вызывает клинически значимой токсичности. В некоторых вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α обладает минимальной иммуногенностью. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α содержит такие же аминокислоты, как полипептид SIRP- α в биологическом образце от субъекта, за исключением аминокислотных изменений, введенных для увеличения аффинности варианта SIRP- α . Методики и способы создания вариантов SIRP- α и определения их аффинностей связывания с CD47 описаны более подробно далее в настоящем документе.

В табл. 2 перечислены специфические аминокислотные замены в варианте SIRP- α относительно каждой последовательности варианта D1-домена. Вариант SIRP- α может включать одну или несколько (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять) замен, перечисленных в табл. 2. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α включает не более десяти аминокислотных замен относительно D1-домена дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α включает не более семи аминокислотных замен относительно D1-домена дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α представляет собой химерный вариант SIRP- α , который включает часть двух или более вариантов D1-домена дикого типа (например, часть одного варианта D1-домена дикого типа и часть другого варианта D1-домена дикого типа). В некоторых вариантах осуществления химерный вариант SIRP- α включает по меньшей мере две части (например, три, четыре, пять и т.д.) вариантов D1-домена дикого типа, при этом каждая из частей получена из разного варианта D1-домена дикого типа. В некоторых вариантах осуществления химерный вариант SIRP- α , кроме того, включает одну или несколько аминокислотных замен, перечисленных в табл. 2. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α имеет последовательность, по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичную последовательности любой из SEQ ID NO: 24-34 в табл. 3.

Таблица 1

Последовательности D1-доменов SIRP- α дикого типа

Вариант 1 D1-домена дикого типа (SEQ ID NO: 3)	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRE LIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYTCVK FRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAPKS
Вариант 2 D1-домена дикого типа (SEQ ID NO: 4)	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPARE LIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYTCVKF RKGSPDTEFKSGAGTELSVRAPKS
Вариант 3 D1-домена дикого типа (SEQ ID NO: 5)	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILLCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPARE LIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYTCVKF RKGSPDTEFKSGAGTELSVRAPKS
Вариант 4 D1-домена дикого типа (SEQ ID NO: 6)	EEGLQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRE LIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYTCVK FRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAPKS
Вариант 5 D1-домена дикого типа (SEQ ID NO: 7)	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRE LIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYTCVK FRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAPKS
Вариант 6 D1-домена дикого типа (SEQ ID NO: 8)	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRE LIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFIPRIGNITPADAGTYTCVK FRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAPKS
Вариант 7 D1-домена дикого типа (SEQ ID NO: 9)	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPARE LIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYTCVKF RKGSPDTEFKSGAGTELSVRGKPS
Вариант 8 D1-домена дикого типа (SEQ ID NO: 10)	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPARE LIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYTCVKF RKGSPDTEFKSGAGTELSVRAPKS
Вариант 9 D1-домена дикого типа (SEQ ID NO: 11)	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRE LIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRISNITPADAGTYTCVKF RKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAPKS
Вариант 10 D1-домена дикого типа (SEQ ID NO: 12)	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPARE LIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYTCVKF RKGSPDTEFKSGAGTELSVRAPKS

Таблица 2

Аминокислотные замены в варианте SIRP- α относительно
каждого варианта D1-домена

v1 D1-домена (SEQ ID NO: 13)	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVLVAAGETX ₃ TLRCTX ₄ TS LX ₅ PVGPIQWFRGA GPGRX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSDX ₁₀ TX ₁₁ RNNMDFSIRIGX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYCYCX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDDVEX ₁₆ KSGAGTELSVRAKPS
Аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 13	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =A, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =L, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
v2 D1-домена (SEQ ID NO: 14)	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVSVAAGESX ₃ ILHCTX ₄ TS LX ₅ PVGPIQWFRGAG PARX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSEX ₁₀ TX ₁₁ RENMDFSISISX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYCYCX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDTEX ₁₆ KSGAGTELSVRAKPS
Аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 14	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =V, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =S, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
v3 D1-домена (SEQ ID NO: 15)	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVSVAAGESX ₃ ILLCTX ₄ TS LX ₅ PVGPIQWFRGAG PARX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSEX ₁₀ TX ₁₁ RENMDFSISISX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYCYCX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDTEX ₁₆ KSGAGTELSVRAKPS

Аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 15	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =V, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =S, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
v4 D1-домена (SEQ ID NO: 16)	EEGX ₁ QX ₂ IQPKSVSVAAGESX ₃ ILHCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRGA GPGRX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSDX ₁₀ TX ₁₁ RNNMDFSIRIGX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYCYX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDDVEX ₁₆ KSGAGTELSVRAPKS
Аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 16	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =A, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =L, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
v5 D1-домена (SEQ ID NO: 17)	EEEX ₁ QX ₂ IQPKFVLVAAGETX ₃ TLRCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRGA GPGRX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSDX ₁₀ TX ₁₁ RNNMDFSIRIGX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYCYX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDDVEX ₁₆ KSGAGTELSVRAPKS
Аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 17	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =A, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =L, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
v6 D1-домена (SEQ ID NO: 18)	EEEX ₁ QX ₂ IQPKSVLVAAGETX ₃ TLRCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRGA GPGRX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSDX ₁₀ TX ₁₁ RNNMDFPIRIGX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYCYX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDDVEX ₁₆ KSGAGTELSVRAPKS
Аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 18	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =A, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =L, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
v7 D1-домена (SEQ ID NO: 19)	EEEX ₁ QX ₂ IQPKSVSVAAGESX ₃ ILHCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRGAG PARX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSEX ₁₀ TX ₁₁ RENMDFSISIX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYCYX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDTEX ₁₆ KSGAGTELSVRGKPS

Аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 19	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =V, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =S, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
v8 D1-домена (SEQ ID NO: 20)	EEEX ₁ QX ₂ IQPKSVLVAAGETX ₃ TLRCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRGAGPARX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSEX ₁₀ TX ₁₁ RENMDFSISISX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYCYCX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDTEX ₁₆ KSGAGTELSVRAPKS
Аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 20	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =A, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =S, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
v9 D1-домена (SEQ ID NO: 21)	EEEX ₁ QX ₂ IQPKSVLVAAGETX ₃ TLRCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRGAGPGRX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSDX ₁₀ TX ₁₁ RNNMDFSIRISX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYCYCX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDDVEX ₁₆ KSGAGTELSVRAPKS
Аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 21	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =A, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =L, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
v10 D1-домена (SEQ ID NO: 22)	EEEX ₁ QX ₂ IQPKSVSVAAGESX ₃ ILHCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRGAGPARX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSEX ₁₀ TX ₁₁ RENMDFSISISX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYCYCX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDTEX ₁₆ KSGAGTELSVRAPKS
Аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 22	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =V, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =S, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
Pan D1-домен (SEQ ID NO: 23)	EEX ₁ X ₂ QX ₃ IQPKX ₄ VX ₅ VAAGEX ₆ X ₇ X ₈ LX ₉ CTX ₁₀ TSLX ₁₁ PVGPIQWFRGAGPX ₁₂ RX ₁₃ LIYNQX ₁₄ X ₁₅ GX ₁₆ FPRVTTVSX ₁₇ X ₁₈ TX ₁₉ RX ₂₀ NMDFX ₂₁ IX ₂₂ IX ₂₃ X ₂₄ ITX ₂₅ ADAGTYCYCX ₂₆ KX ₂₇ RKGSPDX ₂₈ X ₂₉ EX ₃₀ KSGAGTELSVRX ₃₁ KPS
Аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 23	X ₁ =E, G; X ₂ =L, I, V; X ₃ =V, L, I; X ₄ =S, F; X ₅ =L, S; X ₆ =S, T; X ₇ =A, V; X ₈ =I, T; X ₉ =H, R; X ₁₀ =A, V, I, L; X ₁₁ =I, T, S, F; X ₁₂ =A, G; X ₁₃ =E, V, L; X ₁₄ =K, R; X ₁₅ =E, Q; X ₁₆ =H, P, R; X ₁₇ =D, E; X ₁₈ =S, L, T, G; X ₁₉ =K, R; X ₂₀ =E, N; X ₂₁ =S, P; X ₂₂ =S, R; X ₂₃ =S, G; X ₂₄ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₂₅ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₂₆ =V, I; X ₂₇ =F, L, V; X ₂₈ =D or absent; X ₂₉ =T, V; X ₃₀ =F, V; и X ₃₁ =A, G

SEQ ID NO: 24-34

SEQ ID NO	Последовательность
24	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQR EGHFPRVTTVSETTRRENMDFSISISNITPADAGTYCCKFRKGSPDTEVKS GAGTELSVRAKPS
25	EEEVQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLIPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ RQGHFPRVTTVSEGTRRENMDFSISISNITPADAGTYCCKFRKGSPDTEFK SGAGTELSVRAKPS
26	EEEVQIIQPDKSVSVAAGESVILHCTITSLTPVGPIQWFRGAGPARLLIYNQR EGPFPRVTTVSETTRRENMDFSISISNITPADAGTYCCKLRKGSPDTEFKS GAGTELSVRAKPS
27	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLSPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQR QGPFPRVTTVSEGTKRENMDFSISISNITPADAGTYCCKLRKGSPDTEFKS GAGTELSVRAKPS
28	EEEIQVIQPDKSVSVAAGESVIIHCTVTSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ RQGRFPRVTTVSEGTKRENMDFSISISNITPADAGTYCCKVRKGSPDTEV KSGAGTELSVRAKPS
29	EEEVQIIQPDKSVSVAAGESIILHCTVTSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ REGRFPRVTTVSEGTRRENMDFSISISNITPADAGTYCCKLRKGSPDTEFK SGAGTELSVRAKPS
30	EEEVQLIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYN QREGPFPRVTTVSEGTKRENMDFSISISNITPADAGTYCCKFRKGSPDTEV KSGAGTELSVRAKPS
31	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCCKFRKGSPDDVEF KSGAGTELSVRAKPS
32	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARLLIYNQR QGPFPRVTTVSETTKRENMDFSISISNITPADAGTYCCKFRKGSPDTEFKS GAGTELSVRAKPS
33	EEEVQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ KQGPFRVTTISETTRRENMDFSISISNITPADAGTYCCKFRKGSPDTEFKS GAGTELSVRAKPS
34	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLTPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQR QGPFPRVTTVSEGTRRENMDFSISISNITPADAGTYCCKFRKGSPDTEVKS GAGTELSVRAKPS

Желательно, чтобы конструкции варианта SIRP- α согласно изобретению связывались с более высокой аффинностью с CD47 в условиях, характерных для пораженного заболеванием участка, такого как участок локализации рака, например внутри опухоли, чем в физиологических условиях (например, нейтральном pH и адекватной концентрации кислорода). Условиями, характерными для пораженного заболеванием участка, такого как участок локализации рака, например внутри опухоли, являются кислые значения pH и гипоксия. В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α могут быть сконструированы для предпочтительного связывания с пораженными заболеванием клетками, чем с непораженными заболеванием клетками. В частности, пораженные заболеванием клетки могут представлять собой раковые клетки ракового заболевания, например солидной опухоли или гематологической злокачественной опухоли. Предпочтительно конструкции варианта SIRP- α связываются с более высокой аффинностью с CD47 в условиях кислого pH (например, pH менее чем около 7), чем в условиях нейтрального pH, например pH 7,4. Предпочтительно конструкции варианта SIRP- α связываются с более высокой аффинностью с CD47 в условиях гипоксии, чем в условиях адекватной концентрации кислоро-

да. В некоторых вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α включает вариант SIRP- α , присоединенный к блокирующему пептиду. В некоторых вариантах осуществления предпочтительное связывание варианта SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α с CD47 на пораженных заболеванием клетках или в пораженных заболеванием участках может быть получено путем присоединения блокирующего пептида к варианту SIRP- α с помощью расщепляемого линкера, который расщепляется на пораженных заболеванием клетках или в пораженных заболеванием участках. В некоторых вариантах осуществления предпочтительное связывание варианта SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α с CD47 на пораженных заболеванием клетках или в пораженных заболеванием участках может быть получено путем присоединения блокирующего пептида к варианту SIRP- α , при этом блокирующий пептид может открепляться или легко диссоциировать от варианта SIRP- α на пораженных заболеванием клетках или в пораженных заболеванием участках.

В некоторых вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α включает вариант SIRP- α и блокирующий пептид. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α может быть присоединен к блокирующему пептиду посредством линкера (например, расщепляемого линкера). Блокирующий пептид служит для блокирования участка связывания SIRP- α с CD47 для предотвращения связывания варианта SIRP- α с CD47 в физиологических условиях (например, нейтральном pH и адекватной концентрации кислорода). Расщепляемый линкер представляет собой линкер, способный расщепляться в условиях, характерных для пораженного заболеванием участка (такого как участок локализации рака, например, внутри опухоли), таких как кислые значения pH и гипоксия. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер расщепляется под действием опухоль-ассоциированной протеазы в пораженном заболеванием участке. В некоторых вариантах осуществления линкер не расщепляется, и блокирующий пептид легко диссоциирует от варианта SIRP- α в пораженном заболеванием участке таким образом, что вариант SIRP- α оказывается свободным для связывания с близлежащим CD47 на пораженных заболеванием клетках, например, опухолевых клетках. Таким образом, только когда вариант SIRP- α находится в пораженном заболеванием участке, он будет высвобождаться от блокирующего пептида и будет свободным для связывания с близлежащим CD47 на пораженных заболеванием клетках, например, опухолевых клетках. Блокирующие пептиды и линкеры (например, расщепляемые линкеры) описаны более подробно далее в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α включает вариант SIRP- α и нацеливающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α может быть присоединен к нацеливающему фрагменту, такому как антитело, например опухоль-ассоциированное антитело, или другому белку или пептиду, например антитело-связывающему пептиду, который проявляет аффинность связывания с пораженной заболеванием клеткой. После введения опухоль-ассоциированное антитело или антитело-связывающий пептид служат в качестве нацеливающего фрагмента для доставки варианта SIRP- α к пораженному заболеванием участку, такому как участок локализации рака, например, внутри солидной опухоли, где SIRP- α может специфически взаимодействовать с CD47 на пораженных заболеванием клетках. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α может быть слит с белком или пептидом, например антитело-связывающим пептидом, способным связываться с антителом (например, опухоль-специфическим антителом), т.е. связываться с константной или вариативной областью антитела. Варианты SIRP- α , способные связываться с одним или несколькими антителами, описаны подробно далее в настоящем документе. В других вариантах осуществления другие варианты SIRP- α , такие как варианты, описанные в международной публикации № WO 2013/109752 (включенной здесь посредством ссылки), могут быть присоединены к опухоль-специфическому антителу, или белку, или пептиду, например антитело-связывающему пептиду, способному связываться с опухоль-специфическим антителом. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α может быть присоединен к антителу *in vitro* (до введения человеку) или *in vivo* (после введения).

В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α может дополнительно включать D2 и/или D3 домен человеческого SIRP- α дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α может быть присоединен к мономеру Fc-домена, человеческому сывороточному альбумину (HSA), сывороточному связывающему белку или пептиду или органической молекуле, например полимеру (например, полиэтиленгликолю (PEG)), для улучшения фармакокинетических свойств варианта SIRP- α , например увеличения периода полувыведения из сыворотки. Мономеры Fc-домена, белки HSA, сывороточные связывающие белки или пептиды и органические молекулы, такие как PEG, которые служат для увеличения периода полувыведения из сыворотки вариантов SIRP- α согласно изобретению, описаны подробно далее в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α не включает последовательность любой из SEQ ID NO:3-12 и 24-34.

II. Аминокислотные замены остатками гистидина в вариантах SIRP- α .

В некоторых вариантах осуществления, дополнительно к аминокислотным заменам в варианте SIRP- α , перечисленным в табл. 2, вариант SIRP- α может включать одну или несколько аминокислотных замен остатками гистидина. Конструкции варианта SIRP- α , включающие вариант SIRP- α , связываются с

более высокой аффинностью с CD47 на пораженных заболеванием клетках или в пораженном заболеванием участке, чем на непораженных заболеванием клетках, и в условиях, характерных для пораженного заболеванием участка (например, кислые значения pH, гипоксия), чем в физиологических условиях. Аминокислотные остатки, подлежащие замене на остатки гистидина, могут быть идентифицированы с использованием гистидин-сканирующего мутагенеза, кристаллических структур белков и методов компьютерного дизайна и моделирования.

Технологии и способы, которые могут быть использованы для создания вариантов SIRP- α , и способы определения аффинностей их связывания с CD47 на пораженных или непораженных заболеванием клетках, описаны подробно далее в настоящем документе. Замены остатками гистидина могут быть локализованы на границе между вариантом SIRP- α и CD47 или во внутренних областях варианта SIRP- α . Предпочтительно замены остатками гистидина локализованы на границе между вариантом SIRP- α и CD47. В табл. 4 перечислены определенные аминокислоты SIRP- α , которые могут быть заменены на остатки гистидина. Нумерация аминокислот в табл. 4 представлена относительно последовательности SEQ ID NO: 3; одна или несколько аминокислот в соответствующих положениях в любой из последовательностей SEQ ID NO: 4-12 может быть также заменена на остатки гистидина. Контактные остатки представляют собой аминокислоты, расположенные на границе между вариантом SIRP- α и CD47. Внутренние остатки представляют собой внутренние аминокислоты, напрямую не вовлеченные в связывание между вариантом SIRP- α и CD47. Варианты SIRP- α могут включать одну или несколько (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять и т.д. или все) замен, перечисленных в табл. 4. Варианты SIRP- α могут содержать максимум 20 гистидиновых замен.

Таблица 4

Аминокислотные замены SIRP- α (нумерация аминокислот относительно последовательности SEQ ID NO: 3)

Контактные остатки	S29H, L30H, I31H, P32H, V33H, G34H, P35H, Q52H, K53H, E54H, L66H, T67H, K68H, R69H, F74H, K93H, K96H, G97H, S98H, D100H
Внутренние остатки	L4H, V6H, A27H, I36H, F39H, E47H, L48H, I49H, Y50H, F57H, V60H, M72H, F74H, I76H, V92H, F94H, E103H

III. pH-зависимое связывание.

Исследования показали, что опосредованный опухолевыми клетками онкогенный метаболизм генерирует большое количество молочной кислоты и протонов, что приводит к снижению значений внеклеточного pH до 6 в опухолевой ткани (Icard et al., Biochim. Biophys. Acta. 1826:423-433, 2012). В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α , включающие вариант SIRP- α , сконструированы для связывания с высокой аффинностью с CD47 в условиях кислого pH, а не в условиях нейтрального pH (например, pH около 7,4). Таким образом, конструкции варианта SIRP- α согласно изобретению сконструированы для селективного связывания с CD47 на пораженных заболеванием клетках (например, опухолевых клетках) или на клетках в пораженном заболеванием участке (например, клетках в микроокружении опухоли, поддерживающем рост опухоли), а не на непораженных заболеванием клетках.

В одном варианте осуществления для создания pH-зависимого связывания конструкции варианта SIRP- α согласно изобретению мутагенез гистидина может быть выполнен на варианте SIRP- α , особенно на участке SIRP- α , который взаимодействует с CD47. Кристаллические структуры комплекса SIRP- α и CD47 (см., например, PDB ID No. 2JJS) и компьютерное моделирование могут быть использованы для визуализации трехмерного участка связывания SIRP- α и CD47. Методы компьютерного дизайна и моделирования, которые можно использовать для конструирования белка с pH-чувствительными свойствами связывания, известны в литературе и описаны, например, в работе Strauch et al., Proc Natl Acad Sci 111:675-80, 2014, полное содержание которой включено здесь посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления компьютерное моделирование может быть использовано для идентификации ключевых контактных остатков на границе раздела SIRP- α и CD47. Идентифицированные ключевые контактные остатки могут быть заменены на остатки гистидина с использованием доступного программного обеспечения для дизайна белков (например, RosettaDesign), с помощью которого можно создавать различные дизайны белков, которые могут быть оптимизированы, фильтрованы и ранжированы на основе вычисленной энергии связывания и комплементарности формы. Таким образом, энергетически благоприятные гистидиновые замены в определенных аминокислотных положениях могут быть идентифицированы с использованием методов компьютерного дизайна. Компьютерное моделирование также может быть использовано для прогнозирования изменения в трехмерной структуре SIRP- α . Можно избежать гистидиновых замен, которые генерируют значительное изменение в трехмерной структуре SIRP- α .

После идентификации энергетически и структурно оптимальных аминокислотных замен аминокислоты могут быть последовательно заменены на остатки гистидина. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько (например, одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять и

т.д., максимум 20) аминокислот SIRP- α могут быть заменены на остатки гистидина. В частности, аминокислоты, расположенные на границе раздела SIRP- α и CD47, предпочтительно аминокислоты, непосредственно вовлеченные в связывание SIRP- α с CD47, могут быть заменены на остатки гистидина. Вариант SIRP- α может включать одну или несколько (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять и т.д., максимум 20) замен на остатки гистидина. В других вариантах осуществления природные гистидиновые остатки SIRP- α могут быть заменены на другие аминокислотные остатки. В еще других вариантах осуществления одна или несколько аминокислот SIRP- α могут быть заменены на негистидиновые остатки для воздействия на связывание природных или замененных гистидиновых остатков с CD47. Например, замена аминокислот, окружающих природный гистидиновый остаток, на другие аминокислоты может "похоронить" природный гистидиновый остаток. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты, непосредственно не вовлеченные в связывание с CD47, т.е. внутренние аминокислоты (например, аминокислоты, локализованные в ядре SIRP- α), также могут быть заменены на остатки гистидина. В таблице 4 приводится перечень специфических аминокислот SIRP- α , которые могут быть заменены на гистидиновые или негистидиновые остатки. Контактные остатки представляют собой аминокислоты, локализованные на границе раздела SIRP- α и CD47. Коровые остатки представляет собой внутренние аминокислоты, которые непосредственно не участвуют в связывании между SIRP- α и CD47. Варианты SIRP- α могут включать одну или несколько (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять и т.д. или все) замен, перечисленных в табл. 4.

Варианты SIRP- α , содержащие одну или несколько (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять и т.д., максимум 20) замен на остатки гистидина, могут быть подвергнуты тестированию на их связывание с CD47 в условиях различных значений pH (например, pH 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,4, 8). В некоторых вариантах осуществления для тестирования связывания может быть использован очищенный белок CD47. Различные методики, известные специалистам в данной области, могут быть использованы для измерения константы аффинности (K_A) или константы диссоциации (K_D) комплекса вариант SIRP- α /CD47 в условиях различных значений pH (например, при pH 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,4, 8). В предпочтительном варианте осуществления аффинность связывания варианта SIRP- α с CD47 может быть определена с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса (например, система поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore3000™, Biacore, INC, Piscataway N.J.). В иллюстративном варианте осуществления вариант SIRP- α с pH-зависимым связыванием, который специфически связывается с CD47 с более высокой аффинностью при pH 6, чем при pH 7,4, проявляет более низкое значение K_D при pH 6, чем при pH 7,4.

IV. Зависимое от гипоксии связывание.

Гипоксия опухоли представляет собой состояние, при котором опухолевые клетки имеют недостаток кислорода. По мере роста опухоли ее кровоснабжение постоянно перенаправляется в наиболее быстро растущие части опухоли, оставляя части опухоли, имеющие значительно более низкую концентрацию кислорода, чем в здоровых тканях.

В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α может быть присоединен к активированному гипоксией пролекарству, которое может способствовать повышению эффективности варианта SIRP- α против соответствующих пораженных заболеванием клеток в специфических условиях гипоксии. Активированные гипоксией пролекарства известны в литературе, такие как пролекарства, описанные в работе Kling et al. (Nature Biotechnology, 30:381, 2012), включенной здесь посредством ссылки.

V. Связывание антитела.

Другой стратегией обеспечения селективной активности SIRP- α в пораженном заболеванием участке по сравнению с непораженным заболеванием участком является присоединение белка SIRP- α к белку или пептиду, который может связываться с областью антитела. Предпочтительно антитело является специфическим по отношению к пораженной заболеванием клетке, например, опухолевой клетке. Например, антитело может специфически связываться с белком клеточной поверхности на пораженной заболеванием клетке, например опухолевой клетке. Белок SIRP- α может связываться с антителом обратимо или необратимо.

Общее связывание антитела.

В некоторых вариантах осуществления для конструирования белка SIRP- α , который может связываться с различными антителами благодаря специфичности антитела, белок SIRP- α может быть слит с белком или пептидом, который распознает константную область антитела, например константный домен C_{H2} или C_{H3} Fc-домена антитела. Белок SIRP- α способен связываться с CD47 и имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную последовательности SIRP- α дикого типа (например, вариант 1 (SEQ ID NO: 1, показанный ниже)) или последовательности CD47-связывающей части SIRP- α дикого типа (например, последовательность любой из SEQ ID NO: 3-12, представленных в табл. 1).

SEQ ID NO: 1:

1 mepagpapgr lgpplcllla ascawsgvag eelqviqpd ksvlvaaget atrctatsl
 61 ipvgpiqwfr gagpgreliy nqkeghfprv ttvsltlkm nmdfsirign itpadagtyy
 121 cvkfrkgsdp dvefksgagt elsvrakpsa pvvsgpaara tpqhtvsftc eshgfsprdi
 181 tlkwfkngne lsdfqtnvdp vgesvsysih stakvvltre dvhsqvicev ahvtlqgdpl
 241 rgtanlseti rvpptlevtq qpvrænqvn vtcqvrkfyp qrlqltwlen gnvstretas
 301 tvtenkdgtv nwmswllvvn sahrddvklc cqvehdgqpa vskshdlkvs ahpkqegsnt
 361 aaentgsner niyivvgvvc tllvallmaa lylvrirqkk aqgstsstrl hepeknarei
 421 tqdntditya dlnlpgkkip apqaaepnnh teyasiqtsp qpasedltly adldmvhlmr
 481 tpkqpapke psfsevasvq vprk

CD47-связывающая часть SIRP- α дикого типа включает D1-домен SIRP- α дикого типа (например, последовательность любой из SEQ ID NO: 3-12, перечисленных в табл. 1). Белки и пептиды, демонстрирующие общее связывание с константной областью антитела, известны в данной области. Например, бактериальные антитело-связывающие белки, например белки A, G и L, связываются с константными областями антитела. Белки A и G связываются с F-доменами, тогда как белок L связывается с константной областью легкой цепи. В иллюстративном варианте осуществления белок A, G или L может быть слит с N- или C-концом белка SIRP- α . Предпочтительно в этом варианте осуществления белок слияния, состоящий из белка A, G или L и белка SIRP- α , присоединен посредством химической конъюгации к антителу до введения для предотвращения связывания белка слияния с различными другими антителами в сыворотке. Белок A, G или L может быть также включен и подвергнут скринингу с использованием общепринятых методов в данной области (например, направленного развития и дисплейных библиотек) на повышенную аффинность связывания с константными областями антитела. В некоторых вариантах осуществления белок SIRP- α может быть напрямую присоединен к антителу с использованием общепринятых технологий генетической или химической конъюгации в данной области. В других вариантах осуществления белок SIRP- α может быть также присоединен к антителу с помощью спейсера, который обеспечивает дополнительную структурную и пространственную гибкость белка. Различные спейсеры описаны подробно далее в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления белок SIRP- α может быть связан напрямую или посредством антитело-связывающего белка или пептида с антителом обратимо или необратимо. Кроме того, скрининг модифицированных антител, которые могут быть использованы в соответствии с описанными здесь вариантами осуществления изобретения, может быть проведен, как описано, например, в публикации патента США 20100189651.

Другие белки или пептиды, способные связываться с константной областью антитела, и способы скрининга таких белков или пептидов описаны в публикации патента США US20120283408, полное содержание которого включено здесь посредством ссылки.

Специфическое связывание антител.

В некоторых вариантах осуществления для обеспечения селективного нацеливания вариантов SIRP- α на пораженный заболеванием участок и для конструирования варианта SIRP- α , способного связываться со специфическим антителом, например опухоль-специфическим антителом, конструкция варианта SIRP- α может включать вариант SIRP- α и антитело-специфический белок или пептид. Вариант SIRP- α может быть слит с антитело-специфическим белком или пептидом (например, антитело-связывающим пептидом). Предпочтительно белок или пептид специфически связывается с опухоль-специфическим антителом. В некоторых вариантах осуществления белок слияния, состоящий из варианта SIRP- α и антитело-связывающего белка или пептида, может быть совместно введен с опухоль-специфическим антителом в комбинированной терапии. В других вариантах осуществления белок слияния и опухоль-специфическое антитело могут быть введены отдельно, например, с интервалом в нескольких часов, предпочтительно с введением в первую очередь антитела. В еще других вариантах осуществления перед введением белок слияния может быть ковалентно присоединен к опухоль-специфическому антителу с использованием генетических или химических методов, широко известных в данной области.

Примеры антитело-связывающих пептидов включают пептид, локализованный в участке заболевания (DLP) (SEQ ID NO: 64 или 65), низкомолекулярный пептид, который может связываться с центром антиген-связывающего фрагмента (Fab) цетуксимаба (смотри, например, Donaldson et al., Proc Natl Acad Sci USA. 110: 17456-17461, 2013). Цетуксимаб представляет собой антитело, относящееся к классу IgG1, специфично связывающееся с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR). Антитело-связывающие пептиды, которые могут быть слиты с вариантом SIRP- α , включают, но без ограничения, пептиды, имеющие аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75% идентичную последовательности DLP (SEQ ID NO: 64 или 65) или ее фрагменту. В некоторых вариантах осуществления антитело-связывающий пептид имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64.

В недавнем исследовании было показано, что SIRP- α усиливает фагоцитоз *in vitro* клеток DLD-1 в комбинации с антителом цетуксимабом (Weiskopf et al., Science, 341: 88-91, 2013). В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α может быть слит со специфическим антитело-связывающим пептидом, например DLP, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64. В этих вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α , включающая вариант SIRP- α и DLP, может проявлять свою активность в цетуксимаб-связанных экспрессирующих EGFR опухолях. Это, в свою очередь, может дополнительно улучшить доставку конструкции варианта SIRP- α , включающей вариант SIRP- α и DLP, и цетуксимаб анти-EGFR восприимчивым пациентам. Пример конструкции варианта SIRP- α , включающей вариант SIRP- α и DLP, представлен в SEQ ID NO: 66, в которой часть с единичным подчеркиванием обозначает DLP и выделенная жирным шрифтом часть обозначает вариант SIRP- α . Последовательность варианта SIRP- α (выделенная жирным шрифтом часть) в SEQ ID NO: 66 может быть заменена на последовательность любого описанного здесь варианта SIRP- α . Другие антитело-связывающие пептиды также могут быть слиты с вариантом SIRP- α . Такие антитело-связывающие пептиды включают, но без ограничения, пептиды, которые могут специфически связываться с антителами, такими как цетуксимаб, пембролизумаб, ниволумаб, пидилизумаб, MEDI0680, MEDI6469, ипилимумаб, тремелиумаб, урелумаб, вантитумаб, варлилумаб, могамализумаб, анти-CD19 антитело, анти-CS1 антитело, герцептин, трастузумаб и/или пертузумаб.

SEQ ID NO: 66:

CQFDLSTRRLKCGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEELQHQPDKSVLVAAGETATLRC
TITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITP
ADAGTYCYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG
CQFDLSTRRLKC

В некоторых вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α , включающая вариант SIRP- α и DLP, может быть дополнительно комбинирована с блокирующим пептидом на основе CD47, описанным здесь, для блокирования связывания варианта SIRP- α в конструкции до достижения конструкцией пораженного заболеванием участка, где расщепляемый линкер может расщепляться. В этих вариантах осуществления терапевтическое окно может быть расширено, так как конструкция варианта SIRP- α , содержащая вариант SIRP- α , блокирующий пептид на основе CD47 и DLP, аккумулируется в пораженном заболеванием участке и проявляет активность только в пораженном заболеванием участке после индуцированного протеазой (например, опухоль-специфической протеазой) расщепления линкера или другими характеристиками пораженного участка (например, кислым pH, гипоксией).

В некоторых вариантах осуществления белки или пептиды, способные связываться с опухоль-специфическими антителами, могут быть идентифицированы с использованием методик, обычно используемых в данной области, таких как направленное развитие и дисплейные библиотеки, например библиотека фагового дисплея. Способы и методики, направленные на идентификацию белков и пептидов, способных связываться с опухоль-специфическими антителами, известны в данной области, такие как описанные в работе Donaldson et al. (Proc. Natl. Acad. Sci., 110:17456-61, 2013), полное содержание которой включено здесь посредством ссылки. В библиотеке фагового дисплея потенциальный антитело-специфический белок или пептид, как правило, ковалентно связан с белком оболочки бактериофага. Связь возникает в результате трансляции нуклеиновой кислоты, кодирующей белок или пептид, слитый с белком оболочки. Экспонирующий пептид бактериофаг может быть выращен и собран с использованием стандартных методов приготовления фагов, например осаждения PEG из ростовой среды. Эти экспонирующие фаги могут быть затем подвергнуты скринингу против других белков, например опухоль-специфических антител, для выявления взаимодействия между экспонированным белком и опухоль-специфическими антителами. После идентификации опухоль-специфического белка или пептида нуклеиновая кислота, кодирующая выбранный опухоль-специфический белок или пептид, может быть выделена из клеток, инфицированных выбранными фагами, или из самих фагов после амплификации. Индивидуальные колонии или пятна могут быть отобраны, и нуклеиновая кислота может быть выделена и секвенирована. После идентификации и выделения антитело-специфического белка или пептида белок или пептид может быть слит с N- или C-концом варианта SIRP- α . В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α может быть напрямую присоединен к опухоль-специфическому антителу с использованием общепринятых технологий генетической или химической конъюгации. В других вариантах осуществления вариант SIRP- α может быть также присоединен к опухоль-специфическому антителу с помощью спейсера, который обеспечивает дополнительную структурную и пространственную гибкость белка. Различные спейсеры описаны подробно далее в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α может связываться напрямую или через антитело-связывающий белок или пептид с антителом обратимо или необратимо.

В других вариантах осуществления SIRP- α дикого типа или внеклеточный D1-домен SIRP- α дикого типа (например, последовательность любой из SEQ ID NO: 3-12, перечисленных в табл. 1) может быть

присоединен к опухоль-специфическому антителу. Предпочтительно D1-домен SIRP- α присоединен к опухоль-специфическому антителу. Опухоль-специфическое антитело служит в качестве нацеливающего фрагмента для доставки SIRP- α дикого типа или D1-домена в пораженный заболеванием участок, например, участок локализации рака, например, внутрь солидной опухоли, где SIRP- α дикого типа или D1-домен может взаимодействовать с CD47 на пораженных заболеванием клетках. В некоторых вариантах осуществления SIRP- α дикого типа или внеклеточный D1-домен SIRP- α дикого типа может быть напрямую присоединен к опухоль-специфическому антителу с использованием общепринятых в данной области технологий генетической или химической конъюгации. В других вариантах осуществления SIRP- α дикого типа или внеклеточный D1-домен SIRP- α дикого типа может быть также присоединен к опухоль-специфическому антителу с помощью спейсера, который обеспечивает дополнительную структурную и пространственную гибкость белка. Различные спейсеры описаны подробно далее в настоящем документе. В других вариантах осуществления SIRP- α дикого типа или внеклеточный D1-домен SIRP- α дикого типа может быть слит с указанным выше белком или пептидом, способным связываться с опухоль-специфическим антителом. В еще других вариантах осуществления другие полипептиды SIRP- α , такие как описанные в международной публикации WO 2013/109752 (включенной здесь посредством ссылки), могут быть присоединены к опухоль-специфическому антителу или белку, или пептиду, способному связываться с опухоль-специфическим антителом. В некоторых вариантах осуществления SIRP- α дикого типа или внеклеточный D1-домен SIRP- α дикого типа может связываться напрямую или через антитело-связывающий белок или пептид с антителом обратимо или необратимо.

VI. Блокирующие пептиды.

Блокирующий пептид может быть присоединен к варианту SIRP- α с помощью расщепляемого линкера. В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид может быть также нековалентно присоединен к варианту SIRP- α . Блокирующий пептид способствует блокированию CD47-связывающего участка варианта SIRP- α таким образом, что вариант SIRP- α не может связываться с CD47 на клеточной поверхности непораженных заболеванием клеток в физиологических условиях (например, нейтральном pH и адекватной концентрации кислорода). В ненормальных условиях (т.е. кислой и/или гипоксической среде или среде с повышенной экспрессией протеазы) в пораженном заболеванием участке, таком как участок локализации рака, например внутри опухоли, расщепляемый линкер может быть расщеплен с высвобождением варианта SIRP- α от блокирующего пептида. Вариант SIRP- α будет затем свободен для связывания с CD47 на близлежащих опухолевых клетках. Примеры расщепляемых линкеров описаны подробно далее в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид обладает более высокой аффинностью в отношении SIRP- α дикого типа, чем сконструированного варианта SIRP- α . После расщепления линкера блокирующий пептид диссоциирует от варианта SIRP- α и может связываться с SIRP- α дикого типа. Блокирующий пептид с различными аффинностями связывания с SIRP- α дикого типа и вариантом SIRP- α может быть идентифицирован с использованием способов и методик, широко известных в данной области, например, направленного развития и дисплейных библиотек (например, фагового или дрожжевого дисплея). В одном иллюстративном варианте осуществления нуклеотид, кодирующий область связывания CD47 с SIRP- α , или нуклеотид, кодирующий вариабельную область анти-SIRP- α антитела, может быть мутирован и/или рекомбинирован случайным образом для создания большой библиотеки вариантов генов с использованием технологий, таких как, например, ПЦП пониженной точности и перестановка в ДНК. После создания генетической библиотеки мутантные пептиды, кодированные нуклеотидами, могут быть подвергнуты скринингу на их способность связываться с SIRP- α дикого типа и вариантом SIRP- α с использованием, например, фагового или дрожжевого дисплея. Идентифицированные пептиды, которые могут связываться с SIRP- α дикого типа и вариантом SIRP- α , могут быть подвергнуты второму процессу скрининга, в результате чего могут быть выделены белки, которые связываются с более высокой аффинностью с SIRP- α дикого типа, чем с вариантом SIRP- α . Идентифицированные пептиды после связывания с SIRP- α дикого типа и вариантом SIRP- α должны предотвращать связывание CD47 с SIRP- α дикого типа или вариантом SIRP- α . Различные методики, известные специалистам в данной области, могут быть использованы для измерения константы аффинности (K_A) или константы диссоциации (K_D) комплекса вариант SIRP- α /блокирующий пептид или комплекса SIRP- α дикого типа/блокирующий пептид. Блокирующий пептид может связываться с SIRP- α дикого типа с аффинностью, которая в три раза превышает аффинность связывания с вариантом SIRP- α .

Блокирующие пептиды на основе CD47.

Блокирующий пептид может представлять собой полипептид миметика CD47 или фрагмент CD47, который связывается с вариантом SIRP- α , описанным здесь. Некоторые блокирующие пептиды могут связываться с вариантом SIRP- α в участке, который отличается от участка связывания с CD47. Некоторые блокирующие пептиды могут связываться с вариантом SIRP- α отличным от CD47 образом. В некоторых случаях блокирующий пептид может содержать по меньшей мере одну стабилизирующую дисульфидную связь. Блокирующий пептид может содержать полипептидную последовательность

CERVIGTGWVRC или ее фрагмент или вариант. Вариантный блокирующий пептид может содержать одну или более чем одну консервативную или неконсервативную модификацию. В некоторых случаях вариантный блокирующий пептид может содержать модификации цистеина на серин и/или одну или несколько модификаций аспарагина на глутамин. Блокирующий пептид может связываться с вариантом SIRP- α в том же самом участке, что и пептид, который содержит полипептидную последовательность CERVIGTGWVRC или ее вариант или фрагмент. Блокирующий пептид может содержать полипептидную последовательность GNYTCEVTELTREGETHIELK или ее фрагмент или вариант. Блокирующий пептид может связываться с вариантом SIRP- α в том же самом участке, что и пептид, который содержит полипептидную последовательность GNYTCEVTELTREGETHIELK или ее вариант или фрагмент. В некоторых случаях блокирующий пептид может содержать полипептидную последовательность EVTELTREGE или ее фрагмент или вариант. Блокирующий пептид может связываться с вариантом SIRP- α в том же самом участке, что и пептид, который содержит полипептидную последовательность EVTELTREGE или ее вариант или фрагмент. В некоторых случаях блокирующий пептид может содержать полипептидную последовательность CEVTELTREGES или ее фрагмент или вариант. Блокирующий пептид может связываться с вариантом SIRP- α в том же самом участке, что и пептид, который содержит полипептидную последовательность CEVTELTREGES или ее вариант или фрагмент.

В настоящем документе предлагаются конструкции варианта SIRP- α , содержащие вариант SIRP- α и блокирующий пептид, при этом блокирующий пептид может содержать полипептидную последовательность SEVTELTREGET или ее фрагмент или вариант. Блокирующий пептид может связываться с вариантом SIRP- α в том же самом участке, что и пептид, который содержит полипептидную последовательность SEVTELTREGET или ее вариант или фрагмент. В некоторых случаях блокирующий пептид может содержать полипептидную последовательность GQYTSEVTELTREGETHIELK или ее фрагмент или вариант. Блокирующий пептид может связываться с вариантом SIRP- α в том же самом участке, что и пептид, который содержит полипептидную последовательность GQYTSEVTELTREGETHIELK или ее вариант или фрагмент.

В некоторых случаях блокирующий пептид может представлять собой полипептид варианта CD47, который проявляет более высокую аффинность в отношении SIRP- α дикого типа по сравнению с вариантом SIRP- α . По сравнению с CD47 дикого типа блокирующий полипептид может содержать по меньшей мере одну из следующих мутаций: T102Q, T102H, L101Q, L101H и L101Y. По сравнению с CD47 дикого типа блокирующий полипептид может содержать введение дополнительного остатка глицина на N-конце или вблизи него. Глицин может быть введен в непосредственной близости от глутамина и/или лейцина на N-конце CD47 или вблизи него. В некоторых случаях блокирующий пептид может представлять собой полипептид варианта CD47, который проявляет более низкую аффинность в отношении варианта SIRP- α по сравнению с CD47 дикого типа. Такие полипептиды варианта CD47 легко идентифицируют и тестируют с использованием описанных здесь способов.

В настоящем изобретении предлагаются конструкции варианта SIRP- α , содержащие вариант SIRP- α , описанный здесь, при этом указанный вариант SIRP- α соединен с блокирующим пептидом, описанным здесь, с помощью по меньшей мере одного линкера. Вариант SIRP- α может содержать такой же участок связывания с CD47, как SIRP- α дикого типа. Вариант SIRP- α может содержать одну или несколько мутаций или вставок по сравнению с SIRP- α дикого типа. Вариант SIRP- α может представлять собой усеченную форму SIRP- α дикого типа. Блокирующий пептид может представлять собой миметик, вариант или фрагмент CD47, описанный здесь. Блокирующий пептид может проявлять более высокую аффинность в отношении SIRP- α дикого типа по сравнению с вариантом SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α . Блокирующий пептид может представлять собой полипептид варианта CD47, который демонстрирует более низкую аффинность в отношении варианта SIRP- α по сравнению с CD47 дикого типа. Линкер может представлять собой по меньшей мере один линкер, который необязательно расщепляется одной или несколькими протеазами, и необязательно также содержит один или несколько спейсеров. Расщепляемый линкер может содержать последовательность LSGRSDNH. Спейсеры могут содержать одно или несколько звеньев глицин-сериновых спейсеров, при этом каждое звено может содержать последовательность GGGGS.

В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид, который присоединен к варианту SIRP- α с помощью расщепляемого линкера, представляет собой SIRP- α -связывающий пептид, полученный из CD47 (т.е. блокирующий пептид на основе CD47). В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид на основе CD47 получен из SIRP- α -связывающей части CD47. SIRP- α -связывающая часть CD47 часто называется как домен супер семейства иммуноглобулинов (IgSF) CD47, последовательность которого показана ниже (SEQ ID NO: 35; Ref. NP 0017681).

SEQ ID NO: 35: дикого типа, IgSF-домен человеческого CD47:

1-50 QLLFNKTKSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF

51-100 DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE

101-123 LTREGETHIE LKYRVVSWFS PNE

В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид на основе CD47 содержит IgSF-домен CD47 полной длины (SEQ ID NO: 35) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид на основе CD47 содержит одну или несколько аминокислотных замен, делеций и/или добавок относительно IgSF-домена CD47 дикого типа (SEQ ID NO: 35) или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид на основе CD47 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% (например, 83, 86, 90, 93, 96% и т.д.) идентичную последовательности IgSF-домена CD47 дикого типа (SEQ ID NO: 35) или его фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены, делеции и/или добавления в блокирующий пептид на основе CD47 приводят к образованию блокирующего пептида на основе CD47, обладающего низкой аффинностью связывания в отношении варианта SIRP- α и относительно более высокой аффинностью связывания в отношении SIRP- α дикого типа. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены в блокирующем пептиде на основе CD47 локализованы на границе между CD47 и SIRP- α . Например, аминокислотная замена T102Q в IgSF-доме CD47 вступает в стерический конфликт с аминокислотной заменой A27I в варианте SIRP- α , тогда как SIRP- α дикого типа, имеющий A27, не будет вступать в стерический конфликт с аминокислотной заменой T102Q (см. фиг. 2). Таким образом, блокирующий пептид на основе CD47, имеющий T102Q, будет связываться с более высокой аффинностью с SIRP- α дикого типа, имеющим A27, чем с вариантом SIRP- α , имеющим A27I. Примеры аминокислотных замен в блокирующем пептиде на основе CD47, которые могут создавать стерические конфликты со специфическими аминокислотами в варианте SIRP- α , приведены в табл. 5. Каждая из этих аминокислотных замен в блокирующем пептиде на основе CD47 может уменьшать аффинность связывания блокирующего пептида на основе CD47 с вариантом SIRP- α в зависимости от специфической аминокислоты в варианте SIRP- α в участке взаимодействия SIRP- α -CD47.

Таблица 5

Примеры аминокислотных замен в блокирующем пептиде на основе CD47, которые могут создавать стерические конфликты со специфическими аминокислотами в варианте SIRP- α

Аминокислотная замена в блокирующем пептиде на основе CD47 (нумерация аминокислот относительно SEQ ID NO: 35)	Аминокислота в варианте SIRP- α (нумерация аминокислот относительно любой из SEQ ID NO: 13-23)
T102Q	27I
T102H	27I
L101Q	31F
L101H	31F
L101Y	31F

Дополнительно к созданию стерических конфликтов между блокирующим пептидом на основе CD47 и вариантом SIRP- α для разрушения специфических нековалентных взаимодействий между блокирующим пептидом на основе CD47 и вариантом SIRP- α могут быть также использованы аминокислотные замены, добавления и/или делеции, уменьшая тем самым аффинность связывания блокирующего пептида на основе CD47 с вариантом SIRP- α . В некоторых вариантах осуществления удлинение N-конца блокирующего пептида на основе CD47 с помощью одной или нескольких аминокислот (например, одной аминокислоты) путем добавления одной или нескольких аминокислот непосредственно к N-концу и/или путем вставки одной или нескольких аминокислот между другими аминокислотами на N-конце разрушает нековалентные взаимодействия (например, взаимодействия посредством водородного связывания) между N-концом блокирующего пептида на основе CD47 и вариантом SIRP- α . Например, добавление аминокислот, например добавление глицина на N-конце блокирующего пептида на основе CD47, будет предотвращать циклизацию глутамина в пироглутамат на N-конце, а также создавать нежелательные контакты и взаимодействия, которые вполне вероятно будут разрывать взаимодействия посредством водородного связывания между N-концевым пироглутаматом блокирующего пептида на основе CD47 и аминокислотой L66 в SIRP- α дикого типа или аминокислотной заменой L66T в варианте SIRP- α (см. также пример 5). В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток, например глицин, добавляют на N-конце блокирующего пептида на основе CD47 таким образом, что N-конец CD47 изменяется с QLLFNK на QLLFNK или QGLLFNK. Выбор аминокислотных замен, делеций и/или добавлений в блокирующий пептид на основе CD47 будет зависеть от специфических аминокислотных замен в варианте SIRP- α .

Кроме того, слияние N-конца блокирующего пептида на основе CD47 с C-концом варианта SIRP- α посредством расщепляемого линкера и необязательно одного или нескольких спейсеров также влияет на

связывающие взаимодействия между блокирующим пептидом на основе CD47 и вариантом SIRP- α и уменьшает аффинность связывания блокирующего пептида на основе CD47 с вариантом SIRP- α . В некоторых вариантах осуществления в конструкции варианта SIRP- α N-конец блокирующего пептида на основе CD47 слит с C-концом варианта SIRP- α с помощью расщепляемого линкера и необязательно одного или нескольких спейсеров. В некоторых вариантах осуществления в конструкции варианта SIRP- α C-конец блокирующего пептида на основе CD47 слит с N-концом варианта SIRP- α с помощью расщепляемого линкера и необязательно одного или нескольких спейсеров. Примеры расщепляемых линкеров и спейсеров описаны подробно далее в настоящем документе.

Иллюстративные блокирующие пептиды на основе CD47 показаны в табл. 6. В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид на основе CD47 имеет или включает последовательность SEVTELTREGET (SEQ ID NO: 38). В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид на основе CD47 имеет или включает последовательность GQYTSEVTELTREGETIIEIK (SEQ ID NO: 40).

Таблица 6

SEQ ID NO	Блокирующие пептиды на основе CD47	Часть IgSF-домена CD47
36	EVTELTREGE	Аминокислоты 97-106 SEQ ID NO: 35
37	CEVTELTREGE C	Аминокислоты 96-107 SEQ ID NO: 35 с T125C
38	SEVTELTREGET	Аминокислоты 96-107 SEQ ID NO: 35 с C96S
39	GNYTCEVTELTREGETIIEIK	Аминокислоты 92-112 SEQ ID NO: 35
40	GQYTSEVTELTREGETIIEIK	Аминокислоты 92-112 SEQ ID NO: 35 с N93Q и C96S
41	QLLFNKT KSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE QTREGETIIE LKYRVVSWFS PNE	IgSF-домен CD47 с L101Q
42	QLLFNKT KSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE YTREGETIIE LKYRVVSWFS PNE	IgSF-домен CD47 с L101Y
43	QLLFNKT KSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE HTREGETIIE LKYRVVSWFS PNE	IgSF-домен CD47 с L101H
44	QLLFNKT KSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE LQREGETIIE LKYRVVSWFS PNE	IgSF-домен CD47 с T102Q

45	QLLFNKT SV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SQLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE L H REGETIIE LKYRVVSWFS PNE	IgSF-домен CD47 с T102H
46	G QLLFNKT SV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SQLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE L T REGETIIE LKYRVVSWFS PNE	IgSF-домен CD47 с добавлением N- концевого глицина

VII. Расщепляемые линкеры.

В некоторых вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α включает вариант SIRP- α , присоединенный к блокирующему пептиду. В некоторых вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α включает SIRP- α дикого типа, присоединенный к блокирующему пептиду. Линкер, используемый для слияния варианта SIRP- α или SIRP- α дикого типа и блокирующего пептида, может представлять собой расщепляемый линкер или нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления предпочтительное связывание варианта SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α с CD47 на пораженных заболеванием клетках или в пораженных заболеванием участках может быть получено путем присоединения блокирующего пептида к варианту SIRP- α с помощью расщепляемого линкера, который расщепляется на пораженных заболеванием клетках или в пораженных заболеванием участках.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер используют между вариантом SIRP- α и блокирующим пептидом. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер может быть введен в пределах блокирующего пептида, который может быть нековалентно связан с вариантом SIRP- α для блокирования связывания варианта SIRP- α с CD47 в физиологических условиях. Расщепляемый линкер может расщепляться в определенных условиях. Если расщепляемый линкер находится в пределах блокирующего пептида, расщепление линкера будет инактивировать блокирующий пептид. В условиях, характерных для пораженного заболеванием участка, такого как участок локализации рака, например внутри опухоли, линкер расщепляется с высвобождением варианта SIRP- α от блокирующего пептида таким образом, что вариант SIRP- α может связываться с близлежащим CD47 на клеточной поверхности пораженных заболеванием клеток, например опухолевых клеток. В этом случае в конструкции SIRP- α , которая включает вариант SIRP- α и блокирующий пептид, вариант SIRP- α может связываться с CD47 только на пораженных заболеванием клетках (например, на опухолевых клетках) или на клетках в пораженном заболеванием участке (например, на клетках в микроокружении опухоли, поддерживающем рост опухоли) и не способен связываться с CD47 на непораженных заболеванием клетках в физиологических условиях, так как расщепляемый линкер остается стабильным в физиологических условиях, и участок связывания с CD47 варианта SIRP- α будет блокирован блокирующим пептидом. Расщепляемый линкер может включать аминокислоты, органические малые молекулы или комбинацию аминокислот и органических малых молекул, которые расщепляют или индуцируют расщепление линкера в условиях, характерных для пораженного заболеванием участка, таких как кислые значения pH, гипоксия и повышенная экспрессия протеазы. Расщепляемые линкеры стабильны в физиологических условиях (например, нейтральном pH и адекватной концентрации кислорода). В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер не может расщепляться и блокирующий пептид может легко диссоциировать от варианта SIRP- α в пораженном заболеванием участке, в результате чего вариант SIRP- α является свободным для связывания с близлежащими CD47 на пораженных заболеванием клетках, например, опухолевых клетках. В этих вариантах осуществления варианты SIRP- α могут быть сконструированы таким образом, чтобы иметь pH-зависимое связывание с CD47, как подробно описано ранее. Варианты SIRP- α могут быть сконструированы для связывания с высокой аффинностью с CD47 в условиях кислого pH пораженного заболеванием участка, а не в условиях нейтрального pH (например, около pH 7,4) непораженного заболеванием участка. Таким образом, блокирующий пептид (например, блокирующий пептид на основе CD-47 или блокирующий белок на основе IgSF-домена CD47) может диссоциировать от варианта SIRP- α в условиях кислого pH пораженного заболеванием участка. В некоторых вариантах осуществления для конструирования pH-зависимого связывания варианта SIRP- α с CD47 в пораженном заболеванием участке гистидиновый мутагенез может быть выполнен на SIRP- α , особенно на области SIRP- α , которая взаимодействует с CD47.

pH-зависимые расщепляемые линкеры.

Одной из характерных особенностей участка локализации рака, например внутри опухоли, является кислое значение pH. В некоторых вариантах осуществления линкер может расщепляться в условиях кислого pH (например, pH менее чем около 7). Чувствительный к кислоте линкер является стабильным при физиологическом значении pH (например, pH около 7,4). Расщепление при кислом значении pH может

происходить посредством кислотного гидролиза или под действием белков, присутствующих и активных при кислотном pH пораженного заболеванием участка, такого как участок локализации рака, например, внутри опухоли. Кислотно-чувствительные линкеры могут включать фрагмент, такой как химическая функциональная группа или соединение, способное гидролизироваться в условиях кислого pH. Кислотно-чувствительные химические функциональные группы и соединения включают, но без ограничения, например, ацетали, кетали, тиомалеаматы, гидразоны и дисульфидные связи. Кислотно-чувствительные линкеры, а также кислотно-чувствительные химические группы и соединения, которые могут быть использованы в конструировании кислотно-чувствительных линкеров, хорошо известны в данной области и описаны в патентах США № 8748399, 5306809 и 5505931, работах Laurent et al., (Bioconjugate Chem. 21:5-13, 2010), Castaneda et al. (Chem. Commun. 49:8187-8189, 2013) и Ducry et al. (Bioconjug. Chem. 21:5-13, 2010), полное содержание которых включено здесь посредством ссылки. В одном варианте осуществления дисульфидная связь может быть введена в расщепляемый линкер с использованием пептидного синтезатора и/или общепринятых технологий химического синтеза. В другом варианте осуществления в качестве расщепляемого линкера может быть использована тиомалеамовая кислота (Castaneda et al. Chem. Commun. 49:8187-8189, 2013). В этом варианте осуществления для вставки линкера тиомалеамовой кислоты между вариантом SIRP- α и блокирующим пептидом одна из двух тиольных групп линкера тиомалеамовой кислоты (смотри, например, схему 2, Castaneda et al.) может быть присоединена к С-концу варианта SIRP- α , тогда как сложноэфирная группа линкера тиомалеамовой кислоты может быть присоединена к N-концу блокирующего пептида. Полное содержание публикаций, указанных в настоящем документе, включено в настоящий документ посредством ссылки.

Зависимые от гипоксии расщепляемые линкеры.

В некоторых вариантах осуществления линкер может расщепляться в условиях гипоксии, которая является еще одной характеристикой участка локализации рака, например внутри опухоли. Вариант SIRP- α , присоединенный к блокирующему пептиду с помощью чувствительного к гипоксии линкера, защищен от связывания с CD47 на непораженных заболеванием клетках, при этом линкер остается стабильным в физиологических условиях (например, нейтральном pH и адекватной концентрации кислорода). После поступления белка слияния в участок локализации рака, например внутрь опухоли, где концентрация кислорода значительно ниже, чем в здоровых тканях, линкер расщепляется с высвобождением варианта SIRP- α от блокирующего пептида, который затем связывается с CD47 клеточной поверхности на опухолевых клетках. Чувствительный к гипоксии линкер может включать фрагмент, например аминокислоту или химическую функциональную группу, способную расщепляться в условиях гипоксии. Некоторые примеры химических фрагментов, которые могут расщепляться, т.е. расщепляться посредством восстановления в гипоксических условиях, включают, но без ограничения, хиноны, N-оксиды и гетероароматические нитрогруппы. Эти химические фрагменты могут быть введены в расщепляемый линкер с использованием общепринятых технологий химического и пептидного синтеза. Примеры чувствительных к гипоксии аминокислот также известны в данной области, такие как описанные в работе Shigenaga et al. (European Journal of Chemical Biology 13:968-971, 2012), полное содержание которой включено здесь посредством ссылки.

В предпочтительном варианте осуществления чувствительная к гипоксии аминокислота, описанная Shigenaga et al. (European J. Chem. Biol. 13:968-971, 2012), может быть вставлена между вариантом SIRP- α и блокирующим пептидом. Например, аминокислотная группа чувствительной к гипоксии аминокислоты может быть присоединена к С-концу варианта SIRP- α посредством пептидной связи, и аналогично карбоксильная группа чувствительной к гипоксии аминокислоты может быть присоединена к N-концу блокирующего пептида посредством пептидной связи. В условиях гипоксии восстановление нитрогруппы индуцирует расщепление пептидной связи между чувствительной к гипоксии аминокислотой и N-концом блокирующего пептида, таким образом успешно высвобождая вариант SIRP- α от блокирующего пептида. Затем вариант SIRP- α может связываться с CD47 на опухолевых клетках.

В другом варианте осуществления чувствительная к гипоксии 2-нитроимидазольная группа, описанная Duan et al. (J. Med. Chem. 51:2412-2420, 2008), может быть вставлена между вариантом SIRP- α и блокирующим пептидом. В условиях гипоксии восстановление нитрогруппы индуцирует дополнительное восстановление, которое в конечном итоге приводит к удалению 2-нитроимидазольной группы от места ее присоединения, например варианта SIRP- α , блокирующего пептида или расщепляемого линкера.

Опухоль-ассоциированные зависимые от фермента расщепляемые линкеры.

В других вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α может включать вариант SIRP- α , присоединенный к блокирующему пептиду с помощью линкера (например, расщепляемого линкера) и необязательно одного или нескольких спейсеров (примеры спейсеров описаны подробно далее в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления линкер (например, расщепляемый линкер) может расщепляться под действием опухоль-ассоциированного фермента. В некоторых вариантах осуществления линкер, который может расщепляться под действием опухоль-ассоциированного фермента, может содержаться в пределах блокирующего пептида, который может быть нековалентно присоединен к

варианту SIRP- α . После поступления белка слияния в участок локализации рака, например внутри опухоли, линкер расщепляется под действием опухоль-ассоциированного фермента с высвобождением варианта SIRP- α от блокирующего пептида, который затем может связываться с CD47 клеточной поверхности на опухолевых клетках. Линкер, чувствительный к опухоль-ассоциированному ферменту, может содержать фрагмент, например белковый субстрат, способный специфически расщепляться под действием фермента, например, протеазы, которая присутствует только в участке локализации рака, например внутри опухоли. Фрагмент может быть выбран исходя из типа фермента, например протеазы, присутствующей в участке локализации рака, например внутри опухоли. Иллюстративным расщепляемым линкером, который может расщепляться под действием опухоль-ассоциированного фермента, является LSGRSDNH (SEQ ID NO: 47), который может расщепляться под действием множества протеаз, например матрипазы (MTSP1), активатора плазминогена урокиназного типа (uPA), легумина, PSA (также называемого KKL3, калликреин-связанная пептидаза-3), матриксной металлопротеиназы-2 (MMP-2), MMP9, человеческой нейтрофильной эластазы (HNE) и протеиназы 3 (Pr3). Также существуют другие расщепляемые линкеры, которые подвержены расщеплению ферментами (например, протеазами). В дополнение к перечисленным выше протеазам, другие ферменты (например, протеазы), которые могут расщеплять расщепляемый линкер, включают, но без ограничения, урокиназу, тканевой активатор плазминогена, трипсин, плазмин и другие ферменты, обладающие протеолитической активностью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения вариант SIRP- α или SIRP- α дикого типа присоединен к блокирующему пептиду с помощью линкера (например, расщепляемого линкера), поддающегося расщеплению ферментами, обладающими протеолитической активностью, такими как урокиназа, тканевой активатор плазминогена, плазмин или трипсин.

В некоторых вариантах осуществления последовательности расщепляемых линкеров могут быть получены и выбраны путем комбинирования нескольких последовательностей на основе предпочтений различным ферментам. Неограничивающие примеры некоторых потенциальных протеаз и их соответствующие участки протеаз показаны в табл. 7. В табл. 7 "-" обозначает любую аминокислоту (т.е. любую природную аминокислоту), прописная буква обозначает сильное предпочтение этой аминокислоте, строчная буква обозначает минимальное предпочтение этой аминокислоте и "/" отделяет положения аминокислот в случаях, когда возможна более чем одна аминокислота в положении, соседнем "/". Другие расщепляемые последовательности включают, но без ограничения, последовательность из человеческого коллагена печени (цепь $\alpha 1$ (III) (например, GPLGIAGI (SEQ ID NO: 100))), последовательность из человеческого PZP (например, YGAGLGVV (SEQ ID NO: 101), AGLGVVER (SEQ ID NO: 102) или AGLGISST (SEQ ID NO: 103)) и другие последовательности, которые являются аутолитическими (например, VAQFVLTE (SEQ ID NO: 104), AQFVLTEG (SEQ ID NO: 105) или PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 106)).

Таблица 7

Протеаза	Возможные участки протеазы
uPA:	L/S/G/R--S-/D/N/H (SEQ ID NO: 69); -/s/gs/Rk-/v/-/-/ (SEQ ID NO: 70); SGR-SA (SEQ ID NO: 71)
Матриптаза:	L/S/G/R--S-/D/N/H (SEQ ID NO: 72); r/-/--Rk-/v/-/-/g/- (SEQ ID NO: 73); RQAR-VV (SEQ ID NO: 74); r/-/-Rk/v/-/g (SEQ ID NO: 75); /Kt/RKQ/gAS/RK/A (SEQ ID NO: 76)
Легумаин:	L/S/G/R--S-/D/N/H (SEQ ID NO: 77); ---/-/-N/-/-/ (SEQ ID NO: 78); AAN-L (SEQ ID NO: 79); ATN-L (SEQ ID NO: 80)
PSA	si/sq/-/yqr s/s/-/- (SEQ ID NO: 81); S/S/K/L/Q (SEQ ID NO: 82)
MMP2	-/p/-/- /li/-/-/- (SEQ ID NO: 83)
MMP9	g/pa/-/gl/-/g/- (SEQ ID NO: 84); G/P/L/G/I/A/G/Q (SEQ ID NO: 85); P/V/G/L/I/G (SEQ ID NO: 86); H/P/V/G/L/L/A/R (SEQ ID NO: 87)
HNE	-/-/-/viat/-/-/- (SEQ ID NO: 88)
Pr3	-/y/y/vta -/-/-/- (SEQ ID NO: 89)
Про-урокиназа	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 90); PRFRIIGG (SEQ ID NO: 91)
TGFβ	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 92)
Плазминоген	RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 93)
Стафилокиназа	SSSFDKGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 94); SSSFDKGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 95)
Фактор Ха	IEGR; IDGR (SEQ ID NO: 96); GGSIDGR (SEQ ID NO: 97)
Гелатиназа	PLGLWA (SEQ ID NO: 98)
Человеческая коллагеназа фибробластов	DVAQFVLT (SEQ ID NO: 99)

В литературе имеются сообщения о повышенных уровнях ферментов, имеющих известные субстраты в различных типах рака, например, солидных опухолях. См., например, работу La Rocca et al., Brit. J. Cancer, 90:1414-1421 и Ducry et al., Bioconjug. Chem. 21:5-13, 2010, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Опухоль-ассоциированные ферменты могут быть также идентифицированы с использованием традиционных технологий, известных в данной области, например иммуногистохимии опухолевых клеток. В одном иллюстративном варианте осуществления фермент-чувствительный фрагмент в линкере может представлять собой субстрат матриксную металлопротеиназу (MMP), который может расщепляться под действием MMP, присутствующей в участке локализации рака, например внутри опухоли. В другом иллюстративном варианте осуществления фермент-чувствительный фрагмент в линкере может представлять собой малеимидо-содержащий дипептидный линкер (см., например, табл. 1 в Ducry et al.), который может расщепляться посредством протеолиза протеазами (например, катепсин или плазмин), присутствующими на повышенных уровнях в некоторых опухолях (Koblinski et al., Chim. Acta 291:113-135, 2000). В этом варианте осуществления малеимидная группа малеимидо-содержащего дипептидного линкера может быть конъюгирована с цистеиновым остатком варианта SIRP-α и карбоксильная группа на С-конце малеимидо-содержащего дипептидного линкера может быть конъюгирована с аминогруппой на N-конце блокирующего пептида. Аналогично, малеимидная группа малеимидо-содержащего дипептидного линкера может быть конъюгирована с цистеиновым остатком блокирующего пептида и карбоксильная группа на С-конце малеимидо-содержащего дипептидного линкера может быть конъюгирована с аминогруппой на N-конце варианта SIRP-α. Масс-спектрометрия и другие доступные методики в области протеомики могут быть использованы для подтверждения расщепления опухоль-ассоциированных фермент-зависимых расщепляемых линкеров. Другие фермент-чувствительные фрагменты описаны в патенте США 8399219, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, чувствительный к опухоль-ассоциированному ферменту, например белковый субстрат, может быть вставлен между вариантом SIRP-α и блокирующим пептидом с использованием общепринятых технологий молекулярной клеточной биологии и химической конъюгации, хорошо известных в данной области.

VIII. Сывороточный альбумин.

Слияние с сывороточными альбуминами может улучшить фармакокинетические параметры белковых фармацевтических средств, и, в частности, вариант SIRP- α , описанный здесь, может быть соединен с сывороточным альбумином. Сывороточный альбумин представляет собой глобулярный белок, который является наиболее распространенным белком в крови у млекопитающих. Сывороточный альбумин вырабатывается в печени и составляет около половины белков сыворотки крови. Он является мономерным и растворимым в крови. Некоторые наиболее важные функции сывороточного альбумина включают транспорт гормонов, жирных кислот и других белков в организме, буферизацию pH и поддержание осмотического давления, необходимого для надлежащего распределения жидкостей организма между кровеносными сосудами и тканями организма. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α может быть слит с сывороточным альбумином. В предпочтительных вариантах осуществления сывороточный альбумин представляет собой человеческий сывороточный альбумин (HSA). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения N-конец HSA соединен с C-концом варианта SIRP- α для увеличения периода полувыведения варианта SIRP- α из сыворотки. HSA может быть соединен напрямую или посредством линкера с C-концом варианта SIRP- α . Соединение N-конца HSA с C-концом варианта SIRP- α сохраняет N-конец варианта SIRP- α свободным для взаимодействия с CD47 и проксимальный конец C-конца HSA для взаимодействия с FcRn. В целом, HSA, который может быть использован в описанных здесь способах и композициях, известен в данной области. В некоторых вариантах осуществления HSA включает аминокислоты 25-609 (SEQ ID NO: 67) последовательности UniProt ID NO: P02768. В некоторых вариантах осуществления HSA включает одну или несколько аминокислотных замен (например, C34S и/или K573P) относительно SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления HSA имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 68.

IX. Альбумин-связывающие пептиды.

Связывание с сывороточными белками может улучшить фармакокинетические параметры белковых фармацевтических средств, и, в частности, описанные здесь варианты SIRP- α могут быть слиты с белок-связывающими пептидами или белками. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α может быть слит с альбумин-связывающим пептидом, который проявляет активность связывания с сывороточным альбумином, для увеличения периода полувыведения варианта SIRP- α из сыворотки. Альбумин-связывающие пептиды, которые могут быть использованы в описанных здесь способах и композициях, в целом известны в данной области. См., например, Dennis et al., J. Biol. Chem. 277:35035-35043, 2002 and Miyakawa et al., J. Pharm. Sci. 102:3110-3118, 2013. В одном варианте осуществления альбумин-связывающий пептид включает последовательность DICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 2). Альбумин-связывающий пептид может быть слит генетически с вариантом SIRP- α или присоединен к варианту SIRP- α химическими способами, например, путем химической конъюгации. При желании спейсер может быть вставлен между вариантом SIRP- α и альбумин-связывающим пептидом для обеспечения дополнительной структурной и пространственной гибкости белка слияния. Специфические спейсеры и их аминокислотные последовательности описаны подробно далее в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления альбумин-связывающий пептид может быть слит с N- или C-концом варианта SIRP- α . В одном примере C-конец альбумин-связывающего пептида может быть напрямую слит с N-концом варианта SIRP- α посредством пептидной связи. В другом варианте осуществления N-конец альбумин-связывающего пептида может быть напрямую слит с C-концом варианта SIRP- α посредством пептидной связи. В еще другом варианте осуществления карбоновая кислота на C-конце альбумин-связывающего пептида может быть слита с внутренним аминокислотным остатком, т.е. аминокислотной боковой цепи остатка лизина варианта SIRP- α с использованием общепринятых методов химической конъюгации. Без привязки к какой-либо теории можно предположить, что слияние альбумин-связывающего пептида с вариантом SIRP- α может привести к пролонгированному удерживанию терапевтического белка посредством его связывания с сывороточным альбумином.

X. Fc-домены.

В некоторых вариантах осуществления конструкция варианта SIRP- α может включать вариант SIRP- α и мономер Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α может быть слит с мономером Fc-домена иммуноглобулина или фрагментом мономера Fc-домена. Как известно в данной области, Fc-домен представляет собой белковую структуру, которая обнаружена на C-конце иммуноглобулина. Fc-домен включает два мономера Fc-домена, которые димеризуются путем взаимодействия между константными доменами C_H3 антитела. Fc-домен дикого типа формирует минимальную структуру, которая связывается с Fc-рецептором, например, Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIb, Fc γ RIV. В настоящем изобретении мономер Fc-домена или фрагмент Fc-домена, слитый с вариантом SIRP- α для увеличения периода полувыведения варианта SIRP- α , может включать димер, состоящий из двух мономеров Fc-домена или мономера Fc-домена, при условии, что мономер Fc-домена может связываться с Fc-рецептором (например, FcRn-рецептором). Кроме того, Fc-домен или фрагмент Fc-домена, слитый с вариантом SIRP- α для увеличения периода полувыведения варианта SIRP- α из сыворотки, не вызывает

какого-либо связанного с иммунной системой ответа. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен может быть мутированным с лишением эффекторных функций, характерных для "мертвого" Fc-домена. Например, Fc-домен может включать специфические аминокислотные замены, которые, как известно, сводят к минимуму взаимодействие между Fc-доменом и Fcγ-рецептором. В некоторых вариантах осуществления мономер Fc-домена или фрагмент Fc-домена может быть слит с N- или C-концом варианта SIRP-α с помощью общепринятых генетических или химических способов, например, химической конъюгации. При желании, между вариантом SIRP-α и мономером Fc-домена может быть вставлен линкер (например, спейсер).

Гетеродимеризация мономеров Fc-домена.

В некоторых вариантах осуществления каждый из двух мономеров Fc-домена в Fc-доме включает аминокислотные замены, которые способствуют гетеродимеризации двух мономеров. Гетеродимеризация мономеров Fc-домена может быть стимулирована путем введения различных, но совместимых заместителей в два мономера Fc-домена, таких как пары остатков "выступ-во-впадину" или нагруженные пары остатков. Использование пар остатков "выступ-во-впадину" описано Carter с соавторами (Ridgway et al., Protein Eng. 9:617-612, 1996; Atwell et al., J. Mol. Biol., 270:26-35, 1997; Merchant et al., Nat. Biotechnol., 16:677-681, 1998). Взаимодействие "выступ-во-впадину" способствует образованию гетеродимера, тогда как взаимодействия "впадина-впадина" и "выступ-выступ" препятствуют образованию гомодимера вследствие стерического конфликта и исключения благоприятных взаимодействий. Методика "выступ-во-впадину" также описана в публикации патента США 8216805, Merchant et al., Nature Biotechnology, 16:677-681, 1998 и Merchant et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110:E2987-E2996, 2013, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Впадина представляет собой пустое пространство, которое образуется при замене исходной аминокислоты в белке на другую аминокислоту с меньшим размером боковой цепи. Выступ представляет собой выпуклость, которая образуется при замене исходной кислоты в белке на другую аминокислоту с большим размером боковой цепи. В частности, заменяемая аминокислота находится в константном домене C_{H3} антитела мономера Fc-домена и участвует в димеризации двух мономеров Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления впадина в одном константном домене C_{H3} антитела создается для размещения выступа в другом константном домене C_{H3} антитела таким образом, что аминокислоты выступа и впадины способствуют или содействуют гетеродимеризации двух мономеров Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления впадина в константном домене C_{H3} антитела создается для лучшего размещения исходной аминокислоты в другом константном домене C_{H3} антитела. В некоторых вариантах осуществления выступ в одном константном домене C_{H3} антитела создается для формирования дополнительных взаимодействий с исходными аминокислотами в другом константном домене C_{H3} антитела.

Впадина может быть сконструирована путем замены аминокислот, имеющих боковые цепи большего размера, таких как тирозин или триптофан, на аминокислоты, имеющие боковые цепи меньшего размера, такие как аланин, валин или треонин, например мутация Y407V в константном домене C_{H3} антитела. Аналогично, выступ может быть сконструирован путем замены аминокислот, имеющих боковые цепи меньшего размера на аминокислоты, имеющие боковые цепи большего размера, такие как мутация T366W в константном домене C_{H3} антитела. В предпочтительном варианте осуществления один мономер Fc-домена включает мутацию выступа T366W и другой мономер Fc-домена включает мутации впадины T366S, L358A и Y407V. Вариант D1 SIRP-α согласно изобретению может быть слит с мономером Fc-домена, включающим мутацию выступа T366W, для ограничения нежелательного образования гомодимера "выступ-выступ". Примеры пар аминокислот "выступ-во-впадину" включены без ограничения в табл. 8.

Таблица 8

Мономер					T366S			
1	Fc-	Y407T	Y407A	F405A	T394S	T366S	T394W	T366W
домена						L358A	Y407T	T394S
						Y407V	Y407A	T394S
Мономер								
2	Fc-	T366Y	T366W	T394W	F405W	T366W	T366Y	F405W
домена							F405A	F405W
								Y407A

В дополнение к стратегии "выступ-во-впадину" может быть использована стратегия электростатического взаимодействия для контроля димеризации мономеров Fc-домена. Электростатическое взаимодействие представляет собой использование благоприятных электростатических взаимодействий между противоположно заряженными аминокислотами в пептидах, белковых доменах и белках для контроля формирования высокоупорядоченных белковых молекул. В частности, для контроля димеризации мономеров Fc-домена с использованием электростатического взаимодействия один или несколько аминокислотных остатков, которые формируют границу раздела C_{H3}-C_{H3}, заменяют на положительно или отрицательно заряженные аминокислотные остатки таким образом, что взаимодействие становится электроста-

тически благоприятным или неблагоприятным в зависимости от введенных специфически заряженных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженная аминокислота на границе раздела, такая как лизин, аргинин или гистидин, заменена на отрицательно заряженную кислоту, такую как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота. В некоторых вариантах осуществления отрицательно заряженная аминокислота на границе раздела заменена на положительно заряженную аминокислоту. Заряженные аминокислоты могут быть введены в один из взаимодействующих константных доменов C_{H3} антитела или в оба. Введение заряженных аминокислот во взаимодействующие константные домены C_{H3} антитела двух мономеров Fc-домена может способствовать селективному формированию гетеродимеров мономеров Fc-домена, поскольку контролируется эффектами электростатического взаимодействия, возникающими в результате взаимодействия между заряженными аминокислотами. Метод электростатического взаимодействия также описан в публикации патента США 20140024111, Gunasekaran et al., J. Biol. Chem., 285:19637-46, 2010 и Martens et al., Clin. Cancer Res., 12:6144-52, 2006, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Примеры электростатически взаимодействующих пар аминокислот содержатся, без ограничения, в табл. 9.

Таблица 9

Мономер											
1	Fc-	K409D	K409D	K409E	K409E	K392D	K392D	K392E	K392E	K409D K392D	K370E K409D K439E
Мономер											
2	Fc-	D399K	D399R	D399K	D399R	D399K	D399R	D399K	D399R	D399K D356K	D356K E357K D399K
домена											

XI. Полиэтиленгликолевый (PEG) полимер

В некоторых вариантах осуществления вариант SIRP- α может быть также слит с полимером, например полиэтиленгликолем (PEG). Присоединение полимера к белковому фармацевтическому средству может "маскировать" белковое фармацевтическое средство от иммунной системы хозяина (Milla et al., Curr Drug Metab. 13:105-119, 2012). Кроме того, некоторые полимеры, например гидрофильные полимеры, также могут обеспечить растворимость в воде гидрофобных белков и лекарственных средств (Gregoriadis et al., Cell Mol. Life Sci. 57:1964-1969, 2000; Constantinou et al., Bioconjug. Chem. 19:643-650, 2008). Различные полимеры, такие как PEG, цепь полисиаловой кислоты (Constantinou et al., Bioconjug. Chem. 19:643-650, 2008), and PAS chain (Schlapschy et al., Protein Eng. Des. Sel. 26:489-501, 2013), известны в данной области и могут быть использованы в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления полимер, например PEG, может быть ковалентно присоединен к варианту SIRP- α либо на N-или C-конце, либо внутри с использованием общепринятых химических способов, например химической конъюгации. В некоторых вариантах осуществления полимер, например PEG, может быть ковалентно присоединен к цистеиновой замене или добавлению в варианте SIRP- α . Цистеиновая замена в варианте SIRP- α может представлять собой I7C, A16C, S20C, T20C, A45C, G45C, G79C, S79C или A84C относительно последовательности любой из SEQ ID NO: 13-23. Добавление цистеинового остатка в вариант SIRP- α может быть произведено с использованием общепринятых методов в данной области, например, пептидного синтеза, генетической модификации и/или молекулярного клонирования. Полимер, например PEG, может быть присоединен к остатку цистеина с использованием цистеин-малеимидной конъюгации, хорошо известной специалисту в данной области. Полное содержание публикаций, на которые сделана ссылка, включено в настоящий документ посредством ссылки.

В дополнение к описанным выше вариантам осуществления существуют также другие методы удлинения периода полувыведения, которые могут быть использованы в настоящем изобретении для увеличения периода полувыведения вариантов SIRP- α из сыворотки. Методы удлинения периода полувыведения включают, но без ограничения, EXTEN (Schellenberger et al., Nat. Biotechnol. 27:1186-1192, 2009) и Albu tag (Trussel et al., Bioconjug Chem. 20:2286-2292, 2009). Полное содержание публикаций, на которые сделана ссылка, включено в настоящий документ посредством ссылки.

XII. Спейсеры.

В некоторых вариантах осуществления в конструкции варианта SIRP- α могут быть использованы спейсеры. Например, конструкция варианта SIRP- α может включать вариант SIRP- α , присоединенный к блокирующему пептиду с помощью линкера (например, расщепляемого линкера). В таких конструкциях SIRP- α спейсер может быть вставлен между вариантом SIRP- α и линкером (например, расщепляемым линкером) и/или между линкером (например, расщепляемым линкером) и блокирующим пептидом. Для оптимизации промежутка между вариантом SIRP- α и линкером и/или промежутка между линкером и блокирующим пептидом может быть использован один или несколько спейсеров, описанных ниже.

В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α , включающей вариант SIRP- α , присоединенный к блокирующему пептиду с помощью линкера (например, расщепляемого линкера), спейсер служит для расположения расщепляемого линкера в стороне от ядра варианта SIRP- α и

блокирующего пептида таким образом, что расщепляемый линкер является более доступным для фермента, ответственного за расщепление. Должно быть понятно, что присоединение двух элементов в конструкции варианта SIRP- α , например варианта SIRP- α и линкера (например, расщепляемого линкера), в конструкции варианта SIRP- α , включающей (например, в этом порядке) вариант SIRP- α , линкер и блокирующий пептид, необязательно происходит конкретным способом или посредством конкретной реакции. Любая реакция, которая обеспечивает получение конструкции варианта SIRP- α подходящей стабильности и биологической совместимости, является приемлемой.

Спейсер относится к связи между двумя элементами в конструкции варианта SIRP- α , например, вариантом SIRP- α и линкером (например, расщепляемым линкером), в конструкции варианта SIRP- α , включающей (например, в указанном порядке) вариант SIRP- α , линкер и блокирующий пептид, линкер (например, расщепляемый линкер) и блокирующий пептид, в конструкции варианта SIRP- α , включающей (например, в указанном порядке) вариант SIRP- α , линкер и блокирующий пептид, вариант SIRP- α и связывающий сывороточный протеин пептид или белок, например альбумин-связывающий пептид. Спейсер может также относиться к связи, которая может быть вставлена между вариантом SIRP- α или SIRP- α дикого типа и антителом, например опухоль-специфическим антителом или антитело-связывающим пептидом. Спейсер может обеспечить дополнительную структурную и/или пространственную гибкость конструкции варианта SIRP- α . Спейсер может представлять собой простую химическую связь, например амидную связь, малую органическую молекулу (например, углеводородную цепь), аминокислотную последовательность (например, последовательность из 3-200 аминокислот) или комбинацию малой органической молекулы (например, углеводородной цепи) и аминокислотной последовательности (например, последовательности из 3-200 аминокислот). Спейсер является стабильным в физиологических условиях (например, при нейтральном pH и адекватной концентрации кислорода), а также в условиях, характерных для пораженного заболеванием участка, например, кислом pH и гипоксии. Спейсер является стабильным в пораженном заболеванием участке, таком как участок локализации рака, например внутри опухоли.

Спейсер может включать 3-200 аминокислот. Подходящие пептидные спейсеры известны в данной области и включают, например, пептидные линкеры, содержащие гибкие аминокислотные остатки, такие как глицин и серин. В определенных вариантах осуществления спейсер может содержать мотивы, например множество повторяющихся мотивов GS, GGS, GGGGS, GGSG или SGGG. В определенных вариантах осуществления спейсер может содержать от 2 до 12 аминокислот, включающих мотивы GS, например GS, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS или GSGSGSGSGSGS. В определенных других вариантах осуществления спейсер может содержать от 3 до 12 аминокислот, включающих мотивы GGS, например GGS, GGS GGS, GGS GGS GGS и GGS GGS GGS GGS.

В еще других вариантах осуществления спейсер может содержать от 4 до 12 аминокислот, включающих мотивы GGSG, например GGSG, GGSGGGSG или GGSGGGSGGGSG. В других вариантах осуществления спейсер может содержать мотивы $(GGGS)_n$, где n представляет собой целое число от 1 до 10. В других вариантах осуществления спейсер может также содержать аминокислоты, отличные от глицина и серина, например GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR или GGS GGG SEGG SEGG SEGG SEGG SEGG SEGG SEGG. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении в конструкции варианта SIRP- α может быть использован один или несколько пептидных спейсеров, содержащих 12 или 20 аминокислот. Пептидные спейсеры, содержащие 12 или 20 аминокислот, могут содержать последовательности GGSGGGSGGGGS и SGGSGGGSGGGSGGGSGGG соответственно. В некоторых вариантах осуществления один или несколько пептидных спейсеров из 18 аминокислот, содержащих последовательность GGSGGGSGGGSGGGSGGG, могут быть использованы в конструкции варианта SIRP- α .

В некоторых вариантах осуществления спейсер может также иметь общую структуру ${}^1\text{W}-(\text{CH}_2)_n\text{-Q}^1$, в которой W представляет собой NH или CH₂, Q представляет собой аминокислоту или пептид и n представляет собой целое число от 0 до 20.

XIII. Слияние блокирующего пептида с вариантом SIRP- α .

Блокирующий пептид (например, блокирующий пептид на основе CD47, имеющий последовательности любую из SEQ ID NO: 36-46 в табл. 6) может быть слит с N- или C-концом варианта SIRP- α с помощью линкера, например расщепляемого линкера (например, LSGRSDNH (SEQ ID NO: 47)), и необязательно одного или нескольких спейсеров (например, $(GGGS)_n$, слитых генетически с N- или C-концом линкера, где n представляет собой целое число от 1 до 10). Иллюстративные последовательности конструкций варианта SIRP- α , включающих блокирующий пептид на основе CD47, слитый с вариантом SIRP- α с помощью расщепляемого линкера, и один или несколько спейсеров показаны в последовательностях, представленных в SEQ ID NO: 48-63. Длина спейсеров может быть изменена для достижения наиболее оптимального связывания между блокирующим пептидом на основе CD47 и вариантом SIRP- α .

XIV. Способы получения конструкций варианта SIRP- α .

Конструкции варианта SIRP- α согласно изобретению могут быть получены из клетки-хозяина. Клетка-хозяин относится к носителю, который включает необходимые клеточные компоненты, например органеллы, необходимые для экспрессии полипептидов и конструкций, описанных здесь, из их соответствующих нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты могут быть включены в векторы на основе нуклеиновых кислот, которые могут быть введены в клетку-хозяина в помощью общепринятых методов, известных в данной области (например, трансформация, трансфекция, электропорация, осаждение фосфатом кальция, прямая микроинъекция, инъекция и т.д.). Выбор векторов на основе нуклеиновых кислот зависит отчасти от используемых клеток-хозяев. Как правило, предпочтительные клетки-хозяева имеют прокариотическое (например, бактериальное) или эукариотическое (например, млекопитающее) происхождение.

Конструирование векторов на основе нуклеиновых кислот и клетки-хозяева.

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность конструкции варианта SIRP- α может быть получена различными способами, известными в данной области. Эти способы включают, но без ограничения, олигонуклеотид-опосредованный (или сайт-направленный) мутагенез и PCR мутагенез. Полинуклеотидная молекула, кодирующая конструкцию варианта SIRP- α согласно изобретению, может быть получена с использованием стандартных методик, например генного синтеза. Альтернативно, полинуклеотидная молекула, кодирующая SIRP- α дикого типа, может быть мутирована с тем, чтобы получить специфические гистидиновые замены, с использованием стандартных технологий в данной области, например мутагенеза QuikChangeTM. Полинуклеотиды могут быть синтезированы с использованием синтезатора нуклеотидов или технологий PCR.

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие конструкции варианта SIRP- α , могут быть вставлены в вектор, способный к репликации и экспрессии полинуклеотидов в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах. Много векторов существует в данной области, которые могут быть использованы в целях изобретения. Каждый вектор может содержать различные компоненты, которые могут быть приспособлены и оптимизированы на совместимость с конкретной клеткой-хозяином. Например, компоненты вектора могут включать, но без ограничения, точку начала репликации, селективный маркерный ген, промотор, участок связывания рибосом, сигнальную последовательность, полинуклеотидную последовательность, кодирующую конструкцию варианта SIRP- α согласно изобретению, и последовательность терминации транскрипции. В некоторых вариантах осуществления вектор может включать участок внутренней посадки рибосомы (IRES), который обеспечивает возможность экспрессии множества конструкций варианта SIRP- α . Некоторые примеры бактериальных экспрессионных векторов включают, но без ограничения, pGEX-серии векторов (например, pGEX-2T, pGEX-3X, pGEX-4T, pGEX-5X, pGEX-6P), pET-серии векторов (например, pET-21, pET-21a, pET-21b, pET-23, pET-24), pACYC-серии векторов (например, pACYDuet-1), pDEST-серии векторов (например, pDEST14, pDEST15, pDEST24, pDEST42) и pBR322 и его производные (см., например, патент США 5648237). Некоторые примеры экспрессионных векторов млекопитающих включают, но без ограничения, pCDNA3, pCDNA4, pNICE, pSELECT и pFLAG-CMV. Другие типы векторов на основе нуклеиновых кислот включают вирусные векторы для экспрессии белка в клетке (например, клетке субъекта). Такие вирусные векторы включают, но без ограничения, ретровирусные векторы, аденовирусные векторы, поксвирусные векторы (например, вакцинные вирусные векторы, такие как Modified Vaccinia Ankara (MVA)), аденоассоциированные вирусные векторы и альфа-вирусные векторы.

В некоторых вариантах осуществления клетки *E.coli* используют в качестве клеток-хозяев для изобретения. Примеры штаммов *E.coli* включают, но без ограничения, *E.coli* 294 (ATCC® 31,446), *E.coli* λ 1776 (ATCC® 31,537), *E.coli* BL21 (DE3) (ATCC® BAA-1025) и *E.coli* RV308 (ATCC® 31,608). В других вариантах осуществления клетки млекопитающего используют в качестве клеток-хозяев для изобретения. Примеры типов клеток млекопитающих включают, но без ограничения, человеческие эмбриональные клетки почек (HEK), клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки HeLa, клетки PC3, клетки Vero и клетки MC3T3. Различные клетки-хозяева обладают характеристиками и специфическими механизмами для посттрансляционного процессинга и модификации белковых продуктов. Подходящие клеточные линии или системы хозяина могут быть выбраны для обеспечения корректной модификации и процессинга экспрессируемого белка. Описанные выше экспрессионные векторы могут быть введены в соответствующие клетки-хозяева с использованием общепринятых методов в данной области, например трансформации, трансфекции, электроосаждения, осаждения фосфатом кальция и прямой микроинъекции. После введения векторов в клетки-хозяева для выработки белка клетки-хозяева культивируют в традиционной питательной среде, модифицированной надлежащим образом, для индукции промоторов, селекции трансформантов или амплификации генов, кодирующих желательные последовательности.

Продуцирование белка, извлечение и очистка.

Клетки-хозяева, используемые для получения конструкций варианта SIRP- α согласно изобретению, могут быть выращены в среде, известной в данной области и подходящей для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящей среды для бактериальных клеток-хозяев включают среду Luria

broth плюс необходимые добавки, такие как селективный агент, например ампициллин. Примеры подходящей среды для клеток-хозяев млекопитающих включают минимальную питательную среду (MEM), модифицированную по способу Дульбекко среду Игла (DMEM), DMEM, дополненную фетальной бычьей сывороткой (FBS) и RPMI-1640.

Клетки-хозяева культивируют при подходящей температуре, такой как в интервале от около 20 до около 39°C, например от 25°C до около 37°C. Как правило, pH среды находится в диапазоне примерно от 6,8 до 7,4, например 7,0? в зависимости от организма хозяина. Если в векторе экспрессии согласно изобретению используют индуцируемый промотор, экспрессию белка индуцируют в условиях, подходящих для активации промотора.

Извлечение белка обычно включает разрушение клетки-хозяина, как правило, с помощью таких средств, как осмотический шок, разрушение ультразвуком или лизис. После разрушения клеток клеточный осадок может быть удален путем центрифугирования или фильтрации. Белки могут быть дополнительно очищены, например, с помощью аффинной хроматографии на смоле. Могут быть использованы стандартные способы очистки белков, известные в данной области. Следующие методы являются примерами подходящих методов очистки: фракционирование на иммуноаффинных или ионнообменных колонках, осаждение этанолом, HPLC с обращенной фазой, хроматография на силикагеле или катионообменных смолах, SDS-PAGE и гель-фильтрация.

Альтернативно, конструкции варианта SIRP- α могут продуцироваться клетками субъекта (например, человека), например, в контексте терапии, путем введения вектора (например, ретровирусного вектора, аденовирусного вектора, поксвирусного вектора (например, вакцинного вирусного вектора, такого как Modified Vaccinia Ankara (MVA)), аденоассоциированного вирусного вектора и альфавирусного вектора), содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую конструкцию варианта SIRP- α . Вектор после поступления в клетку субъекта (например, путем трансформации, трансфекции, электропорации, осаждения фосфатом кальция, прямой микроинъекции и т.д.) будет способствовать экспрессии конструкции варианта SIRP- α , которая затем секретируется из клетки.

XV. Фармацевтические композиции и препараты.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции согласно изобретению могут содержать одну или несколько конструкций варианта SIRP- α согласно изобретению в качестве терапевтических белков. Дополнительно к терапевтическому количеству белка фармацевтические композиции могут содержать фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, которое может быть составлено с помощью способов, известных специалистам в данной области. В других вариантах осуществления фармацевтические композиции согласно изобретению могут содержать молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие одну или несколько конструкций варианта SIRP- α согласно изобретению (например, в векторе, таком как вирусный вектор). Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию варианта SIRP- α , может быть клонирована в соответствующий экспрессионный вектор, который может быть доставлен с помощью хорошо известных в генной терапии способов.

Приемлемые носители и вспомогательные вещества в фармацевтических композициях не токсичны для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях. Приемлемые носители и вспомогательные вещества могут включать буферные растворы, такие как фосфатный, цитратный, HEPES и TAE, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и метионин, консерванты, такие как гексония хлорид, октадецилдиметилбензиламмония хлорид, резорцинол и бензалкония хлорид, белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, желатин, декстран и иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, аминокислоты, такие как глицин, глутамин, гистидин и лизин, и углеводы, такие как манноза, сахароза и сорбитол. Фармацевтические композиции согласно изобретению можно вводить парентерально в форме инъеклируемых составов. Фармацевтические композиции для инъекции могут быть составлены с использованием стерильного раствора или любой фармацевтически приемлемой жидкости в качестве носителя. Фармацевтически приемлемые носители включают, но без ограничения, стерильную воду, физиологический солевой раствор и клеточную культуральную среду (например, модифицированную по способу Дульбекко среду Игла (DMEM), α -модифицированную среду Игла (α -MEM), среду F-12).

Фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть приготовлены в виде микрокапсул, таких как микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы из полиметилметакрилата. Фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть приготовлены в других системах доставки лекарственных средств, таких как липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и нанокapsулы. Такие методики описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000). Фармацевтические композиции, подлежащие введению *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко осуществляют фильтрацией через стерильные фильтрационные мембраны.

Фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть также приготовлены в виде состава с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие конструкции варианта SIRP- α согласно изобретению. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают

сложные полиэфиры, гидрогели, полиактиды (патент США 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата, недеградирующий этилен-винилацетат, деградирующие сополимеры молочной и гликолевой кислот, такие как LUPRON DEPOT™ и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота. Некоторые составы с замедленным высвобождением обеспечивают высвобождение молекул в течение нескольких месяцев, например от одного до шести месяцев, тогда как другие составы высвобождают фармацевтические композиции согласно изобретению в течение более короткого периода времени, например в течение от нескольких дней до нескольких недель.

Фармацевтическая композиция может быть составлена в виде стандартной лекарственной формы по необходимости. Количество активного компонента, например конструкции варианта SIRP- α согласно изобретению, включенное в фармацевтические препараты, представляет собой такое количество, которое обеспечивает подходящую дозу в пределах заданного диапазона (например, доза в пределах диапазона 0,01-100 мг/кг массы тела).

Фармацевтическая композиция для генной терапии может быть представлена в приемлемом разбавителе или может содержать матрицу с медленным высвобождением, в которую погружен доставляющий гены носитель. Векторы, которые могут быть использованы в качестве носителя, доставляющего *in vivo* гены, включают, но без ограничения, ретровирусные векторы, аденовирусные векторы, поксвирусные векторы (например, вакцинные вирусные векторы, такие как Modified Vaccinia Ankara (MVA)), аденоассоциированные вирусные векторы и альфа-вирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления вектор может включать участок внутренней посадки рибосомы (IRES), который обеспечивает возможность экспрессии множества конструкций варианта SIRP- α . Другие носители и способы для доставки генов описаны в патентах США № 5972707, 5697901 и 6261554, полное содержание которых включено здесь посредством ссылки.

Другие способы получения фармацевтических композиций описаны, например, в патентах США № 5478925, 8603778, 7662367 и 7892558, полное содержание которых включено здесь посредством ссылки.

XVI. Режимы, дозы и время введения.

Фармацевтические композиции согласно изобретению, которые содержат одну или несколько конструкций варианта SIRP- α в качестве терапевтических белков, могут быть составлены для парентерального, подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутриартериального, интратекального или интраперитонеального введения. Фармацевтическая композиция может быть также составлена для введения или введена путем назального введения, распыления, перорального, аэрозольного, ректального или вагинального введения. Способы введения терапевтических белков известны в данной области. См., например, патенты США № 6174529, 6613332, 8518,869, 7402155 и 6591129 и публикации заявок на патент США US20140051634, WO 1993/000077 и US20110184145, полное раскрытие которых включено здесь посредством ссылки. Один или несколько из этих способов могут быть использованы для введения фармацевтической композиции согласно изобретению, которая содержит одну или несколько конструкций варианта SIRP- α согласно изобретению. Для инъектируемых составов различные эффективные фармацевтические носители известны в данной области. См., например, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, Pa., Banker and Chalmers, eds., pages 238-250 (1982), и *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4th ed., pages 622-630 (1986).

Доза фармацевтических композиций согласно изобретению зависит от факторов, включающих способ введения, заболевание, подлежащее лечению, и физических характеристик, например, возраста, веса, общего состояния здоровья субъекта. Как правило, количество конструкции варианта SIRP- α согласно изобретению, содержащееся в единичной дозе, может представлять собой количество, которое эффективно лечит заболевание без вызывания значительной токсичности. Фармацевтическая композиция согласно изобретению может включать дозу конструкции варианта SIRP- α в диапазоне от 0,001 до 500 мг (например, 0,05, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,7, 0,8, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 250 или 500 мг), в более конкретном варианте осуществления от около 0,1 до около 100 мг и в более конкретном варианте осуществления от около 0,2 до около 20 мг. Доза может быть адаптирована клиницистом в соответствии с общепринятыми факторами, такими как стадия заболевания и различные параметры субъекта.

Фармацевтическая композиция согласно изобретению может быть введена в количестве от около 0,001 до около 500 мг/кг/день (например, 0,05, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,7, 0,8, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 250 или 500 мг/кг/день). Фармацевтические композиции согласно изобретению, которые содержат конструкцию варианта SIRP- α , могут быть введены субъекту, нуждающемуся в этом, например, один или несколько раз (например, 1-10 раз или более) ежедневно, еженедельно, ежемесячно, два раза в год, один раз в год или в соответствии с лечебной необходимостью. Дозы могут быть обеспечены в виде одного или множества режимов дозирования. Например, в некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой дозу, которая варьирует от около 0,1 до около 100 мг/кг/день, от около 0,2 до около 20 мг/день, от около 1 до около 10 мг/день, от около 0,7 до около 210 мг/неделю, от 1,4 до около 140 мг/неделю, от около 0,3 до около 300 мг каждые три дня, от около 0,4 до около 40 мг через день и от около 2 до около 20 мг конструкции варианта SIRP- α через день. Интервал между введениями

может сокращаться по мере улучшения состояния здоровья или увеличиваться по мере ухудшения здоровья пациента.

XVII. Способы лечения.

В изобретении предлагаются фармацевтические композиции и способы лечения, которые могут быть использованы для лечения пациентов, страдающих заболеваниями и нарушениями, связанными с активностью SIRP- α и/или CD47, таких как рак и иммунологические заболевания. В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α , описанные здесь, можно вводить субъекту в способе увеличения фагоцитоза клетки-мишени (например, раковой клетки) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α можно вводить субъекту в способе выведения регуляторных Т-клеток у субъекта. В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α можно вводить субъекту в способе для уничтожения раковых клеток у субъекта. В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α можно вводить субъекту в способе лечения заболевания, связанного с активностью SIRP- α и/или CD47 у субъекта, при этом конструкция варианта SIRP- α предпочтительно связывается с CD47 на пораженных заболеванием клетках или в пораженном заболеванием участке, чем на непораженных заболеванием клетках. В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α можно вводить субъекту в способе увеличения приживления гематопозитических стволовых клеток у субъекта, при этом способ включает модулирование взаимодействия между SIRP- α и CD47 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления конструкции варианта SIRP- α можно вводить субъекту в способе изменения иммунного ответа (т.е. подавления иммунного ответа) у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления перед лечением заболевания (например, рака) у субъекта аминокислотную последовательность(и) SIRP- α у субъекта определяют, например, из каждой из двух аллелей, кодирующих ген SIRP- α . В этом способе согласно изобретению определяют аминокислотные последовательности полипептида SIRP- α в биологическом образце от субъекта и затем вводят субъекту терапевтически эффективное количество конструкции варианта SIRP- α . В этом способе вариант SIRP- α в конструкции варианта SIRP- α имеет такую же аминокислотную последовательность, как последовательность полипептида SIRP- α в биологическом образце от субъекта, за исключением аминокислотных изменений, введенных для увеличения аффинности варианта SIRP- α . Конструкция варианта SIRP- α обладает минимальной иммуногенностью у субъекта после ее введения.

Конструкции варианта SIRP- α и фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть использованы в различных терапиях рака. Рак, восприимчивый к лечению в соответствии с изобретением, включает, но без ограничения, солидные опухоли, гематологические злокачественные опухоли, острый миелоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, множественную миелому, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак эндометрия, рак легких, рак бронхов, рак печени, рак яичников, рак толстой и прямой кишки, рак желудка, рак желчного пузыря, гастроинтестинальную стромальную опухоль, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак ротоглотки, рак пищевода, меланому, немеланомный рак кожи, карциному из клеток Меркеля, индуцированный вирусами рак, нейробластому, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак почки, почечно-клеточный рак, рак почечной лоханки, лейкоз, лимфому, саркому, глиому, опухоль головного мозга и карциному. В некоторых вариантах осуществления раковые заболевания, восприимчивые к лечению в соответствии с изобретением, включают метастатический рак. В некоторых вариантах осуществления рак, восприимчивый к лечению в соответствии с изобретением, представляет собой солидную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль.

Конструкции варианта SIRP- α и фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть использованы в различных терапиях для лечения иммунологических заболеваний. В некоторых вариантах осуществления иммунологическое заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание или воспалительное заболевание, такое как множественный склероз, ревматоидный артрит, спондилоартропатия, системная красная волчанка, опосредованное антителом воспалительное или аутоиммунное заболевание, реакцию "трансплантат против хозяина", сепсис, диабет, псориаз, атеросклероз, синдром Шегрена, прогрессирующий системный склероз, склеродермию, острый коронарный синдром, ишемию-реперфузию, болезнь Крона, эндометриоз, гломерулонефрит, миастению гравис, идиопатический легочный фиброз, астму, синдром острой дыхательной недостаточности (ARDS), васкулит или воспалительный аутоиммунный миозит.

Примеры

Пример 1. Способы.

Получение конструкций варианта SIRP- α .

Все генетические конструкции создавали с использованием генного синтеза и оптимизировали по кодону для экспрессии в клетках млекопитающих (DNA2.0). Гены клонировали в экспрессионные векторы млекопитающих и экспрессировали с использованием промотора-интрона CMV α . Лидерную последовательность конструировали на N-конце конструкций для обеспечения надлежащей передачи сигнала и процессинга для секреции. Экспрессию белков слияния с SIRP- α проводили с использованием клеток Expi293FTM (Life Technologies). Эта клеточная линия адаптирована к высокоплотной не содержащей сыворотку суспензионной культуре в Expi293FTM Expression Medium и способна продуцировать высокие уровни рекомбинантных белков. Процедуры трансфекции выполняли в соответствии с инструкцией изготовителя. Супернатант обычно собирали через 5-7 дней после трансфекции. Белковые конструкции разработаны с возможностью содержания 6 $\times$ гистидиновых аффинных меток, и это позволяет провести очистку аффинной хроматографией. Сначала колонку уравнивали 5 мМ имидазолом, 100 мМ Tris HCl (pH 8), 500 мМ NaCl. Очищенную среду, экспрессирующую различные конструкции варианта SIRP- α , наносили на колонку Hi-Trap, набитую смолой Ni Sepharose excel для аффинной хроматографии на системе Avant 25 (GE Healthcare). Выполняли еще одну стадию уравнивания. После этого колонку промывали 40 мМ имидазолом, 100 мМ Tris, 500 мМ NaCl и последовательно элюировали 250 мМ имидазолом, 100 мМ Tris, 500 мМ NaCl. Элюированные фракции, содержащие конструкции варианта SIRP- α , объединяли и затем подвергали буферному обмену на 1X PBS.

Расщепление in vitro белков SIRP- α .

Рекомбинантный человеческий uPA и матриптазу получали от фирмы R&D systems. Белки SIRP- α с концентрацией 2 мкМ добавляли в соответствующие количества uPA и матриптазы (от 0,1 до 44 нг) в 50 мМ Tris HCl (pH 8,5), 0,01% Tween, как описано. Подлежащие разложению реакционные смеси обычно инкубировали в течение 18-24 ч при 37°C. Для остановки реакции в реакционную смесь добавляли краситель для SDS-PAGE и нагревали при 95°C в течение 3 мин. Для оценки расщепления разложенные образцы разделяли на 4-20% Tris-Glycine SDS-PAGE.

Пример 2. Разработка конструкций варианта SIRP- α , которые будут специфически активироваться в опухолевой ткани.

Целью является разработка конструкций варианта SIRP- α , которые будут оставаться инертными до локальной активации для связывания с CD47 в опухолевой ткани. Это будет ограничивать связывание SIRP- α с CD47 на клеточной поверхности непораженных заболеванием клеток и предотвращать нежелательную токсичность "on-target" "off tissue". Для создания таких конструкций варианта SIRP- α блокирующие пептиды (например, блокирующий пептид на основе CD47) генетически сливают с вариантом SIRP- α с помощью расщепляемого линкера. Используемые блокирующие пептиды основаны на участках взаимодействия CD47 с SIRP- α , и последовательности описаны ниже (разделы (а)-(с)). Спейсеры, содержащие повторяющиеся звенья GGGGS, разработаны для фланкирования расщепляемого линкера, который часто кодирует сайт узнавания для протеазы. В некоторых вариантах осуществления выбранный сайт расщепления протеазой представляет собой LSGRSDNH, но многие другие являются возможными. Сайт расщепления протеазой LSGRSDNH выбран по причине его чувствительности к многочисленным протеазам, которые имеют повышенную экспрессию в различных карциномах человека, например матриптазе (MTSP1), активатору плазминогена урокиназного типа (uPA), легумину, PSA (также называемому KLK3, калликреин-связанная пептидаза-3), матриксной металлопротеиназе-2 (MMP-2), MMP9, человеческой нейтрофильной эластазе (HNE) и протеиназе 3 (Pr3) (Ulisse et al., Curr. Cancer Drug Targets, 9:32-71, 2009; Uhland et al., Cell. Mol. Life Sci. 63:2968-2978, 2006; LeBeau et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110:93-98, 2013; Liu et al., Cancer Res. 63:2957-2964, 2003).

(а) Блокирование SIRP- α блокирующими пептидами на основе CD47.

Блокирующие пептиды на основе CD47 описаны более подробно ранее. Эти пептиды связываются с SIRP- α с различными аффинностями и блокируют его функцию. N-Конец CD47 является важным для взаимодействия с SIRP- α , таким образом, структурный анализ прогнозирует слияние SIRP- α с C-концом CD47. Для лучшего понимания результатов, оба N-концевое и C-концевое слияния используют со спейсерами различной длины. Различные блокирующие пептиды на основе CD-47 (например, пептиды, перечисленные в табл. 6) слиты с N- или C-концом варианта SIRP- α с помощью расщепляемого линкера и одного или нескольких спейсеров. Примеры последовательностей белков слияния, содержащих блокирующий пептид на основе CD47, слитый с вариантом SIRP- α с помощью расщепляемого линкера и одного или нескольких спейсеров, показаны в последовательностях SEQ ID NO: 48-56, в которых часть с подчеркиванием одиночной линией означает блокирующий пептид на основе CD47, часть с подчеркиванием двойной линией означает расщепляемый линкер и выделенная жирным шрифтом часть означает вариант SIRP- α . Последовательности, представленные в SEQ ID NO: 48-51, содержат блокирующие пептиды на основе CD47, которые включают 12 или 21 аминокислоту и спейсеры из 2-3 повторов GGGGS. Последо-

вательности, представленные в SEQ ID NO: 52-56, содержат блокирующие пептиды на основе CD47, которые включают IgSF-домен CD47 (усеченный при VVS), имеющий замещение C15S и спейсеры из 2-5 повторов GGGGS или 3-6 повторов GGS. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления HSA может быть слит с С-концом любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 48-56. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления мономер Fc-домена или HSA (SEQ ID NO: 68) может быть слит с N- или С-концом любого из белков слияния, перечисленных в табл. 10.

Таблица 10

SEQ ID NO	Белок слияния, состоящий из блокирующего пептида на основе CD47 и варианта SIRP- α
48	<u>SEVTELTREGETGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEELQHQPDKSV</u> LVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVS DTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRA KPS
49	<u>SEVTELTREGETGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEELQHQP</u> DKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFP RTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTE LSVRAKPS
50	<u>GQYTSEVTELTREGETHIELKGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEELQ</u> HQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGP FPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAG TELSVRAKPS
51	<u>GQYTSEVTELTREGETHIELKGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGG</u> SEELQHQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFPRTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEF KSGAGTELSVRAKPS

52	<u>QLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGA</u> <u>LNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGET</u> <u>IIE LKYRVVSGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEELQIIQPD</u> KSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVT TVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGGSPDDVEFKSGAGTELS VRAKPS
53	<u>QLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGA</u> <u>LNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGET</u> <u>IIE LKYRVVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEELQ</u> IIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGP PRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGGSPDDVEFKSGAG TELSVRAKPS
54	<u>QLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGA</u> <u>LNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGET</u> <u>IIE LKYRVVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGG</u> EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGGSPDDVEF KSGAGTELSVRAKPS
55	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGGSPDDVEF KSGAGTELSVRAKPSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSGGGGSLLFNKTKS VEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGA LNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIE LKYRVVS
56	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGGSPDDVEF KSGAGTELSVRAKPSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSGGGGSGGG SQLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDG ALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGE TIE LKYRVVS

(b) Блокирование варианта SIRP- α мутантом CD47 с низкой аффинностью, имеющим удлинённый N-конец.

Из-за высокой аффинности варианта SIRP- α в отношении CD47 существует вероятность того, что после расщепления линкера белок слияния не будет диссоциировать и вариант SIRP- α может остаться заблокированным. Для решения этой проблемы исследовали структуру комплекса SIRP- α -CD47 и разработали мутанты CD47, обладающие пониженной аффинностью связывания с вариантом SIRP- α по сравнению с аффинностью связывания с SIRP- α дикого типа. Таким образом, после расщепления линкера протеазой мутант CD47 будет диссоциировать от варианта SIRP- α . Разработанные мутанты CD47 описаны ниже. В начальных экспериментах проводили слияние варианта SIRP- α с CD47 дикого типа. Эти конструкции варианта SIRP- α , включающие вариант SIRP- α и CD47 дикого типа или мутант CD47, подвергали расщеплению *in vitro*, анализировали с помощью SDS-page для подтверждения расщепления и измеряли с помощью Biacore на их способность к связыванию с CD47 (т.е. связыванию варианта SIRP- α с CD47 дикого типа после диссоциации мутанта CD47 от варианта SIRP- α). Мутанты CD47 могут не потребоваться, если исходные конструкции варианта SIRP- α , содержащие вариант SIRP- α , слитый с CD47 дикого типа, экспрессируются, способны блокировать связывание с CD47 до расщепления протеазой и связываться с CD47 после расщепления протеазой. Если эти исходные конструкции варианта SIRP- α являются неактивными (т.е. могут расщепляться, но не связываются с CD47 после расщепления протеазой вследствие отсутствия диссоциации), то будут подвергнуты тестированию другие белки слияния, содержащие вариант SIRP- α , слитый с мутантами CD47 с низкой аффинностью.

В совместно кристаллизованной структуре CD47: SIRP- α (PDB: 4KJY, 4CMM), N-конец CD47 присутствует в виде пироглутамата и осуществляет взаимодействия посредством водородного связывания с Thr66 варианта SIRP- α и Leu66 SIRP- α дикого типа (фиг. 1). Было выдвинуто предположение о том, что

удлинение N-конца CD47 путем добавления аминокислоты, например глицина, будет предотвращать циклизацию глутамина в пироглутамат, а также создавать другие нежелательные контакты и взаимодействия, которые возможно будут разрушать водород-связывающие взаимодействия с Thr66 или Leu66 и, следовательно, нарушать связывание CD47 с SIRP-α. Последовательности белков слияния, содержащих мутант IgSF-домена CD47 с низкой аффинностью и вариант SIRP-α, показаны в SEQ ID NO: 57-59 в табл. 11, в которой часть с подчеркиванием одиночной линией означает мутант IgSF-домена CD47 с низкой аффинностью, содержащий аминокислоты 1-118 и C15S относительно SEQ ID NO: 46 в табл. 6, часть с подчеркиванием двойной линией означает расщепляемый линкер и выделенная жирным шрифтом часть означает вариант SIRP-α. Последовательности SEQ ID NO: x10-x12 также включают спейсеры, состоящие из 3-5 повторов GGGGS. Могут быть разработаны и экспрессированы последовательности, сходные с SEQ ID NO: x10-x12, в которых мутант IgSF-домена CD47 с низкой аффинностью слит с C-концом варианта SIRP-α с помощью расщепляемого линкера и одного или нескольких спейсеров.

Таблица 11

SEQ ID NO	Белок слияния, состоящий из мутанта IgSF-домена CD47 с низкой аффинностью, имеющего удлиненный N-концевой глицин, и варианта SIRP-α
57	<u>GQLLFNKT</u> KSVEFTFSNDTVVPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTFD <u>GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTR</u> <u>EGETHIELKYRVVSGGGSGGGSGGGSGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGSGEEELQ</u> IIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGP FPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPPDDVEFKSG AGTELSVRAKPS
58	<u>GQLLFNKT</u> KSVEFTFSNDTVVPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTFD <u>GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTR</u> <u>EGETHIELKYRVVSGGGSGGGSGGGSGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGSG</u> EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYN QRQGPFPVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPPDV EFKSGAGTELSVRAKPS
59	<u>GQLLFNKT</u> KSVEFTFSNDTVVPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTFD <u>GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTR</u> <u>EGETHIELKYRVVSGGGSGGGSGGGSGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGSG</u> GGGGSEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGR VLIYNQRQGPFPVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKG SPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS

(с) Блокирование SIRP-α мутантом IgSF-домена CD47 с низкой аффинностью, имеющим аминокислотные замены.

CD47 связывается с глубоким карманом с SIRP-α (код PDB: 4KJY и 4CMM). Компьютерное моделирование выполняли для идентификации аминокислотных остатков в области кармана CD47, которые при мутации будут уменьшать аффинность связывания CD47 с вариантом SIRP-α, но сохранять аффинность связывания CD47 с SIRP-α дикого типа. Идентифицированные остатки CD47 представляли собой L101Q, L101H, L101Y, T102Q и T102H. Было выдвинуто предположение о том, что мутант IgSF-домена CD47 с низкой аффинностью, содержащий одну из этих замен, будет способен эффективно блокировать вариант SIRP-α в режиме Tethered Mode. Однако при достижении участка локализации опухоли и локальном расщеплении протеазами при линкере мутант IgSF-домена CD47 с низкой аффинностью будет диссоциировать от варианта SIRP-α для связывания с SIRP-α дикого типа, оставляя вариант SIRP-α свободным для связывания с CD47 на клеточной поверхности опухолевых клеток. Теперь диссоциированный мутант IgSF-домена CD47 с низкой аффинностью может блокировать активность SIRP-α дикого типа. Это может привести к повышенной двойной блокирующей активности в результате высвобождения мутанта IgSF-домена CD47 с низкой аффинностью и варианта SIRP-α. Для иллюстрации способа отбора аминокислотных остатков и принципа того, как это может привести к дифференциальному блокированию SIRP-α дикого типа и варианта SIRP-α, показан пример с использованием Ala27 SIRP-α дикого типа (фиг. 2). Например, Ala27 SIRP-α дикого типа представляет собой остаток меньшего размера, чем Ile27 в варианте SIRP-α. Таким образом, путем мутации Thr102 в CD47 дикого типа в аминокислоту более крупного размера, такую как Gln102, в мутанте IgSF-домена CD47 с низкой аффинностью может

привести к стерическому конфликту с Ile27 в варианте SIRP-α в соответствующем участке взаимодействия. Однако будет сохраняться взаимодействие между мутантом CD47, имеющим замену Thr102Gln, и SIRP-α дикого типа, имеющим Ala27. Таким образом, мутант CD47 будет обладать низкой аффинностью связывания с вариантом SIRP-α и относительно более высокой аффинностью связывания с SIRP-α дикого типа. Последовательности некоторых иллюстративных мутантов IgSF-домена CD47 с низкой аффинностью показаны в SEQ ID NO: 41-45 в табл. 6. Последовательности конструкций варианта SIRP-α, содержащих мутант IgSF-домена CD47 с низкой аффинностью, имеющий аминокислотные замены, и вариант SIRP-α, показаны в SEQ ID NO: 60-63 в табл. 12, в которой одиночное подчеркивание означает мутант IgSF-домена CD47 с низкой аффинностью, содержащий аминокислотную замену L101Q, L101Y, T102Q и T102H соответственно, часть с двойным подчеркиванием означает расщепляемый линкер и часть, выделенная жирным шрифтом, означает вариант SIRP-α. SEQ ID NO: 60-63 также включают спейсеры, состоящие из 3-5 повторов GGGGS. Могут быть разработаны и экспрессированы последовательно, сходные с SEQ ID NO: 60-63, в которых мутант IgSF-домена CD47 с низкой аффинностью слит с С-концом варианта SIRP-α с помощью расщепляемого линкера и одного или нескольких спейсеров.

Таблица 12

SEQ ID NO	Белок слияния, состоящий из мутанта IgSF-домена CD47 с низкой аффинностью, имеющего аминокислотные замены, и варианта SIRP-α
60	<u>QLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTFDGA</u> <u>LNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEQTREGET</u> <u>IIE</u><u>ELKYRVV</u><u>SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSL</u><u>SGRSDNH</u><u>GGGGSGGGGSGGGG</u><u>SEELQ</u> IIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPF PRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPDDVEFKSGAG TELSVRAKPS
61	<u>QLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTFDGA</u> <u>LNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEYTREGET</u> <u>IIE</u><u>ELKYRVV</u><u>SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSL</u><u>SGRSDNH</u><u>GGGGSGGGGSGGGG</u><u>SEELQ</u> IIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPF PRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPDDVEFKSGAG TELSVRAKPS
62	<u>QLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTFDGA</u> <u>LNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELQREGET</u> <u>IIE</u><u>ELKYRVV</u><u>SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSL</u><u>SGRSDNH</u><u>GGGGSGGGGSGGGG</u><u>SEELQ</u> IIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPF PRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPDDVEFKSGAG TELSVRAKPS
63	<u>QLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTFDGA</u> <u>LNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELHREGET</u> <u>IIE</u><u>ELKYRVV</u><u>SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSL</u><u>SGRSDNH</u><u>GGGGSGGGGSGGGG</u><u>SEELQ</u> IIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPF PRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPDDVEFKSGAG TELSVRAKPS

Пример 3. Экспрессия и получение конструкций варианта SIRP-α для исследований in vitro.

Различные конструкции варианта SIRP-α (SEQ ID NO: 48-56), включающие вариант SIRP-α и блокирующий пептид на основе CD47, экспрессировали в клетках млекопитающих Expi293-F. Все конструкции разрабатывали с лидерной последовательностью, которая обеспечивала их экспрессию в качестве секретируемых белков в среду. Все конструкции экспрессировали в растворимой форме и очищали посредством одноступенчатой IMAC до высокой степени чистоты (фиг. 3А и 3В). На фиг. 3А показан анализ методом электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) в восстанавливающих условиях конструкций варианта SIRP-α SEQ ID NO: 48-56, и на фиг. 3В показан анализ методом электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) в невосстанавливающих условиях конструкций варианта SIRP-α. Данные эксклюзионной хроматографии указывают на то, что конструкции варианта SIRP-α не являются

агрегированными (данные не показаны).

Пример 4. Расщепление *in vitro* белков слияния SIRP- α и CD47.

Для определения, будут ли конструкции варианта SIRP- α (например, SEQ ID NO: 48-63) расщепляться *in vivo* в опухолевых тканях, проводили эксперименты *in vitro* с использованием для расщепления конструкций варианта SIRP- α протеаз uPA и матриптазы, которые, как известно, экспрессируются на повышенном уровне при раке. Начальные эксперименты проводили с использованием конструкции варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 54) для определения способности к расщеплению протеазами и оптимизации условий расщепления. На фиг. 4А показаны результаты тестирования способности к расщеплению uPA и матриптазой. Конструкцию варианта SIRP- α при концентрации 3 мкМ (SEQ ID NO: 54) инкубировали в течение 18 ч при 37°C, используя избыточное количество uPA или матриптазы. Линия 1 на фиг. 4А показывает контрольный эксперимент без добавления протеазы, и линии 2 и 3 показывают инкубацию конструкции варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 54) с uPA и матриптазой соответственно. Полученные данные, как показано на фиг. 4А, четко демонстрируют, что конструкция варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 54) может расщепляться и высвобождаться *in vitro* путем ее разложения избыточным количеством uPA и матриптазы в течение 18 ч при 37°C. Отщепленный вариант SIRP- α смещается в виде полосы с молекулярной массой ~17 кДа. Отщепленный CD47 смещается с жирной полосой примерно 36-40 кДа, вероятнее всего вследствие гликозилирования. При сравнении количества неразрезанной конструкции варианта SIRP- α на линиях 2 и 3 фиг. 4А оказалось, что более полное расщепление достигалось с использованием матриптазы по сравнению с uPA.

Таким образом, последующую оптимизацию условий расщепления выполняли с использованием только матриптазы и результаты показаны на фиг. 4В. Тестировали различные количества матриптазы, и расщепление проводили в течение 18 ч при 37°C. Линия 1 на фиг. 4В показывает контрольный эксперимент без добавления матриптазы и каждая из линий 2-4 показывает расщепление, проводимое с 44, 0,44 и 0,167 нг матриптазы соответственно. Полученные данные указывают на то, что 0,44 нг фермента является достаточным для полного расщепления в текущих условиях. Затем тестировали расщепление остальных конструкций варианта SIRP- α с использованием оптимизированных условий расщепления. В качестве примера и как показано на фиг. 4С, соответствующие конструкции варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 57-63) успешно расщепляли *in vitro* матриптазой с использованием оптимизированных условий расщепления. Линии 1-7 на фиг. 4С соответствуют нерасщепленным белкам слияния SEQ ID NO: 57-63 соответственно. Линии 8-14 на фиг. 4С соответствуют белкам слияния SEQ ID NO: 57-63 соответственно, расщепленным матриптазой.

Пример 5. Аффинности связывания конструкций варианта SIRP- α .

Связывание человеческих CD47-hFc (R & D Systems, номер по каталогу 4670-CD) с конструкциями варианта SIRP- α анализировали на приборе Biacore T100 (GE Healthcare) с использованием фосфатно-буферного солевого раствора (pH 7,4), дополненного 0,01% Tween-20 в качестве подвижного буфера.

370 RU (резонансных единиц) CD47-hFc иммобилизовали на проточной кювете 2 сенсорного чипа CM4 (GE Healthcare) путем проведения стандартной процедуры связывания с амином. Проточную кювету 1 активировали EDC/NHS и блокировали (этаноламином) для использования в качестве кюветы сравнения. Все конструкции варианта SIRP- α вводили при концентрации 50 или 100 нМ в течение 2 мин при скорости потока 30 мкл/мин и затем следовали 10 мин диссоциации. После каждого введения поверхность регенерировали с использованием смеси 2:1 элюирующего буфера Pierce IgG (Life Technologies, номер по каталогу 21004) и 4 М NaCl. Полную регенерацию поверхности подтверждали путем введения вариантов SIRP- α в начале и в конце эксперимента. Все сенсограммы дважды сравнивали с использованием проточной кюветы 1 и введения буфера.

Для всех образцов определяли сигнал связывания при концентрации 100 нМ через 50 с ассоциации, нормализовали по молекулярной массе конструкции варианта SIRP- α и выражали в виде процента от максимального ответа на связывание. Связывание варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 31) при концентрации 100 нМ, нормализованное по его молекулярной массе (MW), использовали в качестве максимального ответа на связывание. Результаты на фиг. 5А показывают, что конструкции варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 48-51) не блокируют варианты SIRP- α от связывания с CD47 на чипе. После расщепления линкера активность связывания незначительно увеличилась. Конструкции варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 52-54) эффективно блокировали связывание варианта SIRP- α с CD47 на чипе. Однако после расщепления линкера активность связывания варианта SIRP- α с CD47 на чипе только незначительно увеличилась, на основании чего можно предположить, что высокая аффинность взаимодействия между вариантом SIRP- α и IgSF-доменом CD47 сохраняет комплекс вместе и, следовательно, IgSF-домен CD47 продолжает блокировать вариант SIRP- α даже после расщепления линкера. Удивительным образом было обнаружено, что, когда IgSF-домен CD47 слит с С-концом SIRP- α (SEQ ID NO: 55), интактная конструкция варианта SIRP- α эффективно блокирована от связывания с CD47 на чипе (так же как белки слияния SEQ ID NO: 52-54), но расщепление линкера восстанавливает 100% связывания варианта SIRP- α с CD47 на чипе, на основании чего можно предположить, что IgSF-домен CD47 диссоциировал от варианта

SIRP- α после расщепления линкера, таким образом, вариант SIRP- α является свободным для связывания с CD47 на чипе. Позже тестировали другую конструкцию с CD47, слитым с С-концом варианта SIRP- α (см. фиг. 5B). Эта конструкция (SEQ ID NO: 56), которая содержит более длинный спейсер, также восстанавливала активность после расщепления, подтверждая общий подход к связыванию N-конца блокирующего пептида на основе CD47 с С-концом варианта SIRP- α полученных конструкций SIRP- α , в которых блокирующий пептид на основе CD47 эффективно блокирует вариант SIRP- α и диссоциирует после расщепления расщепляемого линкера.

Для дополнительного изучения аффинности связывания конструкций варианта SIRP- α конструкции варианта SIRP- α SEQ ID NO: 52-63 анализировали на приборе Biacore, следуя описанному ранее протоколу. Конструкции варианта SIRP- α SEQ ID NO: 52-54 содержат IgSF-домен CD47, имеющий аминокислоты 1-117 и C15S относительно CD47 дикого типа (SEQ ID NO: 35), слитый с N-концом варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 31) посредством расщепляемого линкера LSGRSDNH и множества спейсеров различной длины. Конструкции варианта SIRP- α SEQ ID NO: 55 и 56 содержат IgSF-домен CD47, имеющий аминокислоты 1-117 и C15S относительно CD47 дикого типа (SEQ ID NO: 35), слитый с С-концом варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 31) посредством расщепляемого линкера LSGRSDNH и множества спейсеров различной длины. Конструкции варианта SIRP- α SEQ ID NO: 57-59 содержат IgSF-домен CD47, имеющий аминокислоты 1-118 и C15S относительно SEQ ID NO: 46 в табл. 6, слитый с N-концом варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 31) посредством расщепляемого линкера LSGRSDNH и множества спейсеров различной длины. Конструкции варианта SIRP- α SEQ ID NO: 60-63 содержат IgSF-домен CD47, имеющий аминокислоты 1-117 SEQ ID NO: 41, 42, 44 и 45, показанные в табл. 6 соответственно, слитый с N-концом варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 31) посредством расщепляемого линкера LSGRSDNH и множества спейсеров различной длины.

На фиг. 5B показано, что конструкции варианта SIRP- α SEQ ID NO: 55 и 56 эффективно блокированы от связывания с CD47 на чипе до расщепления линкера, но расщепление линкера восстанавливало на 100% активность связывания. Аналогичные результаты наблюдались для конструкций варианта SIRP- α SEQ ID NO: 57-63. Наблюдалось, что при удлинении N-конца блокирующего пептида на основе CD47 на один остаток глицина создавалась конструкция варианта SIRP- α , которая была эффективно блокирована до расщепления линкера и затем восстанавливала до около 100% активности связывания с CD47 после обработки протеазой (SEQ ID NO: 57-59), демонстрируя диссоциацию блокирующего пептида на основе CD47 от варианта SIRP- α после расщепления линкера.

Этот результат дает основание предполагать, что вариант SIRP- α , слитый с N-концом блокирующего пептида на основе CD47 посредством расщепляемого линкера и спейсеров работает удовлетворительно. Расщепляемый линкер стабилизирует комплекс слияния и после расщепления удлиненный N-конец блокирующего пептида на основе CD47, который включает фрагмент расщепляемого линкера, присоединенный к N-концу блокирующего пептида на основе CD47, предотвращает связывание блокирующего пептида на основе CD47 с вариантом SIRP- α . Такой же эффект получали путем слияния блокирующего пептида на основе CD47, имеющего одно или несколько аминокислотных добавлений, например, одно добавление глицина (например, последовательностей SEQ ID NO: 46 в табл. 6), на N-конце блокирующего пептида на основе CD47, с С-концом варианта SIRP- α с помощью расщепляемого линкера и одного или нескольких спейсеров. Такой же эффект наблюдался при слиянии блокирующего пептида на основе CD47, имеющего одну или несколько аминокислотных замен, например, L101Q, L101Y, L101H, T102Q или T102H (например, последовательности SEQ ID NO: 41-45 в табл. 6), с С-концом варианта SIRP- α с помощью расщепляемого линкера и одного или нескольких спейсеров. Авторы продемонстрировали, что блокирующие пептиды на основе CD47 могут быть слиты в С-концом варианта SIRP- α и могут блокировать связывание варианта SIRP- α с CD47 до расщепления линкера и высвобождают вариант SIRP- α после расщепления линкера (смотри, например, SEQ ID NO: 55 на фиг. 5A и SEQ ID NO: 55 и 56 на фиг. 5B).

На основании этой информации можно создать белки слияния CD47-блокированные варианты SIRP- α , т.е. слияния мономера Fc-домена или HSA с вариантом SIRP- α путем выбора ориентации (например, N- или С-концевого слияния), что дает лучшие результаты в отношении фармакокинетики, эффективности, безопасности, получения и стабильности продукта.

Пример 6. Специфическое нацеливание вариантов SIRP- α посредством антитело-связывающего пептида.

Сначала использовали цетуксимаб, который, как известно, содержит участок для связывания с DLP, имеющий последовательность SEQ ID NO: 64, для проверки, может ли конструкция варианта SIRP- α , включающая вариант SIRP- α и DLP, концентрироваться на связанном антителе. Цетуксимаб иммобилизовали на чип Biacore CM4 (2000RU) с использованием химии EDC-NHS и конструкцию варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 66) при концентрации 100 нМ и 50 нМ вносили на чип (Biacore T100) со скоростью 30 мкл/мин, используя в качестве подвижного буфера и буфера для образца PBS, содержащий 0,01% P20. На фиг. 6 показано связывание на чипе конструкции варианта SIRP- α , но не только варианта SIRP- α . Затем инжестировали CD47-ECD и наблюдали связывание CD47 в случае, когда использовали конструк-

цию варианта SIRP- α , демонстрируя, что конструкция варианта SIRP- α может связываться одновременно с EGFR и CD47 (фиг. 6). Таким образом, конструкция варианта SIRP- α , включающая вариант SIRP- α и DLP, введенная имеющему рак пациенту, будет концентрироваться на участке, где происходит накопление терапевтического антитела (например, цетуксимаба), повышая эффективность и снижая токсичность.

Во-вторых, было продемонстрировано, что конструкция варианта SIRP- α , включающая вариант SIRP- α и DLP, может сначала связываться с цетуксимабом, который связан с EGFR, и затем связываться с CD47. Схема связывающегося комплекса показана на фиг. 7A. На чип CM4 иммобилизовали 3000 RU hrEGFR-Fc (R&D Systems) с использованием химии EDC/NHS. Различные концентрации цетуксимаба (4, 20 и 100 нМ) инжестировали со скоростью 30 мкл/мин (Biacore T100) с использованием PBS, содержащего 0,01% P20, в качестве буфера для образца и подвижного буфера. Наблюдалось связывание цетуксимаба с иммобилизованным hrEGFR-Fc. Затем инжестировали конструкцию варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 66) при концентрации 100 нМ и наблюдали связывание. Связывание не наблюдалось, когда вводили только вариант SIRP- α . Затем вводили CD47-ECD при концентрации 100 нМ и наблюдали связывание. Данные показаны на фиг. 7B и 7C. Таким образом, было продемонстрировано, что образование четырехкомпонентного комплекса EGFR-цетуксимаб-конструкция варианта SIRP- α SEQ ID NO: 66-CD47 является возможным. Конструкция варианта SIRP- α , включающая вариант SIRP- α и DLP, способна связываться и ингибировать CD47, когда конструкция предварительно сконцентрирована в пораженном заболевании участке путем специфического связывания с опухоль-специфическим антителом (например, цетуксимабом). Таким образом, следуя такому же принципу, конструкция варианта SIRP- α , включающая вариант SIRP- α , DLP и блокирующий пептида на основе CD47, также может связываться и ингибировать CD47, когда конструкция предварительно сконцентрирована в пораженном заболевании участке путем специфического связывания с опухоль-специфическим антителом (например, цетуксимабом).

Пример 7. Анализ на фагоцитоз.

Конструкцию варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 66), которая включает вариант SIRP- α , присоединенный к DLP посредством спейсеров, и вариант SIRP- α (SEQ ID NO: 31), тестировали в анализе на фагоцитоз на клетках DLD1 (фиг. 8). Анализ на фагоцитоз выполняли, как описано, например, в работе Weiskopf et al., Science 341:88-91, 2013. Протокол эксперимента описан ниже. Конструкция варианта SIRP- α (SEQ ID NO: 66) показала более высокую активность, чем взятый в отдельности вариант SIRP- α (SEQ ID NO: 31), вероятно по причине более высокого накопления на пораженных заболевании клетках.

Лейкоцитарные пленки получали из Stanford Blood Center от анонимных доноров и мононуклеарные клетки периферической крови обогащали путем центрифугирования в градиенте плотности над Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare). Моноциты очищали с использованием набора Macs Miltenyi Biotec Monocyte Isolation Kit II согласно инструкциям изготовителя. Это представляет систему непрямого магнитного мечения для выделения моноцитов из человеческих PBMC. Изолированные моноциты дифференцировали в макрофаги путем культивирования в среде RPMI 1640, дополненной 10% человеческой АВ сывороткой, инактивированной нагреванием, и 1% GlutaMax и 1% пенициллина и стрептомицина (GIBCO Life Technologies), в течение 6-10 дней. Для анализа на фагоцитоз 100000 клеток GFP+ DLD-1 наносили в лунки с U-образным дном 96-луночного планшета Ultra low attachment (Corning 7007). В опухолевые клетки DLD-1 в объеме 50 мкл/лунку добавляли 4 мкг/мл контроля изотипа IgG1k или 4 мкг/мл цетуксимаба (Absolute Antibody, Ab00279-10.0) и предварительно инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем в каждую лунку добавляли варианты SIRP- α в объеме 50 мкл/лунку и также макрофаги в объеме 50 мкл/лунку (1×10^6 /мл) (50000 макрофагов). Конечное разведение антител и образцов конструкций SIRP- α составило 1:4. Конечная концентрация цетуксимаба составила 1 мкг/мл. Совместное культивирование макрофагов, опухолевых клеток, антител и конструкций варианта SIRP- α проводили в течение 2 ч при 37°C. Для анализов образцы клеток фиксировали, окрашивали и анализировали с использованием BD FACS Canto. Первичные человеческие макрофаги идентифицировали проточной цитометрией с использованием анти-CD14, анти-CD45 или анти-CD206 антител (BioLegend). Погибшие клетки исключали из анализа путем окрашивания красителем DAPI (Sigma). Фагоцитоз оценивали в виде процентного содержания макрофагов GFP+ и нормализовали по максимальному ответу каждого независимого донора против каждой клеточной линии.

Пример 8. Моделирование pH-зависимого связывания вариантов SIRP- α с CD47.

Для конструирования pH-зависимого связывания с вариантом SIRP- α согласно изобретению может быть выполнен мутагенез гистидина на SIRP- α , особенно на участке SIRP- α , который взаимодействует с CD47. Кристаллические структуры комплекса SIRP- α и CD47 (см., например, PDB ID No. 2JJS) и компьютерное моделирование могут быть использованы для визуализации трехмерного участка связывания SIRP- α и CD47. Методы компьютерного дизайна и моделирования, используемые для дизайна белка с pH-чувствительными свойствами связывания, известны в литературе и описаны, например, в работе

Strauch et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 111:675-80, 2014, полное содержание которой включено здесь посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления компьютерное моделирование может быть использовано для идентификации ключевых контактных остатков на границе раздела SIRP- α и CD47. Идентифицированные ключевые контактные остатки могут быть заменены остатками гистидина с использованием доступного программного обеспечения для дизайна белков (например, RosettaDesign), с помощью которого можно создавать различные дизайны белков, которые могут быть оптимизированы, отобраны и ранжированы на основе вычисленной энергии связывания и комплементарности формы. Таким образом, энергетически благоприятные замены на гистидин в определенных аминокислотных положениях могут быть идентифицированы с использованием методов компьютерного дизайна. Компьютерное моделирование может быть также использовано для прогнозирования изменения в трехмерной структуре SIRP- α . Можно избежать замен на гистидин, которые вызывают значительное изменение в трехмерной структуре SIRP- α .

После идентификации энергетически и структурно оптимальных аминокислотных замен аминокислоты могут быть последовательно заменены на остатки гистидина. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько (например, одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять и т.д. до максимум 20) аминокислот SIRP- α могут быть заменены на остатки гистидина. В частности, аминокислоты, расположенные на границе раздела SIRP- α и CD47, предпочтительно аминокислоты, которые непосредственно участвуют в связывании SIRP- α с CD47, могут быть заменены на остатки гистидина. Варианты SIRP- α согласно изобретению могут включать одну или несколько (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять и т.д. до максимум 20) замен на остатки гистидина. В других вариантах осуществления природные остатки гистидина SIRP- α могут быть заменены другими аминокислотными остатками. В еще других вариантах осуществления одна или несколько аминокислот SIRP- α могут быть заменены негистидиновыми остатками для воздействия на связывание с CD47 природных или замененных остатков гистидина. Например, замена аминокислот, окружающих природный остаток гистидина, на другие аминокислоты может "захоронить" природный остаток гистидина. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты, не вовлеченные напрямую в связывание с CD47, т.е. внутренние аминокислоты (например, аминокислоты, расположенные у ядра SIRP- α), также могут быть заменены на остатки гистидина. В табл. 4 приводится перечень специфических аминокислот SIRP- α , которые могут быть заменены на остатки гистидина. Контактные остатки представляют собой аминокислоты, расположенные на границе раздела SIRP- α и CD47. Коровые остатки представляют собой внутренние аминокислоты, не вовлеченные напрямую в связывание между SIRP- α и CD47. Варианты SIRP- α согласно изобретению могут включать одну или несколько (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять и т.д. или все) замен, перечисленных в табл. 4.

Пример 9. Создание и скрининг вариантов SIRP- α с pH-зависимым связыванием с CD47.

Варианты SIRP- α , содержащие одну или несколько (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять и т.д., максимум 20) замен аминокислот остатками гистидина, могут быть созданы с использованием общепринятых технологий молекулярного клонирования и белковой экспрессии. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариант SIRP- α согласно изобретению, может быть клонирована в вектор, оптимизированный для экспрессии в бактериях, с использованием хорошо известных технологий молекулярной биологии. Затем вектор может быть трансформирован в бактериальные клетки (например, клетки *E.coli*), которые могут быть выращены до оптимальной плотности до индукции экспрессии белка. После индукции экспрессии белка (т.е. с использованием IPTG (изопропилтиогалактозида)) бактериальные клетки могут быть оставлены для роста в течение дополнительных 24 ч. Клетки могут быть собраны, и белок, экспрессирующий вариант SIRP- α , может быть очищен из супернатанта клеточной культуры с использованием, например, аффинной колоночной хроматографии. Очищенный вариант SIRP- α может быть подвергнут анализу с помощью SDS-PAGE с последующим окрашиванием кумасси синим для подтверждения присутствия полос белка предполагаемого размера.

Очищенные варианты SIRP- α могут быть подвергнуты скринингу на pH-зависимое связывание с CD47 с использованием методик, существующих в данной области, таких как фаговый дисплей, дрожжевой дисплей, поверхностный плазмонный резонанс, сцинтилляционные анализы сближения, ELISA, иммунологический анализ ORIGEN (IGEN), гашение флуоресценции и/или перенос энергии флуоресценции. Также может быть проведен скрининг на связывание с использованием подходящего биологического анализа. Желаемый вариант SIRP- α связывается с более высокой аффинностью с CD47 в условиях кислого pH (например, pH менее 7 (например, pH 6)), чем в условиях нейтрального pH (например, pH 7,4). Значение KD комплекса SIRP- α /CD47 при pH 6 будет ниже, чем значение KD комплекса SIRP- α /CD47 при pH 7,4.

Пример 10. Тестирование вариантов SIRP- α с pH-зависимым связыванием с CD47 у мышей.

Генетически сконструированные мышинные модели различных типов рака, например солидной опухоли и гематологической злокачественной опухоли, могут быть использованы для тестирования pH-зависимого связывания вариантов SIRP- α согласно изобретению с CD47 на пораженном заболевании

участке в мышинной модели. Вариант SIRP- α может быть введен напрямую или опосредованно в пораженный заболеванием участок у мышей, который позднее рассекают для обнаружения присутствия комплекса варианта SIRP- α и CD47 в пораженном заболеванием участке. Для обнаружения могут быть использованы антитела, специфические к варианту SIRP- α или CD47.

Другие варианты осуществления

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в представленном выше описании, включены здесь посредством ссылки. Разнообразные модификации и варианты описанных композиций и способов согласно изобретению будут очевидны для специалистов в данной области без отступления от объема и сущности изобретения. Хотя изобретение описано в связи с конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что заявленное изобретение не ограничивается такими конкретными вариантами осуществления. Несомненно, подразумевается, что различные модификации вышеописанных способов осуществления изобретения, которые очевидны для специалистов в данной области, находятся в пределах объема изобретения. Другие варианты осуществления находятся в пределах следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция для лечения рака, содержащая вариант сигнального регуляторного белка α (SIRP- α), присоединенный к блокирующему пептиду на основе CD47 посредством расщепляемого линкера, при этом блокирующий пептид на основе CD47 содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 36-46, или ее фрагмент, способный связываться с вариантом SIRP- α ; и

при этом вариант SIRP- α содержит аминокислотную последовательность, представленную в
EEEX₁QX₂IQPDKSVLVAAGETX₃TLRCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈GX₉F

PRVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFSIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYXCX₁₄KX₁₅RKGSPDDVEX₁₆KSGAGTE

LSVRAKPS (SEQ ID NO: 13),

в которой X₁ представляет собой L, I или V;

X₂ представляет собой V, L или I;

X₃ представляет собой A или V;

X₄ представляет собой A, I или L;

X₅ представляет собой I, T, S или F;

X₆ представляет собой E, V или L;

X₇ представляет собой K или R;

X₈ представляет собой E или Q;

X₉ представляет собой H, P или R;

X₁₀ представляет собой L, T или G;

X₁₁ представляет собой K или R;

X₁₂ представляет собой N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y;

X₁₃ представляет собой P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y;

X₁₄ представляет собой V или I;

X₁₅ представляет собой F, L или V;

X₁₆ представляет собой F или V, или

EEEX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILHCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPARX₆LIYNQ

X₇X₈GX₉FPRVTTVSEX₁₀TX₁₁RENMDFSISIX₁₂ITX₁₃ADAGTYXCX₁₄KX₁₅RKGSPDTEX₁₆KS

GAGTELSVRAKPS (SEQ ID NO: 14),

в которой X₁ представляет собой L, I или V;

X₂ представляет собой V, L или I;

X₃ представляет собой A или V;

X₄ представляет собой V, I или L;

X₅ представляет собой I, T, S или F;

X₆ представляет собой E, V или L;

X₇ представляет собой K или R;

X₈ представляет собой E или Q;

X₉ представляет собой H, P или R;

X₁₀ представляет собой S, T или G;

X₁₁ представляет собой K или R;

X₁₂ представляет собой N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W или Y;

X₁₃ представляет собой P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y;

X₁₄ представляет собой V или I;

X₁₅ представляет собой F, L или V;

X₁₆ представляет собой F или V.

2. Конструкция по п.1, отличающаяся тем, что вариант SIRP- α содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 24-34.
3. Конструкция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что расщепляемый линкер содержит один или несколько спейсеров.
4. Конструкция по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что указанный расщепляемый линкер расщепляется в условиях кислого pH и/или гипоксии.
5. Конструкция по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что указанный расщепляемый линкер способен к расщеплению под действием опухоль-ассоциированного фермента.
6. Конструкция по п.5, отличающаяся тем, что опухоль-ассоциированный фермент представляет собой протеазу, выбранную из группы, состоящей из матриптазы (MTSP1), активатора плазминогена урокиназного типа (uPA), легумаина, PSA (также называемого KLK3, калликреин-связанная пептидаза-3), матриксной металлопротеиназы-2 (MMP-2), MMP9, человеческой нейтрофильной эластазы (HNE), протеиназы 3 (Pr3), тканевого активатора плазминогена (tPA), плазмина и трипсина.
7. Конструкция по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что указанный расщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 47 и 69-99.
8. Конструкция по п.7, отличающаяся тем, что указанный расщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную в LSGRSDNH (SEQ ID NO: 47).
9. Конструкция по любому из пп.1-8, отличающаяся тем, что конструкция варианта SIRP- α содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 48-63.
10. Конструкция по любому из пп.1-9, отличающаяся тем, что вариант SIRP- α дополнительно присоединен к антитело-связывающему пептиду.
11. Конструкция по п.10, отличающаяся тем, что указанный антитело-связывающий пептид связывается с константной областью антитела, с областью антиген-связывающего фрагмента (Fab) антитела или с вариабельной областью антитела.
12. Конструкция по п.10, отличающаяся тем, что указанный антитело-связывающий пептид связывается с цетуксимабом.
13. Конструкция по п.10, отличающаяся тем, что указанный антитело-связывающий пептид имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75% идентичную последовательности пептида, локализованного в участке заболевания (DLP), представленной в SEQ ID NO: 64, или ее фрагменту или SEQ ID NO: 65 или ее фрагменту.
14. Конструкция по п.13, отличающаяся тем, что указанный антитело-связывающий пептид содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64.
15. Конструкция по любому из пп.1-9, отличающаяся тем, что вариант SIRP- α дополнительно присоединен к мономеру домена Fc.
16. Конструкция по любому из пп.1-9, отличающаяся тем, что вариант SIRP- α дополнительно присоединен к человеческому сывороточному альбумину (HSA).
17. Конструкция по п.16, отличающаяся тем, что указанный HSA содержит аминокислотную замену C34S и/или K573P относительно последовательности SEQ ID NO: 67.
18. Конструкция по п.16, отличающаяся тем, что указанный HSA содержит последовательность SEQ ID NO: 68.
19. Конструкция по любому из пп.1-9, отличающаяся тем, что вариант SIRP- α дополнительно присоединен к альбумин-связывающему пептиду.
20. Конструкция по п.19, отличающаяся тем, что указанный альбумин-связывающий пептид содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64.
21. Конструкция по любому из пп.1-9, отличающаяся тем, что указанный полипептид SIRP- α дополнительно присоединен к полимеру, выбранному из цепи полиэтиленгликоля (PEG) или цепи полисиаловой кислоты.
22. Конструкция по п.1, отличающаяся тем, что указанный полипептид SIRP- α дополнительно присоединен к антителу.
23. Конструкция по п.22, отличающаяся тем, что указанное антитело представляет собой опухоль-специфическое антитело.
24. Конструкция по п.22, отличающаяся тем, что указанное антитело выбрано из группы, состоящей из цетуксимаба, пембролизумаба, ниволумаба, пидилизумаба, MEDI0680, MEDI6469, ипилимумаба, тремелизумаба, урелумаба, ванктизумаба, варилумаба, могамализумаба, анти-CD20 антитела, анти-CD19 антитела, анти-CS1 антитела, герцептина, трастузумаба и пертузумаба.
25. Конструкция по п.22, отличающаяся тем, что указанное антитело связывается с одним или более из следующего: 5T4, AGS-16, ALK1, ANG-2, B7-H3, B7-H4, c-fms, c-Met, CA6, CD123, CD19, CD20, CD22, EpCAM, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD70, CD74, CD79b, CD98, CEA, CEACAM5, CLDN18.2, CLDN6, CS1, CXCR4, DLL-4, EGFR, EGP-1, ENPP3, EphA3, ETBR, FGFR2, фибронектин, FR-альфа, GCC, GD2, глипикан-3, GPNMB, HER2, HER3, HLA-DR, ICAM-1, IGF1R, IL-3R, LIV-1, мезотелин, MUC16, MUC1, NaPi2b, нектин-4, Notch 2, Notch 1, PD-L1, PD-L2, PDGFR- α , PS,

PSMA, SLITRK6, STEAP1, TEM1, VEGFR, CD25, CD27L, DKK-1, CSF-1R и/или MSB0010718C.

26. Конструкция по любому из пп.1-25, отличающаяся тем, что указанный полипептид SIRP- α имеет последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 24-34.

27. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию по любому из пп.1-26.

28. Вектор для экспрессии конструкции по любому из пп.1-26, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.27.

29. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.27 или вектор по п.28.

30. Способ получения конструкции по любому из пп.1-26, который включает:

(а) культивирование клетки-хозяина по п.29 в условиях, при которых производится конструкция; и

(б) извлечение конструкции, произведенной клеткой-хозяином.

31. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая конструкцию по любому из пп.1-26 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

32. Способ увеличения фагоцитоза раковой клетки у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту конструкции полипептида SIRP- α по любому из пп.1-26 или фармацевтической композиции по п.31.

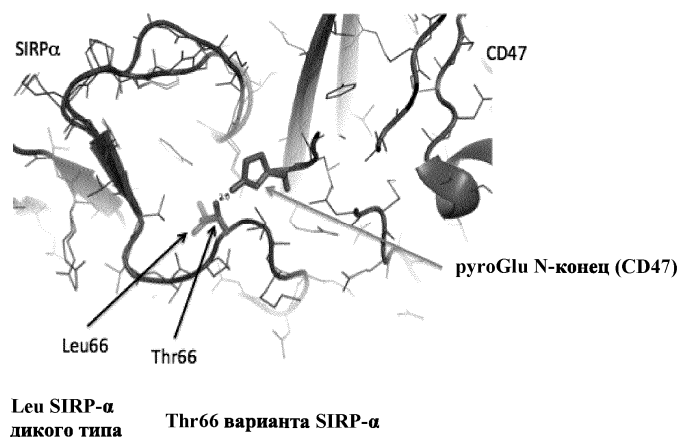
33. Способ уничтожения раковой клетки, включающий контактирование указанной раковой клетки с конструкцией полипептида SIRP- α по любому из пп.1-26 или фармацевтической композицией по п.31.

34. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества конструкции полипептида SIRP- α по любому из пп.1-26 или фармацевтической композиции по п.31.

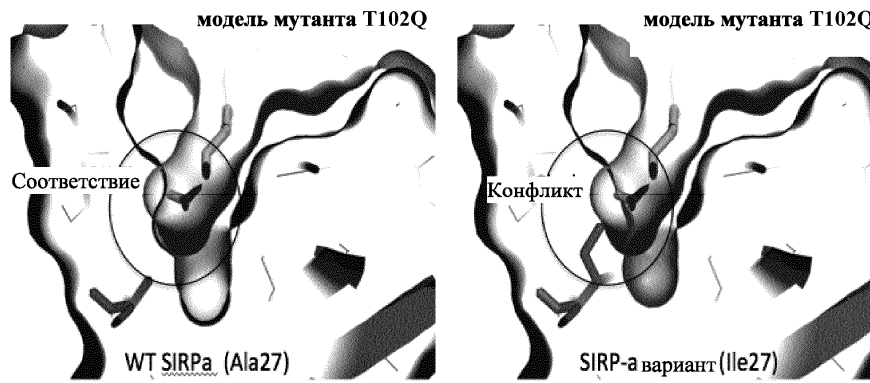
35. Способ по любому из пп.32-34, отличающийся тем, что указанные раковая клетка или рак выбраны из рака с солидной опухолью, гематологической злокачественной опухоли, острого миелоцитарного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, неходжкинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, множественной миеломы, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака шейки матки, рака эндометрия, рака легких, рака бронхов, рака печени, рака яичников, рака толстой и прямой кишки, рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта, рака желчного пузыря, рака с гастроинтестинальной стромальной опухолью, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, рака ротоглотки, рака пищевода, меланомы, немеланомного рака кожи, карциномы из клеток Меркеля, индуцированного вирусами рака, нейробластомы, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака почки, почечно-клеточного рака, рака почечной лоханки, лейкоза, лимфомы, саркомы, глиомы, опухоли головного мозга и карциномы.

36. Способ по п.34 или 35, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой млекопитающее.

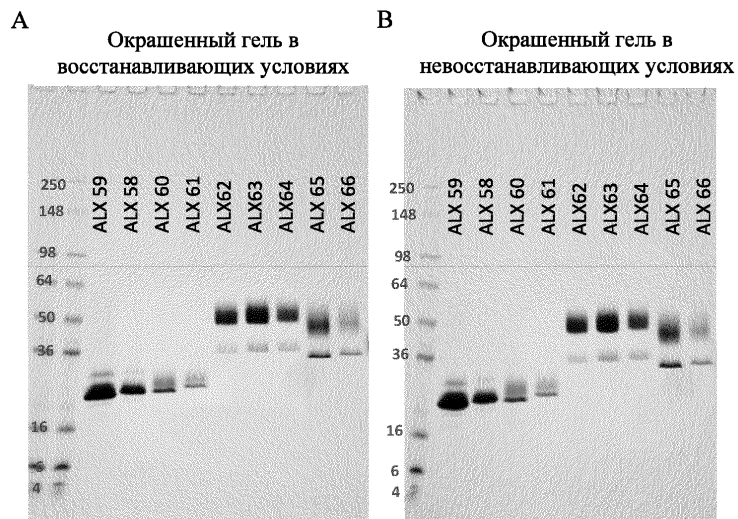
37. Способ по п.36, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой человека.



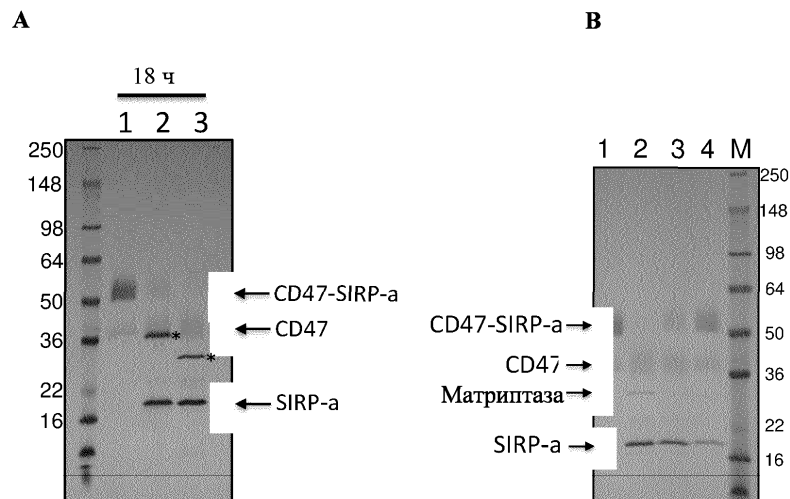
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



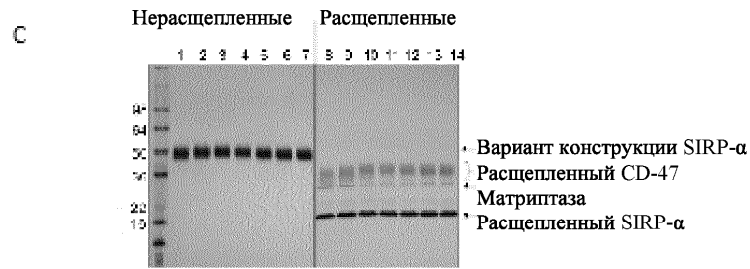
Линии:

1. Нет протеазы
2. uPA
3. Матриптаза

*Обозначает положение полосы для избытка uPA или матриптазы

Линии:

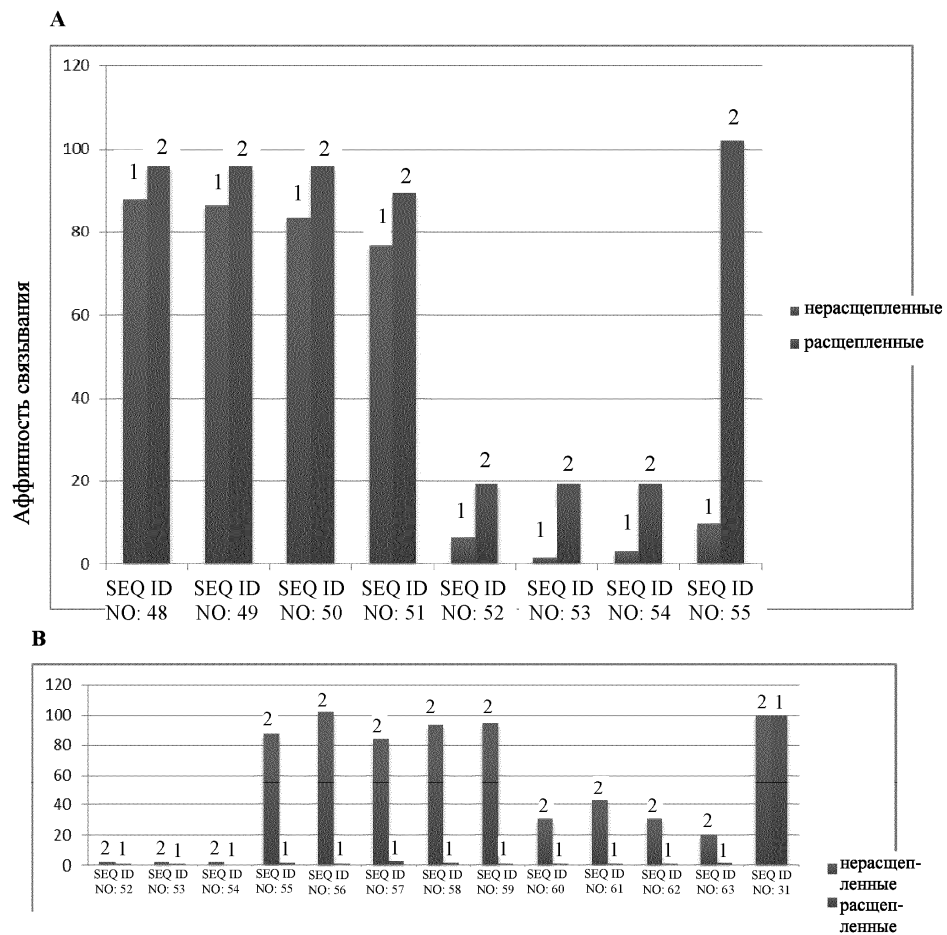
1. Нет матриптазы
2. 44 нг матриптазы
3. 0,44 нг матриптазы
4. 0,167 нг матриптазы



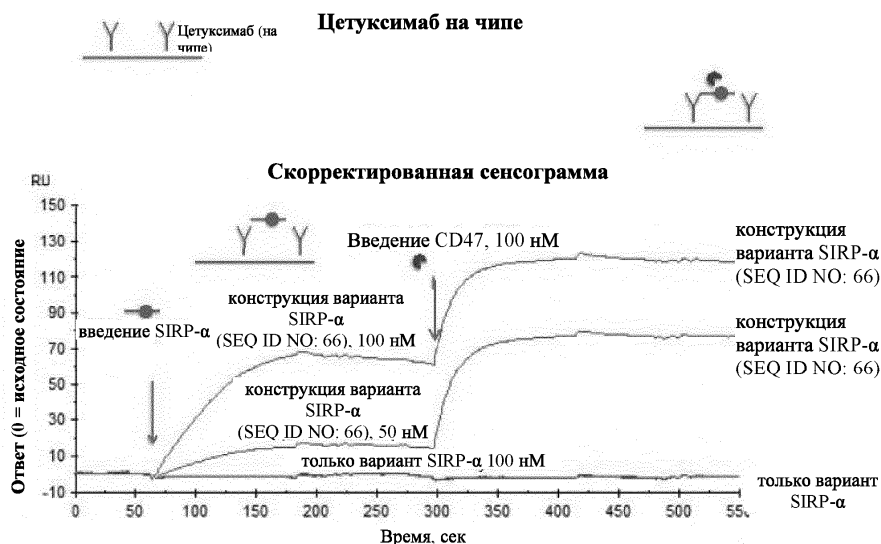
Линии:

- | | |
|--|----------------------|
| 1. Вариант конструкции SIRD-α SEQ ID NO: 57 | } Без матриптазы |
| 2. Вариант конструкции SIRD-α SEQ ID NO: 58 | |
| 3. Вариант конструкции SIRD-α SEQ ID NO: 59 | |
| 4. Вариант конструкции SIRD-α SEQ ID NO: 60 | |
| 5. Вариант конструкции SIRD-α SEQ ID NO: 61 | |
| 6. Вариант конструкции SIRD-α SEQ ID NO: 62 | |
| 7. Вариант конструкции SIRD-α SEQ ID NO: 63 | |
| 8. Вариант конструкции SIRD-α SEQ ID NO: 57 | } 0,44 нг матриптазы |
| 9. Вариант конструкции SIRD-α SEQ ID NO: 58 | |
| 10. Вариант конструкции SIRD-α SEQ ID NO: 59 | |
| 11. Вариант конструкции SIRD-α SEQ ID NO: 60 | |
| 12. Вариант конструкции SIRD-α SEQ ID NO: 61 | |
| 13. Вариант конструкции SIRD-α SEQ ID NO: 62 | |
| 14. Вариант конструкции SIRD-α SEQ ID NO: 63 | |

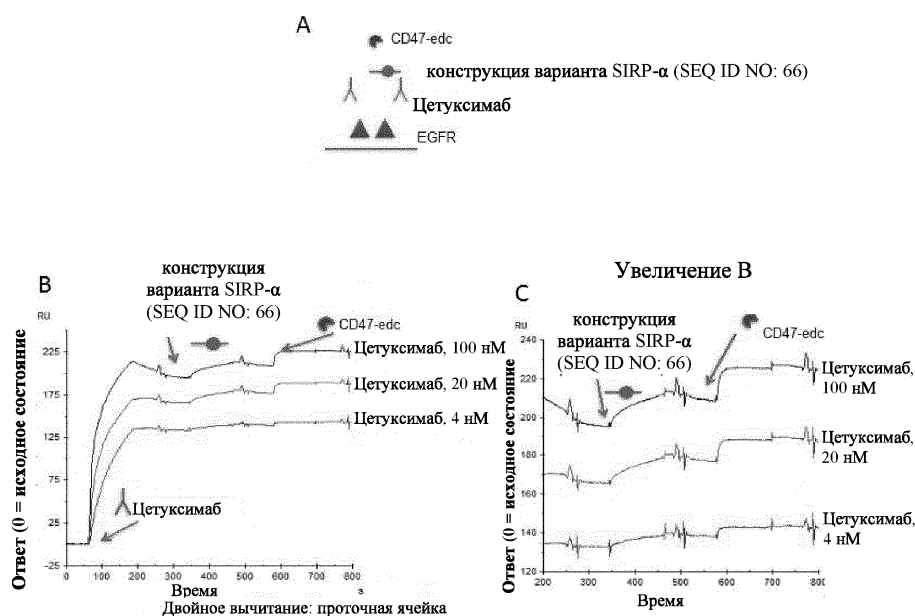
Фиг. 4



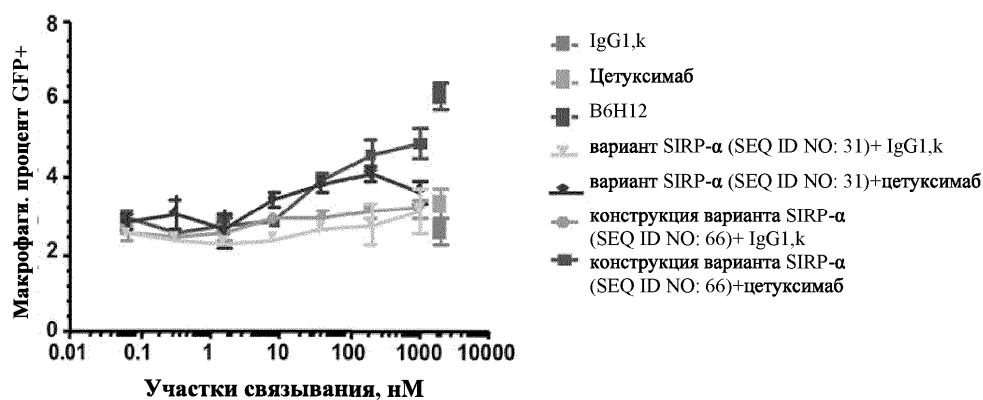
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

