

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091859** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2021.02.04**

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 14/705* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2019.03.13**

---

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ К SIRPA V1 ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ  
АНТИТЕЛ К SIRPA V1**

---

(31) **18305271.1**

(72) Изобретатель:

(32) **2018.03.13**

**Пуарье Никола, Готье Ванесса, Мари  
Каролина, Пенгам Сабрина, Ванхове  
Бернард (FR)**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2019/056250**

(87) **WO 2019/175218 2019.09.19**

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

**Нилова М.И. (RU)**

**ОСЕ ИММЬЮНОТЕРАПЬЮТИКС  
(FR)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к области иммунотерапии. Согласно настоящему изобретению предложены антитела, подходящие для применения в терапии и диагностике, которые нацелены на SIRPa человека, при этом указанные антитела усиливают перекрестную презентацию антигенов Т-клеткам. Согласно настоящему изобретению также предложены антитела к конкретным изоформам SIRPa, способные нарушать взаимодействие между указанными изоформами SIRPa и CD47 человека, для применения при лечении или предотвращении заболевания или для применения в диагностике, и способы получения и/или выбора антител к SIRPa человека, которые связываются с различными изоформами представителей SIRP человека с разной аффинностью.

**A1**

**202091859**

**202091859**

**A1**

# **ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ К SIRPA V1 ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ**

## **АНТИТЕЛ К SIRPA V1**

[1] Настоящее изобретение относится к области иммунотерапии. Согласно настоящему изобретению предложены антитела, подходящие для применения в терапии и диагностике, нацеленные на SIRPa человека, при этом указанные антитела усиливают перекрестную презентацию антигенов Т-клеткам. Согласно настоящему изобретению также предложены антитела к конкретным изоформам SIRPa, способные нарушать взаимодействие между указанными изоформами SIRPa и CD47 человека, для применения в лечении или предотвращении заболевания или для применения в диагностике. Настоящее изобретение также относится к способам получения и/или выбора (селекции) антител к SIRPa человека, которые связываются с различными изоформами представителей семейства SIRP человека с разной аффинностью.

### **Краткое описание уровня техники**

[2] Нацеливание на иммунные контрольные точки приобретенного иммунитета продемонстрировало высокую терапевтическую эффективность в борьбе со многими раковыми заболеваниями. Иммунные контрольные точки на миелоидных клетках, таких как макрофаги, дендритные клетки (ДК), супрессорные клетки миелоидного происхождения (СКМП) и полиморфно-ядерные лейкоциты или нейтрофилы (ПМН), все еще малоизучены, хотя эти клетки представляют собой самый распространенный тип иммунных клеток во многих солидных опухолях, и часто связаны с неблагоприятным исходом.

[3] Сигнальный регуляторный белок альфа (SIRPa, также обозначаемый SIRP-альфа, SIRP $\alpha$ , CD172a или SHPS-1) экспрессируется на моноцитах, большинстве субпопуляций тканевых макрофагов, гранулоцитах, субпопуляции ДК в лимфоидных тканях, некоторых клетках-предшественниках костного мозга и на различных уровнях на нейронах, со значительной экспрессией в богатых синапсами областях мозга, таких как зернистый слой мозжечка и гиппокампа.

[4] SIRPa является классическим членом семейства спаренных рецепторов SIRP: близкородственных SIRP-белков, включающего SIRPa, SIRPg (также обозначаемый SIRP-гамма, SIRP $\gamma$ , CD172g или SIRP-бета-2) и SIRPb (также обозначаемый SIRP-бета, SIRP $\beta$ , CD172b). Сигнальные регуляторные белки (SIRP) составляют семейство гликопротеинов клеточной поверхности, которые экспрессируются на миелоидных клетках (включая макрофаги, гранулоциты, миелоидные дендритные клетки и тучные клетки) и нейронных

клетках (кратко описаны в Barclay, A.N. & Brown, M.H., *Nat Rev Immunol* 6, 457-64 (2006); см. также WO 97/48723). CD47, широко экспрессируемый трансмембранный гликопротеин, выполняет функцию клеточного лиганда для SIRPa и связывается с NH<sub>2</sub>-концевой внеклеточной областью SIRPa. Роль SIRPa лучше всего описана в документах в отношении его ингибирующей роли в фагоцитозе клеток-хозяев макрофагами. В частности, связывание SIRPa на макрофагах гликопротеином CD47, экспрессируемым на клетках-мишенях, вырабатывает ингибирующий сигнал, который отрицательно регулирует фагоцитоз. Однако недавние результаты также продемонстрировали дополнительные положительные сигнальные эффекты, опосредуемые связыванием SIRPa (Shultz, L.D. et al. (1995) *J Immunol* 154, 180-91).

[5] Ген, кодирующий SIRPa, представляет собой полиморфный ген, и для популяций человека описаны несколько его вариантов. Самые распространенные варианты SIRPa человека представляют собой вариант-1 SIRPa (SIRPa v1) и вариант-2 SIRPa (SIRPa v2) (номер доступа NP\_542970 (P78324) и CAA71403, соответственно), и семейство SIRPa обычно делят на эти две подгруппы; а именно семейство изоформ SIRPa v1 и семейство изоформ SIRPa v2.

[6] Экспрессируемый миелоидными клетками SIRPa взаимодействует с повсеместно распространенным рецептором CD47, и это взаимодействие является важной иммунной контрольной точкой врожденного ответа, вовлеченной в регуляцию функций миелоидных клеток. Взаимодействие между SIRPa и CD47 обеспечивает сигнал понижающей регуляции, который ингибирует фагоцитоз клетки-хозяина. Поскольку CD47 в значительной степени сверхэкспрессируется в некоторых раковых клетках, CD47 действует как сигнал «не ешь меня» (“don’t eat me”) в некоторых опухолях, содержащих эти клетки, что таким образом позволяет избежать фагоцитоза. На протяжении последних лет активно исследуют потенциальный вклад взаимодействия CD47-SIRPa в клиренс раковых клеток. Было показано, что распространенность рецепторов CD47 в опухолях отрицательно коррелирует с общей выживаемостью пациентов и является неблагоприятным прогностическим фактором в случае некоторых видов рака.

[7] Соответственно, путь SIRPa/CD47 являлся объектом различных фармацевтических разработок для усиления фагоцитоза макрофагами. Были предложены различные подходы к нарушению взаимодействия CD47/SIRPa с целью влияния на биологический исход. Эти подходы включают применение фрагментированных/укороченных белков SIRPa и/или CD47 и антител к ним. Сверхэкспрессия CD47 раковыми клетками делает их устойчивыми к макрофагам, даже когда эти клетки покрыты терапевтическими антителами. Было показано, что блокада пути SIRPa/CD47 агентами, нацеленными на CD47, усиливает

антителозависимый фагоцитоз макрофагами. Также описано, что эти виды терапии действуют синергетически с истощающими терапевтическими противораковыми антителами, такими как трастузумаб (анти-Her2), цетуксимаб (анти-EGFR), ритуксимаб (анти-Cd20) и алемтузумаб (анти-CD52).

[8] Однако недавно было показано, что агенты анти-CD47 демонстрируют гематологическую токсичность, связанную с физиологической ролью CD47. Например, эти агенты анти-CD47 могут вызывать анемию или тромбоцитопению. Более того, CD47 также вовлечен в другие пути с другими членами семейства SIRP. Действительно, CD47 также взаимодействует с SIRP $\alpha$ , присутствующим на поверхности Т-клеток человека, но не на миелоидных клетках человека. Взаимодействие SIRP $\alpha$ /CD47 опосредует межклеточную адгезию, усиливает суперантиген-зависимую опосредованную Т-клетками пролиферацию и костимулирует активацию Т-клеток (Piccio et al., 2005).

[9] Соответственно, на протяжении последних лет были разработаны антитела к SIRP человека, способные связывать только один вид SIRP и способные нарушать связывание CD47 с SIRP $\alpha$ , для того чтобы избежать нежелательных эффектов, таких как ингибирование пролиферации Т-клеток. К сожалению, из-за природы SIRP $\alpha$ -семейства белков, антитела, известные из уровня техники, могут не быть эффективными для лечения заболевания, в которое вовлечен SIRP $\alpha$ , когда белки SIRP $\alpha$ , экспрессируемые клетками пациента, представляют собой SIRP $\alpha$  v1 или SIRP $\alpha$  v2. Некоторые антитела могут подходить для лечения пациентов с SIRP $\alpha$  v1, но могут демонстрировать сниженную терапевтическую функцию для лечения пациентов с SIRP $\alpha$  v2 или наоборот. Поскольку лечение некоторых видов рака тесно связано с фенотипом пациента, существует потребность в разработке антител, нацеленных на изоформы, экспрессируемые клетками каждого пациента. Следовательно, в этой области техники по-прежнему существует потребность в разработке новых и улучшенных агентов, в частности антител, направленно воздействующих на SIRP $\alpha$  с более высокой специфичностью. Также существует потребность в разработке способа получения таких специфичных антител, способа выбора этих антител и способа определения вероятности ответа пациентом на лечение антителом к SIRP $\alpha$  человека до получения такого лечения.

[10] В этой области техники также существует потребность в усилении перекрестной презентации антигена антигенпрезентирующими клетками (АПК). АПК, в частности дендритные клетки, играют уникальные и различные роли в возникновении опухоли, развитии заболевания, прогрессировании заболевания и ответе на терапию. Например, дендритные клетки активно поглощают опухолеассоциированные антигены, процессируют их и презентуют антигенные пептиды Т-клеткам, таким образом индуцируя и

поддерживая опухолеспецифические Т-клеточные ответы. Дендритные клетки (ДК) также называют профессиональными АПК. Взаимодействие дендритных клеток с различными иммунными эффекторными клетками может также поддерживать врожденный противоопухолевый иммунитет, а также гуморальный ответ, который, как известно, в некоторых случаях также ингибирует развитие опухоли. С другой стороны, ДК рекрутируются в место локализации опухоли специфическими факторами, происходящими из опухоли и стромы, которые могут нарушать их созревание, их дифференцировку и/или их функцию, и таким образом приводить к недостаточному формированию противоопухолевого иммунного ответа или развитию опосредованной дендритными клетками толерантности и подавлению иммунитета. Идентификация ДК-стимулирующих и ДК-подавляющих/поляризующих факторов в окружении опухоли и механизма модуляции ДК имеет важное значение для разработки эффективных вакцин на основе ДК и для восстановления иммунодефицитных резидентных ДК, ответственных за поддержание клинически значимого противоопухолевого иммунитета у пациентов, страдающих раком (Zong et al., 2016). SIRPa-отрицательные дендритные клетки описаны как АПК, наиболее эффективные для перекрестной презентации антигенов у мыши и человека. Известно, что SIRPa-положительные ДК менее эффективны в отношении перекрестной презентации (Meral et al., 2013; Nierkens et al., 2015; Segura et al., 2015).

[11] Раковые клетки экспрессируют опухолевые антигены, включая неоантигены, полученные в результате несинонимичных мутаций, но плохо презентируют антигены. Восстановление иммунодефицитных резидентных дендритных клеток, ответственных за поддержание клинически значимого противоопухолевого иммунитета у пациентов, страдающих раком, является важным вопросом в терапии, который следует рассмотреть. Усиление антителом перекрестной презентации опухолевых антигенов или мутированных антигенов, присутствующих в конкретных раковых опухолях, может представлять основной интерес для лечения или предотвращения некоторых заболеваний, включая раковые заболевания. Сигнальный путь CD47/SIRPa может представлять интерес для модуляции перекрестной презентации антигена Т-клеткам (Criscitello, 2012; Ilyas and Yang, 2015; Vigneron, 2015).

[12] Нарушение презентации антигена является основным механизмом ускользания от иммунологического надзора при раке, и понижающая регуляция/ослабление презентации антигена является основным механизмом ускользания от иммунологического надзора при раке (Sánchez-Paulete et al., 2017). Соответственно, существует потребность в разработке продукта, который при применении будет усиливать перекрестную презентацию антигена.

[13] В заявке на патент PCT/EP/2017/059071 описаны новые антитела анти-SIRPa, способные специфично уменьшать взаимодействие между SIRPa и CD47, и не влиять при этом на взаимодействие между SIRPg и CD47. В публикации патента WO201356352 описан выбор антитела анти-SIRPa (SIRP29) из библиотеки фагового дисплея, называемой библиотекой F, которую использовали для выбора агентов, связывающих SIRPa v1 и v2, и отрицательных в отношении SIRPb и SIRPg. Антитело, раскрытое в указанной публикации, способно распознавать оба варианта в популяции. Кроме того, авторы настоящего изобретения действительно продемонстрировали, что антитело SIRP29 на самом деле способно связывать SIRPg и нарушать взаимодействие SIRPg-CD47.

[14] В опубликованной заявке на патент WO2015138600 предложены композиции и способы, относящиеся к антителам к SIRPa. Антитела согласно указанной заявке связываются с SIRPa человека и могут блокировать взаимодействие CD47, экспрессируемого на представляющей интерес клетке-мишени, с SIRPa, экспрессируемым на фагоцитарной клетке. Рассмотренные антитела находят применение в различных способах терапии. В некоторых случаях антитела анти-SIRPa могут связываться с SIRPa, но не стимулируют передачу сигнала SIRPa в клетке, экспрессирующей указанный SIRPa. Более того, антитела, описанные в указанной заявке, способны связывать SIRPg и блокировать взаимодействие между CD47 и SIRPg.

[15] Соответственно, у антител, описанных в уровне техники, отсутствует способность различать разные члены семейства SIRP, и существует потребность в разработке более специфичных антител, в частности, для их применения для предотвращения или лечения некоторых заболеваний.

### **Описание изобретения**

[16] В соответствии с одним из аспектов настоящего изобретения предложено антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент (антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела), или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело (указанное антитело, которое является модифицированным) для применения в лечении состояния, при этом пациент, получающий указанное лечение, является SIRPa v1-положительным (т.е. является либо гомозиготным по аллелю SIRPa (v1/v1), либо гетерозиготным по аллелю SIRPa (v1/v2)).

[17] В конкретном варианте реализации предложено антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело, содержащее:

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), HCDR2 и HCDR3,

где:

HCDR1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 9,

HCDR2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 10 или SEQ ID No: 11, в частности, HCDR2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 11;

HCDR3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 12 или SEQ ID No: 13, или SEQ ID No: 14, или SEQ ID No: 15; в частности, HCDR3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 13 или SEQ ID No: 14, или SEQ ID No: 15, в частности, HCDR3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 15;

и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 16 и SEQ ID No: 17; в частности, вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 17;

при этом указанное антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека и не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека;

для применения в предотвращении и/или лечении заболевания у субъекта, который является SIRPa v1-положительным.

[18] В другом варианте реализации также предложено антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело, которое:

- специфично связывается с SIRPa v1 человека и/или SIRPa v2 человека, в частности с SIRPa v1 человека и SIRPa v2 человека, и которое ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека и/или SIRPa v2 человека соответственно, в частности, которое ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека и SIRPa v2 человека;
- не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPg человека; и, в частности, не связывается специфично с SIRPg человека;

для применения в лечении или предотвращении заболевания, в частности рака, или для применения в терапевтической вакцинации против заболевания, в частности против рака,

при этом указанное антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело усиливает перекрестную презентацию антигена, экспрессируемого при указанном заболевании, в частности при раке, и вовлечено в индукцию Т-клеточного ответа, подходящего для лечения указанного заболевания.

[19] В конкретном варианте реализации антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело для применения согласно настоящему изобретению специфично связывается с SIRPa v1 человека и ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v1. Такое антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело для применения согласно настоящему изобретению, в частности, подходит для лечения или предотвращения заболевания, в частности рака, или для применения в терапевтической вакцинации против заболевания, в частности против рака, у SIRPa v1-положительного пациента.

[20] Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело, содержащее:

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

где:

HCDR1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 9,

HCDR2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 10 или SEQ ID No: 11, в частности, HCDR2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 11;

HCDR3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 12 или SEQ ID No: 13, или SEQ ID No: 14, или SEQ ID No: 15; в частности, HCDR3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 13 или SEQ ID No: 14, или SEQ ID No: 15, в частности, HCDR3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 15;

и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 16 и SEQ ID No: 17; в частности, вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 17;

которое усиливает перекрестную презентацию антигена, в частности ракового антигена, антигенпрезентирующими клетками, в частности дендритными клетками, Т-клеткам человека, в частности CD8<sup>+</sup> Т-клеткам человека;



для применения в лечении или предотвращении заболевания, в частности рака, или для применения в терапевтической вакцинации против заболевания, в частности против рака, при этом указанное антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело усиливает перекрестную презентацию антигена, экспрессируемого при указанном заболевании, в частности при раке, и вовлечено в индукцию Т-клеточного ответа, подходящего для лечения указанного заболевания.

[21] В конкретном варианте реализации настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело для применения в предотвращении и/или лечении заболевания, в частности конкретных заболеваний, описанных в настоящем документе, содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 18; SEQ ID No: 19; SEQ ID No: 20; SEQ ID No: 21; SEQ ID No: 22 и SEQ ID No: 23; в частности, указанный переменный домен тяжелой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20.

[22] «Антитело к SIRPa v1 человека» представляет собой антитело, которое проявляет значительную аффинность связывания в отношении SIRPa v1 и которое может не проявлять значительной аффинности связывания в отношении SIRPa v2 человека и/или SIRPg человека, причем аффинность связывания в каждом случае может быть определена способами, известными в этой области техники, такими как, но не ограничиваясь ими, анализ Biacore, анализ Blitz, ELISA-анализ или график Скэтчарда. «Антитело анти-SIRPa (к SIRPa) v1» можно также определить как антитело, которое проявляет значительную аффинность связывания в отношении SIRPa v1 и которое блокирует взаимодействие между CD47 человека и SIRPa v1 человека, и которое не блокирует взаимодействие между CD47 человека и SIRPa v2 человека, и в предпочтительном варианте реализации которое не блокирует взаимодействие между CD47 человека и SIRPg человека. Под термином «блокирует взаимодействие» следует понимать, что антитело оказывает антагонистическое действие на взаимодействие CD47/SIRPa v1. При употреблении в отрицательной форме этот термин означает, что антитело не оказывает антагонистического действия на взаимодействие CD47/SIRPa v2 и в предпочтительном варианте реализации в дополнение к этому не оказывает антагонистического действия на взаимодействие CD47/SIRPg.

[23] В настоящей заявке термин «антитело» относится к любому виду антител, такому как моноклональные антитела, поликлональные антитела, рекомбинантные антитела, химерные антитела и гуманизированные антитела.

[24] Антитела согласно настоящему изобретению включают моноклональные и поликлональные антитела. В настоящей заявке термин «моноклональное антитело» относится к препарату молекул антител, антител, которые содержат общую аминокислотную последовательность тяжелой цепи и общую аминокислотную последовательность легкой цепи, в отличие от препаратов «поликлональных» антител, которые содержат смесь антител с различной аминокислотной последовательностью. Моноклональные антитела могут быть получены несколькими известными методами, такими как фаговый, бактериальный, дрожжевой или рибосомный дисплей, а также классическими способами, примером которых является получение антител из гибридом. Таким образом, термин «моноклональное» относится ко всем антителам, происходящим из одного клона нуклеиновой кислоты.

[25] Антитела согласно настоящему изобретению включают рекомбинантные антитела. В настоящей заявке термин «рекомбинантное антитело» относится к антителам, которые продуцируют, экспрессируют, получают или выделяют рекомбинантными способами, таким как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина; антитела, выделенные из комбинаторной библиотеки рекомбинантных антител; антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным, поскольку содержит гены иммуноглобулина человека; или антителам, которые продуцируют, экспрессируют, получают или выделяют любым другим способом, в котором конкретные последовательности гена иммуноглобулина (такие как последовательности гена иммуноглобулина человека) объединяют с другими последовательностями ДНК. Рекомбинантные антитела включают, например, химерные и гуманизированные антитела.

[26] Антитела согласно настоящему изобретению включают химерные антитела. В настоящей заявке термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором последовательность переменного домена, полученного из зародышевой линии одного вида млекопитающего, такого как мышь, была «привита» в последовательность константного домена, полученного из зародышевой линии другого вида млекопитающего, например, человека.

[27] Антитела согласно настоящему изобретению включают гуманизированные антитела. В настоящей заявке термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, в котором последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающего, такого как мышь, были «привиты» в последовательности каркасной области человека.

[28] В настоящей заявке термин «антигенсвязывающий фрагмент антитела» означает часть антитела, т.е. молекулу, соответствующую части структуры антитела согласно настоящему изобретению, которая проявляет антигенсвязывающую способность в отношении SIRPa v1, возможно, в ее нативной форме; такой фрагмент главным образом проявляет такую же или по существу такую же специфичность связывания антигена в отношении указанного антигена в сравнении со специфичностью связывания антигена, характерной для соответствующего четырехцепочечного антитела. Предпочтительно, антигенсвязывающие фрагменты обладают аффинностью связывания, схожей с аффинностью связывания у соответствующих 4-цепочечных антител. Однако антигенсвязывающие фрагменты, которые обладают сниженной аффинностью связывания антигена относительно соответствующих 4-цепочечных антител, также включены в настоящее изобретение. Способность связывать антиген может быть определена путем измерения аффинности между антителом и фрагментом-мишенью. Эти антигенсвязывающие фрагменты могут также называться «функциональными фрагментами» антител.

[29] Антигенсвязывающие фрагменты антител представляют собой фрагменты, которые содержат гипервариабельные домены, обозначаемые CDR (определяющие комплементарность области), или их часть (части), содержащую сайт распознавания антигена, т.е. внеклеточного домена SIRPa v1, что таким образом определяет специфичность распознавания антигена.

[30] Каждый вариабельный домен легкой и тяжелой цепи (VL и VH соответственно) четырехцепочечного иммуноглобулина содержит три CDR, обозначаемые VL-CDR1 (или LCDR1), VL-CDR2 (или LCDR2), VL-CDR3 (или LCDR3) и VH-CDR1 (или HCDR1), VH-CDR2 (или HCDR2), VH-CDR3 (или HCDR3) соответственно.

[31] Специалист может определить расположение различных областей/доменов антител на основе стандартных определений, приведенных в этой связи, включая эталонную систему нумерации, на основе системы нумерации Кабата или путем применения алгоритма IMGT «collier de perle». В этом отношении для определения последовательностей согласно настоящему изобретению следует отметить, что определение границ областей/доменов может варьироваться от одной эталонной системы к другой. Соответственно, области/домены, определенные согласно настоящему изобретению, охватывают последовательности, демонстрирующие вариации длины или локализации рассматриваемых последовательностей в пределах полноразмерной последовательности вариабельных доменов антител, составляющие приблизительно +/- 10%.

[32] Таким образом, на основе структуры четырехцепочечных иммуноглобулинов антигенсвязывающие фрагменты могут быть определены путем сравнения с последовательностями антител в доступных базах данных и антител уровня техники и в особенности путем сравнения расположения функциональных доменов в этих последовательностях, учитывая, что положения каркасных и константных доменов хорошо определены для различных классов антител, особенно для IgG, в частности для IgG млекопитающих. Такое сравнение также включает данные, относящиеся к трехмерным структурам антител.

[33] Для иллюстрации конкретных вариантов реализации настоящего изобретения антигенсвязывающие фрагменты антитела, которые содержат переменные домены, содержащие CDR-области указанного антитела, включают Fv, dsFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>. Fv-фрагменты состоят из VL- и VH-доменов антитела, связанных друг с другом гидрофобными взаимодействиями; в dsFv-фрагментах гетеродимер VH:VL стабилизирован дисульфидной связью; в scFv-фрагментах VL- и VH-домены соединены друг с другом через гибкий пептидный линкер с образованием таким образом одноцепочечного белка. Fab-фрагменты представляют собой мономерные фрагменты, получаемые путем расщепления антитела под действием папаина; они содержат целую легкую (L) цепь и фрагмент VH-CH1 тяжелой (H) цепи, связанные друг с другом дисульфидной связью. F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент может быть получен путем расщепления антитела под действием пепсина ниже дисульфидной связи шарнирной области; он содержит два Fab'-фрагмента и дополнительно часть шарнирной области молекулы иммуноглобулина. Fab'-фрагменты могут быть получены из F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов путем разрыва дисульфидной связи в шарнирной области. F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты являются двухвалентными, т.е. они содержат два антигенсвязывающих сайта подобно нативной молекуле иммуноглобулина; в свою очередь Fv- (димер VHVL, составляющий переменную часть Fab), dsFv-, scFv-, Fab- и Fab'-фрагменты являются одновалентными, т.е. они содержат один антигенсвязывающий сайт. Эти основные антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению могут быть объединены друг с другом с получением поливалентных антигенсвязывающих фрагментов, таких как диатела, триатела или тетратела. Эти поливалентные антигенсвязывающие фрагменты также являются частью настоящего изобретения.

[34] В настоящей заявке термин «модифицированное антитело» («антитело, которое является модифицированным») включает «биспецифические» антитела и относится к антителам, которые распознают два разных антигена благодаря содержанию по меньшей мере одной области (например, полученной из переменной области первого антитела), специфичной в отношении первого антигена, и по меньшей мере второй области (например,

полученной из вариабельной области второго антитела), специфичной в отношении второго антигена. Биспецифическое антитело специфично связывается с двумя антигенами-мишенями и, таким образом, представляет собой один из типов полиспецифического антитела. Полиспецифические антитела, распознающие два или более разных антигенов, могут быть получены методами рекомбинантных ДНК или включают, но не ограничиваются ими, антитела, полученные химически любым подходящим способом. Биспецифические антитела включают все антитела или конъюгаты антител, или полимерные формы антител, которые способны распознавать два разных антигена. Биспецифические антитела включают антитела, которые были восстановлены и преобразованы таким образом, чтобы сохранить двухвалентные характеристики, и антитела, которые были химически связаны таким образом, чтобы они могли содержать несколько сайтов распознавания антигена для каждого антигена, такие как ViME (биспецифические антитела, усиливающие макрофаги), ViTE (привлекающий Т-клетки биспецифический активатор), DART (перенаправленное антитело с двойной аффинностью (Dual affinity retargeting)); DNL («замок на причале» (dock-and-lock)), DVD-Ig (иммуноглобулины с двойным вариабельным доменом), HAS (сывроточный альбумин человека), kih (выступы-во-впадины).

[35] Антигенсвязывающие миметики антител представляют собой органические соединения, которые специфично связывают антигены, но структура которых не является родственной антителам. Они, как правило, представляют собой искусственные пептиды или небольшие белки с молярной массой от приблизительно 3 до 20 кДа. Нуклеиновые кислоты и малые молекулы иногда также считают миметиками антител, но не искусственные антитела, фрагменты антител и слитые белки, состоящие из них. Общими преимуществами перед антителами являются большая растворимость, проникновение в ткани, устойчивость к нагреванию и ферментам, и относительно низкие затраты на производство. Миметики антител разрабатывают в качестве терапевтических и диагностических агентов. Антигенсвязывающие миметики антител могут быть также выбраны из группы, включающей аффитела, аффилины, аффимеры, аффитины, сконструированные белки с анкириновым повтором (дарпины) и монотела.

[36] Антигенсвязывающий миметик антитела более предпочтительно выбран из групп, включающих аффитины и антикалины. Аффитины представляют собой искусственные белки, способные селективно связывать антигены. По структуре они происходят из ДНК-связывающего белка Sac7d, обнаруживаемого в *Sulfolobus acidocaldarius*, микроорганизме, принадлежащем к домену археи. Путем расположения аминокислот в случайном порядке на связывающей поверхности Sac7d, например, путем получения вариантов,

соответствующих случайным заменам 11 остатков связывающей поверхности Sac7d, может быть получена библиотека аффитинов и путем подвергания полученной библиотеки белков циклам рибосомного дисплея можно направлять аффинность к различным мишеням, таким как пептиды, белки, вирусы и бактерии. Аффитины представляют собой миметики антител и их разрабатывают в качестве инструментов в биотехнологии. Их также применяли в качестве специфичных ингибиторов для различных ферментов (Kreihenbrink et al., *J. mol. Biol.*, 383:5, 2008). Специалист может легко разработать аффитины, обладающие необходимыми свойствами связывания, с применением способов, известных в этой области техники, в частности описанных в заявке на патент WO2008068637 и в вышеуказанной публикации, в частности, получения библиотек фагового дисплея и/или рибосомного дисплея и их скрининга с использованием антигена, описанного в настоящем документе. Антикалины представляют собой искусственные белки, способные связываться с антигенами, либо с белками, либо с малыми молекулами. Они представляют собой миметики антител, полученные из липокалинов человека, которые представляют собой семейство природных связывающих белков. Антикалины приблизительно в восемь раз меньше; их длина составляет приблизительно 180 аминокислот, и масса составляет приблизительно 20 кДа (Skerra, *Febs J.*, 275:11, 2008). Были получены библиотеки антикалинов с помощью технологии фагового дисплея, позволяющие проводить скрининг и отбор, в частности, антикалинов, обладающих свойствами специфического связывания. Специалист может легко разработать антикалины, обладающие необходимыми свойствами связывания, с применением способов, известных в этой области техники, в частности описанных в европейском патенте EP1270725 B1, патенте США US8536307 B2, Schlehuber and Skerra, *Biophys. Chem.*, 96:2-3, 2002, и в вышеуказанной публикации, в частности, получения библиотек фагового дисплея и/или рибосомного дисплея и их скрининга с использованием антигена, описанного в настоящем документе. Как антикалины, так и аффитины могут быть получены в ряде систем экспрессии, включающих бактериальные системы экспрессии. Таким образом, настоящее изобретение включает применение аффитинов, антикалинов и других подобных миметиков антител, обладающих характеристиками антител, описанных в настоящем документе, в частности, в отношении способности связываться с SIRPa v1, ингибирования связывания CD47 человека с SIRPa v1 человека и свойства не связываться с SIRPa v2 человека и/или отсутствия способности предотвращать или ингибировать связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека, все из которых предусмотрены в качестве миметиков согласно настоящему изобретению.

[37] Соответственно, биспецифические антитела согласно настоящему изобретению направлены против SIRPa v1 и второго антигена, который не присутствует ни на SIRPa v2

человека, ни на SIRP<sub>g</sub> человека. В любом варианте реализации настоящего изобретения модифицированное антитело к SIRP<sub>a</sub> v1 человека может быть биспецифическим и может быть определено как модифицированное антитело или его модифицированный антигенсвязывающий фрагмент, или модифицированный антигенсвязывающий миметик антитела, или биспецифическая химерная молекула.

[38] В настоящей заявке термин «модифицированное антитело (антитело, которое является модифицированным)» может также соответствовать молекуле, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом указанное моноклональное антитело или его функциональный фрагмент связан с функционально отличающейся молекулой. Модифицированное антитело согласно настоящему изобретению может представлять собой либо слитый химерный белок, либо конъюгат, полученный в результате любой подходящей формы присоединения, включая ковалентное присоединение, «привитие», образование химической связи с химической или биологической группой или с молекулой, такой как полимер ПЭГ или другая защитная группа или молекула, подходящая для защиты от расщепления протеазами *in vivo*, для повышения стабильности и/или периода полувыведения антитела или функционального фрагмента. С помощью подобных методик, в особенности путем химического сшивания или «привития», может быть получено модифицированное антитело с биологически активной молекулой, при этом указанная активная молекула выбрана, например, из токсинов, в частности экзотоксина A *Pseudomonas*, A-цепи растительного токсина рицина или токсина сапорина, в особенности терапевтически активного ингредиента, вектора (включая, в частности, белковый вектор), подходящего для нацеливание антитела или функционального фрагмента на конкретные клетки или ткани организма человека, или оно может быть связано с меткой или с линкером, в особенности при использовании фрагментов антитела. ПЭГилирование антитела или его функциональных фрагментов является особенно интересным вариантом реализации, поскольку оно улучшает условия доставки активного вещества хозяину, особенно в случае терапевтического применения. ПЭГилирование может быть сайт-специфическим для предотвращения нарушения сайтов распознавания в антителах или функциональных фрагментах и его можно осуществлять с использованием высокомолекулярного ПЭГ. ПЭГилирование можно осуществлять посредством свободных остатков цистеина, присутствующих в последовательности антитела или функционального фрагмента, или посредством присоединенных свободных остатков цистеина в аминокислотной последовательности антитела или функционального фрагмента. Согласно настоящему изобретению при употреблении термина «антитело» он означает либо антитело, его

антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела, либо модифицированное антитело.

[39] В одном из вариантов реализации антитело анти-SIRPa v1 или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела является модифицированным.

[40] В конкретном варианте реализации настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело для применения в предотвращении и/или лечении заболевания у субъекта, который является SIRPa v1-положительным, содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 18; SEQ ID No: 19; SEQ ID No: 20; SEQ ID No: 21; SEQ ID No: 22 и SEQ ID No: 23; в частности, указанный переменный домен тяжелой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20.

[41] В конкретном варианте реализации настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело для применения в предотвращении и/или лечении заболевания, описанного в настоящем документе, у субъекта-человека, который является SIRPa v1-положительным, содержит или состоит из:

- переменного домена тяжелой цепи, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 20;
- переменного домена легкой цепи, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 17.

[42] Соответственно, настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который специфично связывается с SIRPa v1 человека и который ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека, и который не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека, для применения в лечении или предотвращении заболевания у SIRPa v1-положительного субъекта. Указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело специфично связывается с SIRPa v1 и противодействует взаимодействию между SIRPa v1 и CD47.

[43] Термин «специфично связывается» или любой эквивалентный термин относится к способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента взаимодействовать с SIRPa v1 человека и связываться с SIRPa v1 человека, в то время как они не связываются или они связываются со значительно меньшей аффинностью связывания с другими молекулами, в



частности с SIRPa v2, в частности с SIRPg человека, в частности с SIRPa v2 и SIRPg человека. Связывание и специфичность можно оценить путем поверхностного плазмонного резонанса (SPR, например, Biacore), ELISA или анализа методом вестерн-блоттинга. В конкретном варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или химерная молекула, содержащая указанное антитело, или антигенсвязывающий миметик антитела направленно воздействует и связывается с SIRPa v1 в виде выделенного белка с аффинностью (KD), составляющей по меньшей мере  $10E-9$  М, в частности по меньшей мере  $10E-10$  М. Антитело для применения согласно настоящему изобретению может демонстрировать значение KD в отношении SIRPa v1, составляющее от  $10E-8$  М до  $10E-11$  М, предпочтительно составляющее от  $10E-9$  М до  $10E-10$  М, в частности, по данным анализа Blitz.

[44] Антитело для применения в предотвращении и/или лечении заболевания не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека. Другими словами, это антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело не оказывает значительного влияния на связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека в отличие от связывания CD47 человека с SIRPa v1 человека. В частности, антитело или антигенсвязывающий фрагмент не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека более чем на 70%, предпочтительно 60%, предпочтительно 50% и наиболее предпочтительно 25% по сравнению с молекулой отрицательного контроля в анализе связывания. Связывание между CD47 и SIRP v2 (или SIRPg) можно оценить в соответствии с методами, описанными в примерах настоящего изобретения, в частности методом Blitz, описанным в Примере 6, а также путем анализа Biacore, ELISA-анализа или проточной цитометрии с использованием клеток, экспрессирующих SIRPa v2 и/или SIRPg. Считают, что связывание предотвращено или ингибировано, когда значение KD, соответствующее аффинности CD47 к SIRPa v2 (или SIRPg), превышает  $1E-7$  М.

[45] Предотвращение или ингибирование связывания может быть определено различными способами, известными специалисту в этой области техники; эти способы включают, но не ограничиваются ими, анализ Biacore, анализ Blitz и график Скэтчарда.

[46] Уменьшение или ингибирование связывания CD47 человека с SIRPa v1 человека означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело уменьшает взаимодействие между SIRPa v1 и CD47, т.е. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент частично или полностью ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека или, другими словами, специфично связывается с SIRPa v1 человека и противодействует взаимодействию

между SIRPa v1 человека и CD47 человека. В частности, антитело к SIRPa v1 человека или его антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью уменьшать или ингибировать связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека по меньшей мере на 50%, предпочтительно на 60%, более предпочтительно на 70%, более предпочтительно на 80% и наиболее предпочтительно на 90% и в конкретном варианте реализации на 100% по сравнению с молекулой отрицательного контроля в анализе связывания. В частности, антитело анти-SIRPa v1 или его антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью уменьшать или ингибировать связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека на 50%-100%, более предпочтительно на 60%-90% по сравнению с молекулой отрицательного контроля в анализе связывания.

[47] Согласно настоящему изобретению можно считать, что антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело) не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека, если указанное антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела) не индуцирует увеличение больше 5 log, предпочтительно не больше 4 log, более предпочтительно не больше 3 log, более предпочтительно не больше 2 log и наиболее предпочтительно не больше 1 log значения KD CD47 человека в конкурентном анализе связывания SIRPa v2, в частности, по данным анализа Blitz. В качестве альтернативы, можно считать, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека, если указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела не уменьшает связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека более чем на 25% по сравнению с молекулой отрицательного контроля в анализе связывания.

[48] В конкретном варианте реализации настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения согласно настоящему изобретению может демонстрировать временное связывание с SIRPa v2, но не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий миметик антитела для применения согласно настоящему изобретению значительно ингибирует, уменьшает, противодействует или конкурирует со связыванием CD47 человека с SIRPa v1 человека, в то время как это же антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий миметик антитела не уменьшает, не противодействует, не ингибирует или не конкурирует со связыванием CD47 человека с SIRPa v2 человека. Антагонистическое действие может

быть определено с применением способов, проиллюстрированных в примерах настоящей заявки.

[49] SIRPa v1-положительный субъект представляет собой индивидуума, который имеет по меньшей мере один аллель SIRPa v1, т.е. индивидуума, который является либо гетерозиготным по SIRPa v1 (имеет аллели SIRPa v1 и SIRPa v2), либо гомозиготным по SIRPa v1 (имеет два аллеля SIRPa v1). Согласно настоящему изобретению SIRPa v1 человека может быть определен как SIRPa, содержащий аминокислотный остаток L в положении 44 в SEQ ID No: 3 или в положении 14 в SEQ ID No: 24; или содержащий аминокислотный остаток T в положении 50 в SEQ ID No: 3 или в положении 20 в SEQ ID No: 24; или содержащий аминокислотный остаток T в положении 52 в SEQ ID No: 3 или в положении 22 в SEQ ID No: 24; или содержащий аминокислотный остаток R в положении 54 в SEQ ID No: 3 или в положении 24 в SEQ ID No: 24; или содержащий аминокислотный остаток A в положении 57 в SEQ ID No: 3 или в положении 27 в SEQ ID No: 24; или содержащий аминокислотный остаток G в положении 75 в SEQ ID No: 3 или в положении 45 в SEQ ID No: 24; или содержащий аминокислотный остаток D в положении 95 в SEQ ID No: 3 или в положении 65 в SEQ ID No: 24; или содержащий аминокислотный остаток L в положении 96 в SEQ ID No: 3 или в положении 36 в SEQ ID No: 24; или содержащий аминокислотный остаток N в положении 100 в SEQ ID No: 3 или в положении 70 в SEQ ID No: 24; или содержащий аминокислотный остаток R в положении 107 в SEQ ID No: 3 или в положении 77 в SEQ ID No: 24; или содержащий аминокислотный остаток G в положении 109 в SEQ ID No: 3 или в положении 79 в SEQ ID No: 24; или содержащий аминокислотный остаток D в положении 130 в SEQ ID No: 3 или в положении 100 в SEQ ID No: 24; или содержащий аминокислотный остаток V в положении 132 в SEQ ID No: 3 или в положении 102 в SEQ ID No: 24. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения SIRPa v1 человека содержит аминокислотный остаток V в положении 132 в SEQ ID No: 3 и аминокислотный остаток D в положении 130 в SEQ ID No: 3 или содержит аминокислотные остатки D и V в положениях 100 и 102 в SEQ ID No: 24 соответственно. В качестве альтернативы, SIRPa v1 может быть определен как изоформа SIRPa, содержащая в своей аминокислотной последовательности последовательность SEQ ID No: 1, тогда как изоформа SIRPa v2 может быть определена как изоформа SIRPa, содержащая в своей аминокислотной последовательности последовательность SEQ ID No: 2. В качестве альтернативы, SIRPa v1-положительный субъект может быть определен как субъект, геном которого содержит в аллеле SIRPa ген, кодирующий ПНК SIRPa, транслируемую в белок SIRPa с аминокислотными остатками D и V в положениях 130 и 132 в SEQ ID No: 3 соответственно или в положениях 100 и 102 в SEQ ID No: 24 соответственно.

[50] Настоящее изобретение основано на неожиданном наблюдении авторами настоящего изобретения, что некоторые антитела к SIRPa человека не связываются одинаково с различными изоформами SIRPa, и некоторые антитела могут подходить для лечения, предотвращения, таким образом, в частности включая подавление, замедление прогрессирования или уменьшение симптомов, связанных с заболеванием или нарушением у SIRPa v1-положительного субъекта, в частности с заболеванием, в которое вовлечен CD47 и/или SIRPa, в частности с заболеванием, при котором происходит сверхэкспрессия CD47 у SIRPa v1-положительного субъекта.

[51] В конкретном варианте реализации настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют для лечения и/или предотвращения заболевания, выбранного из группы, состоящей из инфекционного заболевания, хронического воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, неврологического заболевания, повреждения головного мозга, повреждения нерва, полицитемии, гемохроматоза, травмы, септического шока, хронического инфекционного заболевания, в частности инфекционного заболевания, вызванного *Pseudomonas* и цитомегаловирусом, фиброза, атеросклероза, ожирения, диабета II типа, меланомы и дисфункции трансплантата. В конкретном варианте реализации антитело применяют для предотвращения и/или лечения рака, в частности воспалительного рака и раковых опухолей с инфильтрацией миелоидными клетками, в частности с инфильтрацией дендритными клетками и/или супрессорными клетками миелоидного происхождения (СКМП), и/или опухолеассоциированными макрофагами (ОАМ). В конкретном варианте реализации настоящего изобретения антитело применяют для лечения и/или предотвращения меланомы, травмы или септического шока. В конкретном варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют для терапевтической вакцинации против заболевания, в частности против рака, в частности воспалительного рака и раковых опухолей с инфильтрацией миелоидными клетками, в частности рака с инфильтрацией дендритными клетками и/или СКМП, и/или ОАМ-клетками. В конкретном варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют для лечения и/или предотвращения заболевания, при котором происходит сверхэкспрессия CD47. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют для лечения и/или предотвращения меланомы. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению усиливает перекрестную презентацию антигенов антигенпрезентирующими клетками (АПК), в частности перекрестную презентацию антигенов Т-клеткам АПК-клетками, в частности перекрестную презентацию антигенов CD8+ Т-клеткам дендритными клетками. Благодаря

увеличению перекрестной презентации антигенов применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента подходит для терапевтической вакцинации против перечисленных заболеваний, в частности против раковых заболеваний, у субъекта, который является SIRPa v1-положительным, в частности когда заболевание связано со сверхэкспрессией CD47, в частности когда заболевание связано со сверхэкспрессией CD47 раковыми клетками или клетками опухоли. Сверхэкспрессию CD47 можно оценить путем сравнения экспрессии CD47 в раковой клетке и в здоровой клетке, полученной из такой же ткани. Экспрессию CD47 можно оценить способами, известными в этой области техники, такими как количественное определение мРНК, например, путем количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР), или количественное определение белка путем проточной цитометрии, вестерн-блоттинга, ELISA и т.п.

[52] В конкретном варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют для предотвращения и/или лечения рака, при котором экспрессируется, в частности сверхэкспрессируется, по меньшей мере один из антигенов, выбранных из группы, состоящей из вируса папилломы человека, вируса Эпштейна-Барр, полиомавируса клеток Меркеля, вируса иммунодефицита человека, вируса Т-клеточного лейкоза человека, вируса герпеса человека-8, вируса гепатита В, вируса гепатита С, цитомегаловируса, или из группы антигенов с единичной точечной мутацией, происходящих из группы, состоящей из антигенов гена CTNNB1, гена CASP8, гена HER2, гена p53, гена KRAS, гена NRAS, или опухолевых антигенов, в частности опухолевых антигенов, полученных или происходящих из группы, состоящей из онкогена *ras*, опухолевых антигенов BCR-ABL, опухолевых антигенов ETV6-AML1, генов, кодирующих антиген меланомы (MAGE), антигенов BAGE, антигенов GAGE, антигенов *ssx*, антигенов *пу-eso-1*, опухолевых антигенов циклина-A1, антигена MART-1, антигена gp100, антигена CD19, простат-специфического антигена, антигена простатической кислой фосфатазы, раково-эмбрионального антигена, антигена альфафетопротейна, антигена карциномы 125, антигена муцина 16, антигена муцина 1, антигена обратной транскриптазы теломеразы человека, антигена EGFR, антигена MOK, антигена RAGE-1, антигена PRAME, антигена p53 дикого типа, антигена онкогена ERBB2, опухолевого антигена сиалил-Tn, антигена опухоли Вильмса 1, антигена мезотелина, углеводных антигенов, антигена В-катенина, антигена MUM-1, антигена CDK4 и антигена ERBB2IP, в частности опухолеассоциированного антигена (ТАА) меланомы мелана-А. В качестве альтернативы или в дополнение, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют для терапевтической вакцинации против рака, при котором экспрессируется, в частности сверхэкспрессируется, по меньшей мере один из антигенов, выбранных из группы, состоящей из вышеуказанных антигенов.

[53] В конкретном варианте реализации настоящего изобретения антитело к SIRPa v1 человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело для применения обладает следующими свойствами:

- оно не связывается специфично с SIRPa v2 человека;
- оно не ингибирует или не предотвращает связывание CD47 человека с SIRPg человека, в частности, оно не связывается с SIRPg человека.

[54] Согласно настоящему изобретению можно считать, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело не связывается специфично с SIRPa v2 человека, если указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело демонстрирует аффинность связывания в отношении SIRPa v2 ниже  $1E-8$  M, более предпочтительно ниже  $1E-7$  M, в частности, по данным анализа Blitz. Биодоступность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, который не связывается специфично с SIRPa v2 человека, может быть увеличена, когда SIRPa v1-положительный субъект является гетерозиготным по SIRPa v1.

[55] Согласно настоящему изобретению можно считать, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело не ингибирует или не предотвращает связывание CD47 человека с SIRPg человека, если указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела не индуцирует увеличение или индуцирует увеличение меньше 5 log, более предпочтительно меньше 4 log, более предпочтительно меньше 3 log, более предпочтительно меньше 2 log и наиболее предпочтительно меньше 1 log значения KD CD47 человека для SIRPg человека в конкурентном анализе связывания SIRPg, например, по данным анализа Blitz. В конкретном варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик не связывается специфично с SIRPg человека, если указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела демонстрирует значение KD больше  $10E-8$  M, предпочтительно больше  $10E-7$  M, более предпочтительно больше  $10E-6$  M, для SIRPg, в частности, по данным анализа Blitz.

[56] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело для применения в лечении и/или предотвращении заболевания у SIRPa v1-положительного субъекта может также обладать

по меньшей мере одним из следующих свойств, в частности по меньшей мере двумя из следующих свойств, в частности по меньшей мере тремя из следующих свойств, в частности всеми следующими свойствами:

- оно связывается с SIRPa v1 человека с аффинностью (KD), составляющей по меньшей мере  $10E-8$  M, в частности по меньшей мере  $10E-9$  M, более предпочтительно по меньшей мере  $10E-10$  M; и/или
- оно не ингибирует пролиферацию и/или активацию Т-клеток человека, в частности *in vivo*; и/или
- оно усиливает активацию макрофагов; и/или
- оно усиливает перекрестную презентацию по меньшей мере одного антигена антигенпрезентирующими клетками Т-клеткам человека, в частности CD8+ Т-клеткам человека.

[57] Способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, или модифицированного антитела связываться с SIRPa v1 человека можно оценить, как уже указано, например, путем SPR (поверхностного плазменного резонанса, например, Biacore), ELISA, проточной цитометрии или анализа методом вестерн-блоттинга.

[58] Пролиферацию и/или активацию Т-клеток человека, в частности *in vivo*, можно оценить в соответствии со способами, известными в этой области техники; в частности способами, описанными в примерах настоящего изобретения, такими как включение тимидина. В конкретном варианте реализации применение антитела анти-SIRPa v1 или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, или модифицированного антитела не уменьшает или не ингибирует пролиферацию Т-клеток больше чем на 20% по сравнению с отрицательным контролем. В противоположность применению антител к CD47 человека, применение антител к SIRPa v1 человека или их антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела не оказывает значительного влияния на пролиферацию Т-клеток человека, тогда как антитела анти-CD47 ингибируют пролиферацию Т-клеток человека.

[59] Активацию макрофагов человека можно оценить в соответствии с различными способами, включая способы, описанные в примерах настоящего изобретения. В конкретном варианте реализации макрофаг активирован, когда секреция им хемокина MIP-1a/CCL-3 и/или хемокина MIP-1b/CCL4 увеличивается по сравнению с отрицательным контролем, в частности, секреция хемокина MIP-1a/CCL-3 и/или хемокина MIP-1b/CCL4 увеличивается по меньшей мере на 20% по сравнению с отрицательным контролем.

[60] Перекрестную презентацию по меньшей мере одного антигена антигенпрезентирующими клетками Т-клеткам человека, в частности CD8<sup>+</sup> Т-клеткам человека, можно оценить различными способами, включая способы, описанные в примерах настоящего изобретения. В частности, считают, что перекрестная презентация усиливается, когда секреция IL-2 Т-клетками увеличивается, в частности, по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 50%. В качестве альтернативы, перекрестная презентация усиливается, когда секреция IFN $\gamma$  Т-клетками увеличивается, в частности, по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 50%.

[61] Настоящее изобретение также относится к применению полипептида, в частности антигена, для получения и/или для выбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, или модифицированного антитела для применения, подробно описанного выше в настоящем документе. Соответственно, согласно настоящему изобретению предложен полипептид, подходящий, в частности, для получения антитела к SIRPa v1 человека и/или для выбора, и/или получения такого антитела, и/или для тестирования аффинности связывания такого антитела. Для этого также предложен полипептид, в частности антиген, содержащий или состоящий из эпитопа SIRPa v1 человека, состоящего из SEQ ID No: 1 (KGSPDDV) или SEQ ID No: 4 (KFRKGSPDDVE), или SEQ ID No: 25 (DDVEFKSGAGTELSVR), для применения в выборе антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или антигенсвязывающего миметика антитела, который ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека и который не предотвращает или не уменьшает связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека, в частности который не связывается специфично с SIRPa v2 человека.

[62] SEQ ID No: 1 соответствует последовательности эпитопа, распознаваемой антителами к SIRPa человека, обладающими значительной связывающей способностью в отношении изоформ SIRPa v1, которые ингибируют связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека и которые не ингибируют связывание CD47 человека с SIRPa v2. Таким образом, полипептид, содержащий аминокислотную последовательность эпитопа SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 4 или SEQ ID No: 25, может подходить для получения антитела, которое можно применять в лечении и/или предотвращении заболевания у SIRPa v1-положительного субъекта. Специфическое связывание между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, или антигенсвязывающим миметиком антитела, или модифицированным антителом и эпитопом (или областью, содержащей эпитоп) подразумевает, что антитело проявляет значительную аффинность к эпитопу (области, содержащей эпитоп) в конкретном белке или антигене (в настоящей заявке: SIRPa v1). Термин «значительная аффинность» или «специфическое связывание», или «специфично связывается с» включает



связывание с аффинностью приблизительно  $10E-8$  М (KD) или большей аффинностью. Предпочтительно, связывание считают специфическим, когда аффинность связывания составляет от  $10E-8$  М (KD) до  $10E-12$  М (KD), необязательно от  $10E-8$  М (KD) до  $10E-10$  М (KD), в частности, по меньшей мере  $10E-8$  М (KD). Реагирует ли или связывается ли связывающий домен специфично с мишенью можно легко тестировать, в том числе путем сравнения реакции указанного связывающего домена с белком- или антигеном-мишенью с реакцией указанного связывающего домена с белками или антигенами, отличными от белка-мишени. Термины «специфическое связывание» или «специфично связывается с» не означают, что антитело распознает и связывается с одной молекулой-мишенью, а означает, что указанное антитело демонстрирует аффинность связывания, которая выше в отношении молекулы-мишени относительно других молекул и, в частности, демонстрирует аффинность связывания в отношении молекулы-мишени выше конкретной аффинности, подробно описанной выше в настоящем документе. В отрицательной форме термины «специфическое связывание» или «специфично связывается с» означают, что антитело распознает молекулу-мишень с низкой аффинностью или не распознает молекулу-мишень, т.е. связывание между указанным антителом и молекулой-мишенью является неспецифическим. Предпочтительно, связывание считают неспецифическим, когда аффинность связывания ниже  $10E-8$  М (KD). Сравнимые молекулы, в отношении которых связывание можно считать специфическим, представляют собой, в частности, изоформы SIRP<sub>g</sub> и SIRP<sub>a</sub>.

[63] В примерах настоящего изобретения авторы настоящего изобретения демонстрируют, что два конкретных однонуклеотидных полиморфизма (SNP) (а именно SNP 15 и SNP 16; их комбинация соответствует SNP 17) ответственны за нераспознавание SIRP<sub>a</sub> v2 человека антителами или их антигенсвязывающим фрагментом, или антигенсвязывающим миметиком антитела, или модифицированным антителом, применяемым в соответствии с настоящим изобретением. Оба SNP кодируют аминокислотные остатки, расположенные в эпитопе SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 4 и SEQ ID No: 25. Благодаря полиморфизму этой конкретной области SIRP<sub>a</sub> антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело способно связываться с SIRP<sub>a</sub> v1 и нарушать связывание CD47 человека с SIRP<sub>a</sub> v1 человека, и не нарушать при этом связывание CD47 человека с SIRP<sub>a</sub> v2 человека. Более того, такое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело также неспособно предотвращать или ингибировать связывание CD47 человека с SIRP<sub>g</sub> человека. В частности, такое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или

антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело не связывается специфично с SIRP<sub>g</sub> человека.

[64] Полипептид, содержащий эпитоп SEQ ID No: 1, может также содержать по меньшей мере один другой эпитоп, эпитоп SEQ ID No: 5 (SLIPVGP) и/или эпитоп SEQ ID No: 6 (GRELIYNQKEGH), оба из которых представляют собой линейные эпитопы, распознаваемые антителом к SIRP<sub>a</sub> v1 человека, его антигенсвязывающим фрагментом и антигенсвязывающим миметиком антитела или модифицированным антителом. В качестве альтернативы, полипептид может также содержать по меньшей мере один эпитоп, выбранный из группы, включающей SEQ ID No: 7 (ELIYNQKEGHFPR) и SEQ ID No: 8 (RNNMDFSIRIGN), оба из которых представляют собой конформационные эпитопы, распознаваемые антителом к SIRP<sub>a</sub> v1 человека, его антигенсвязывающим фрагментом, антигенсвязывающим миметиком антитела и модифицированным антителом.

[65] Полипептид или антиген, содержащий эпитоп SEQ ID No: 1 или SEQ ID No: 4, или SEQ ID No: 25, можно применять для получения (или продуцирования) антител или их антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, или модифицированного антитела, например, путем иммунизации не относящегося к человеку животного, в частности не относящегося к человеку млекопитающего, и сбора полученной сыворотки или В-клеток указанного иммунизированного не относящегося к человеку животного для получения антител, направленных против антигена (антигенов), содержащегося в указанном полипептиде. Затем выделенные антитела можно гуманизировать или модифицировать с получением их антигенсвязывающего фрагмента или бифункциональных, или биспецифических антител. Выделенные В-клетки могут быть трансформированы в гибридому для получения антител к SIRP<sub>a</sub> v1 человека. Полученные антитела можно выделять и выбирать в соответствии со способом выбора, подробно описанным ниже в настоящем документе.

[66] Настоящее изобретение также относится к применению полинуклеотида, кодирующего антиген SIRP<sub>a</sub> v1 человека, для получения полипептида, в частности антигена, содержащего эпитоп SEQ ID No: 1 или SEQ ID No: 4, или SEQ ID No: 25. Указанный полинуклеотид может содержать по меньшей мере часть SEQ ID No: 26, при этом указанная часть содержит остатки нуклеиновой кислоты, кодирующие эпитоп SEQ ID No: 1 или SEQ ID No: 4, или SEQ ID No: 25. SEQ ID No: 26 соответствует кДНК, кодирующей белок SIRP<sub>a</sub> v1. Полинуклеотид можно использовать в системе получения, например, когда полинуклеотид встраивают в вектор экспрессии, такой как плазида, для получения полипептида, содержащего эпитоп SIRP<sub>a</sub> v1, содержащий аминокислотные остатки SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 4 или SEQ ID No: 25. В конкретном варианте реализации

полинуклеотид кодирует часть SEQ ID No: 26, содержащую по меньшей мере аминокислотные остатки SEQ ID No: 1 или SEQ ID No: 4, или SEQ ID No: 25 и аминокислотные остатки SEQ ID No: 5 и/или SEQ ID No: 6; или аминокислотные остатки SEQ ID No: 7 и/или SEQ ID No: 8.

[67] Настоящее изобретение также относится к способу выбора и выделения антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, антигенсвязывающего миметика антитела или модифицированного антитела, которое специфично связывается с SIRPa v1 человека и которое уменьшает или ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека, и которое не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека. Указанный способ выбора и выделения включает следующие этапы:

- a) тестирование способности соединения (т.е. антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, антигенсвязывающего миметика антитела или модифицированного антитела) специфично связываться с SIRPa v1 человека, в частности, способности соединения специфично связываться с эпитопом, содержащим или состоящим из SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 4 или SEQ ID No: 25; в частности, способности соединения специфично связываться с аминокислотными остатками D и V, расположенными в положениях 130 и 132 соответственно в SIRPa последовательности SEQ ID No: 3; или расположенными в положениях 100 и 102 соответственно в SIRPa последовательности SEQ ID No: 24; и
- b) тестирование способности соединения уменьшать или ингибировать связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека; и
- c) тестирование способности соединения не предотвращать или не ингибировать связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека; и/или
- d) в частности, тестирование способности соединения не предотвращать или не ингибировать связывание CD47 человека с SIRPg человека;

и необязательно:

- e) тестирование способности соединения не связываться специфично с SIRPa v2 человека;
- f) тестирование способности соединения не связываться специфично с SIRPg человека.

[68] Выбранное и выделенное соединение должно обладать следующими свойствами:

- оно специфично связывается с SIRPa v1 человека, в частности с аффинностью, составляющей по меньшей мере  $1E-9$  M, в частности  $10E-9$  M, более предпочтительно с аффинностью, составляющей по меньшей мере  $1E-10$  M, в частности  $10E-10$  M;
- оно уменьшает или ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека;
- оно не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека;

- в частности, оно не связывается специфично с SIRP<sub>g</sub> человека.

[69] Выбранное и выделенное соединение может также проявлять по меньшей мере одно из следующих свойств, предпочтительно по меньшей мере два из следующих свойств:

- оно не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRP<sub>g</sub> человека; и/или

- оно не связывается специфично с SIRP<sub>a</sub> v2 человека.

[70] Специфичность связывания для соединения можно оценить в соответствии со способами, уже описанными выше в настоящем документе, например, путем SPR (поверхностного плазмонного резонанса, например, Biacore), ELISA или анализа методом вестерн-блоттинга. В частности, соединение специфично связывается с SIRP<sub>a</sub> v1, когда аффинность связывания составляет по меньшей мере  $10E-8$  M, более предпочтительно по меньшей мере  $10E-9$  M, или когда аффинность связывания составляет от  $10E-8$  M до  $10E-11$  M, более предпочтительно от  $10E-9$  M до  $10E-10$  M. Соединение не связывается специфично с SIRP<sub>a</sub> v2 или SIRP<sub>g</sub> человека, когда аффинность связывания ниже  $1E-8$  M. Предотвращение или ингибирование связывания CD47 с SIRP<sub>a</sub> v1, SIRP<sub>a</sub> v2 и SIRP<sub>g</sub> человека можно оценить способами, уже описанными в настоящем документе, в частности путем конкурентного анализа, в частности путем анализа Blitz. Можно считать, что соединение не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRP<sub>a</sub> v1, SIRP<sub>a</sub> v2 или SIRP<sub>g</sub> человека, если указанное соединение не индуцирует увеличение больше 5 log, предпочтительно не больше 4 log, более предпочтительно не больше 3 log, более предпочтительно не больше 2 log и наиболее предпочтительно не больше 1 log значения KD CD47 человека в конкурентном анализе связывания SIRP<sub>a</sub> v1, SIRP<sub>a</sub> v2 или SIRP<sub>g</sub>, в частности, по данным анализа Blitz. Напротив, можно считать, что соединение предотвращает или ингибирует связывание CD47 человека с SIRP<sub>a</sub> v1, SIRP<sub>a</sub> v2 или SIRP<sub>g</sub> человека, если указанное соединение индуцирует увеличение больше 1 log, предпочтительно больше 2 log, более предпочтительно больше 3 log, более предпочтительно больше 4 log и наиболее предпочтительно больше 5 log значения KD CD47 человека в конкурентном анализе связывания SIRP<sub>a</sub> v1, SIRP<sub>a</sub> v2 или SIRP<sub>g</sub>, в частности, по данным анализа Blitz.

[71] В соответствии с конкретным аспектом способ выбора соединения может включать по меньшей мере один из следующих этапов, в частности по меньшей мере два из следующих этапов, в частности по меньшей мере три из следующих этапов и в частности четыре следующих этапа:

- i) тестирование пролиферации Т-клеток в присутствии указанного соединения; и/или
- ii) тестирование активации Т-клеток в присутствии соединения; и/или

- iii) тестирование активации макрофагов в присутствии соединения; и/или
- iv) тестирование перекрестной презентации антигена, в частности опухолевого антигена, в частности опухолеассоциированного антигена (ТАА) меланомы мелана-А, антигенпрезентирующими клетками, в частности дендритными клетками, Т-клеткам человека в присутствии соединения, в частности перекрестной презентации антигена дендритными клетками CD8<sup>+</sup> Т-клеткам.

[72] В соответствии с этим конкретным вариантом реализации выбранное соединение может проявлять по меньшей мере одно, предпочтительно по меньшей мере два, более предпочтительно по меньшей мере три, наиболее предпочтительно четыре следующих свойства:

- оно не ингибирует пролиферацию Т-клеток человека; и/или
- оно не ингибирует активацию Т-клеток человека; и/или
- оно усиливает активацию макрофагов; и/или
- оно усиливает перекрестную презентацию антигена антигенпрезентирующими клетками Т-клеткам человека.

[73] Пролиферацию Т-клеток и активацию Т-клеток можно определять различными способами. Например, пролиферация Т-клеток может быть измерена путем включения НЗ-тимидина. В частности, считают, что соединение не ингибирует пролиферацию Т-клеток, когда пролиферация Т-клеток снижена не более чем на 20% по сравнению с отрицательным контролем. Активацию Т-клеток можно оценить путем анализа экспрессии CD25 и/или CD69, например, путем проточной цитометрии, вестерн-блоттинга, ELISA и т.п., и/или путем оценки секреции IFN $\gamma$  и/или IL2, как описано в примерах настоящего изобретения. Перекрестную презентацию можно оценить в соответствии с различными способами, в частности способом, описанным в примерах настоящего изобретения. В частности, считают, что перекрестная презентация усиливается, когда секреция IL-2 Т-клетками увеличивается по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 50% по сравнению с отрицательным контролем. В качестве альтернативы, перекрестная презентация усиливается, когда секреция IFN $\gamma$  Т-клетками увеличивается по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 50% по сравнению с отрицательным контролем. Активацию макрофагов можно оценить различными способами, в частности способом, описанным в примерах настоящего изобретения. В частности, активацию макрофагов можно оценить по величине секреции хемокина (хемокинов). В частности, макрофаг активирован, когда секреция хемокина MIP-1 $\alpha$ /CCL-3 и/или хемокина MIP-1 $\beta$ /CCL4 увеличивается по сравнению с отрицательным контролем, в частности когда

увеличение секреции хемокина (хемокинов) составляет больше 20% по сравнению с отрицательным контролем.

[74] Согласно настоящему изобретению также предложены способы оценки вероятности эффективности лечения *in vitro* или *ex vivo*, при котором соединение, направленное против SIRPa человека (т.е. антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело), вводят субъекту, представляющему собой человека, в частности, когда указанное соединение представляет собой соединение, направленное против SIRPa v1 человека. Указанный способ включает определение присутствия SIRPa v1 в биологическом образце, предварительно полученном от субъекта, таком как кровь, клетки, биопсийный образец и т.п. Присутствие SIRPa v1 может быть определено путем применения соединений анти-SIRPa v1, определенных в настоящем документе или полученных в соответствии со способами, определенными в настоящем документе, или выбранных в соответствии со способами, описанными в настоящем документе. Детектирование SIRPa v1 в образце указывает на то, что лечение соединением, направленным против SIRPa v1 человека, вероятно, будет эффективным. Другими словами, согласно настоящему изобретению предложен способ *in vitro* или *ex vivo* для идентификации пациента, которого будут, вероятно, эффективно лечить соединением анти-SIRPa, при этом указанный способ включает определение статуса пациента в группе, состоящей из SIRPa v1/v1-пациентов, v1/v2-пациентов и v2/v2-пациентов, при этом пациента, отнесенного к группе v1/v1 или группе v1/v2, будут, вероятно, эффективно лечить соединением анти-SIRPa, применяемым согласно настоящему изобретению и, в частности, терапевтическая доза соединения анти-SIRPa, вводимая SIRPa v1/v1-пациенту, может отличаться (т.е. иметь меньшее значение) от терапевтической дозы, вводимой SIRPa v1/v2-пациенту. В качестве альтернативы, указанный способ может включать детектирование генного продукта (РНК или ДНК), кодирующего белок SIRPa v1. В частности, способ включает этап определения аллелей SIRPa у субъекта (либо аллеля v1, либо аллеля v2). Субъекта, представляющего собой человека, считают SIRPa v1-положительным, если по меньшей мере один аллель SIRPa содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотные остатки SEQ ID No: 1 или SEQ ID No: 4, или SEQ ID No: 25. В качестве альтернативы, субъекта считают SIRPa v1-положительным, если по меньшей мере один из аллелей SIRPa содержит в экзоне 3 мутации, состоящие из SNP 15 (rs115287948) и 16 (rs114499682) SIRPa v1 или SNP 17 SIRPa v1, кодирующие аминокислотный остаток V в положении 132 в SEQ ID No: 3 или в положении 102 в SEQ ID No: 24, или кодирующие аминокислотный остаток V в SEQ ID No: 1 или 4, или первый аминокислотный остаток V в SEQ ID No: 25; и если по меньшей мере

один из аллелей SIRPa содержит в экзоне 3 последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотные остатки 5' DDV 3' в SIRPa. SNP SIRPa хорошо описаны в документах и доступны в базе данных онлайн, такой как Genbank. Справочные идентификационные номера или «rs» SNP доступны в базе данных NCBI. SNP 15 и 16 SIRPa v1 соответствуют остаткам g и t нуклеиновой кислоты соответственно, как подробно описано в примерах настоящего изобретения. Соответственно, способ может включать определение аллеля SIRPa, например, путем полимеразной цепной реакции, при этом определение SIRPa v1-положительного субъекта включает детектирование последовательности SIRPa, содержащей остатки нуклеиновой кислоты, соответствующие по меньшей мере части экзона 3 SIRPa человека, и при этом SNP 15 и 16 SIRPa определяют, как подробно описано выше в настоящем документе, по меньшей мере в одном из аллелей SIRPa, в частности в обоих аллелях SIRPa.

[75] Соответственно, настоящее изобретение также относится к набору компонентов для определения SIRPa-статуса субъекта, при этом указанный набор содержит пару праймеров, подходящих для амплификации, в частности путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) или, в частности, путем полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), по меньшей мере часть гена SIRPa (такую как геномная ДНК (гДНК), например) или транскрипт SIRPa (такой как мРНК или кДНК, например), в частности, указанная часть содержит по меньшей мере часть экзона 3 SIRPa, при этом указанная часть содержит по меньшей мере локализацию SNP 15 и SNP 16 SIRPa, определенную выше в настоящей заявке или в примерах настоящего изобретения, или локализацию SNP 17 SIRPa, определенную выше в настоящей заявке или в примерах настоящего изобретения; и локализацию кодона, кодирующего первый аминокислотный остаток D в эпитопе SIRPa v1 последовательности SEQ ID No: 1 или SEQ ID No: 4, или SEQ ID No: 25. Локализацию отсутствующего кодона в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SIRPa v2, можно оценить путем выравнивания SEQ ID NO: 27 (SIRPa v1, экзон 3) и SEQ ID NO: 31 (SIRPa v2, экзон 3). Соответственно, пара праймеров может включать первый праймер, способный к отжигу с обеими последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими SIRPa v1 и SIRPa v2, и второй праймер, способный к отжигу только с последовательностью нуклеиновой кислоты для SIRPa v1. Последовательность нуклеиновой кислоты для таких праймеров может быть определена специалистом в этой области техники путем выравнивания SEQ ID NO: 27 (SIRPa v1, экзон 3) и SEQ ID NO: 31 (SIRPa v2, экзон 3). В конкретном варианте реализации праймер, способный к отжигу с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей SIRPa v1, но не с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей SIRPa v2, может быть определен в соответствии с локализацией SNP

SIRPa v1 и может включать множество SNP SIRPa v1. В конкретном варианте реализации SIRPa v1-специфичный праймер способен к отжигу, в частности, в жестких условиях, в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислотные остатки 5' DDV 3' в эпитопе SIRPa v1 последовательности SEQ ID No: 1 или SEQ ID No: 4, или SEQ ID No: 25. В качестве альтернативы, указанный набор содержит пару праймеров, оба из которых способны к отжигу с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими либо SIRPa v1, либо SIRPa v2, с обеспечением таким образом амплификации части гена или транскрипта, содержащей по меньшей мере часть экзона 3 SIRPa, при этом указанная часть содержит по меньшей мере локализацию SNP 15 и SNP 16 SIRPa, определенную выше в настоящей заявке или в примерах настоящего изобретения, или локализацию SNP 17 SIRPa, определенную выше в настоящей заявке или в примерах настоящего изобретения; и локализацию кодона, кодирующего первый аминокислотный остаток D в эпитопе SIRPa v1 последовательности SEQ ID No: 1 или SEQ ID No: 4, или SEQ ID No: 25; и указанный набор дополнительно содержит зонд (т.е. зонд на основе нуклеиновой кислоты), в частности меченый зонд, способный к отжигу с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислотные остатки 5' DDV 3' в эпитопе SIRPa v1 последовательности SEQ ID No: 1 или SEQ ID No: 4, или SEQ ID No: 25.

[76] Также предложен способ диагностики тяжести заболевания *in vitro* или *ex vivo*, в частности способ диагностики, подходящий для применения в персонализированной медицине, в котором соединение, направленное против SIRPa v1 человека (т.е. антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик или модифицированное антитело), полученное в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, или выбранное в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, применяют для детектирования SIRPa v1-положительных клеток в образце, предварительно полученном от субъекта, при этом указанный способ включает количественное определение экспрессии SIRPa v1. Количественное определение экспрессии SIRPa v1 можно осуществлять в соответствии со способом, известным в этой области техники, например, путем количественного определения антител, связанных на белках-мишенях.

[77] Также предложен способ помощи клиническому врачу в принятии решения о лечении пациента антителом к SIRPa человека или антигенсвязывающим фрагментом, или антигенсвязывающим миметиком антитела, или модифицированным антителом, при этом указанный способ включает определение аллелей SIRPa у пациента, в частности, путем применения соединений анти-SIRPa, описанных в настоящем документе, или путем



генотипирования, и при этом лечение первой терапевтической дозой соединений анти-SIRPa v1 согласно настоящему изобретению, вероятно, будет эффективным у пациента, который является SIRPa v1-гомозиготным; и при этом лечение соединением анти-SIRPa v1 согласно настоящему изобретению маловероятно будет эффективным для пациента, который является SIRPa v2-гомозиготным; и при этом лечение второй терапевтической дозой соединений анти-SIRPa v1 согласно настоящему изобретению, вероятно, будет эффективным у пациента, который является SIRPa v1/v2-гетерозиготным, в частности, когда вторая терапевтическая доза выше первой терапевтической дозы.

[78] Также предложен способ помощи клиническому врачу в принятии решения о лечении пациента антителом к SIRPa человека или антигенсвязывающим фрагментом, или антигенсвязывающим миметиком антитела, или модифицированным антителом, при этом терапевтическая доза, необходимая для лечения пациента соединением, направленным против SIRPa человека, отличается, если пациент является SIRPa v1/v1-гомозиготным или SIRPa v1/v2-гетерозиготным.

[79] Также предложена комбинация соединений, содержащая антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело, в частности антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело для любого применения, описанного в настоящем документе, или антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело, полученное в соответствии с любым способом, описанным в настоящем документе, или антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело, выбранное в соответствии с любым способом, описанным в настоящем документе, по меньшей мере с одним вторым терапевтическим агентом. Указанный второй терапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из химиотерапевтических агентов, радиотерапевтических агентов, иммунотерапевтических агентов, агентов клеточной терапии, антибиотиков и пробиотиков, в частности иммунотерапевтических агентов, выбранных из группы, состоящей из блокатора контрольных точек или активатора клеток приобретенного иммунитета, в частности выбранного из группы, состоящей из анти-PDL1, анти-PD1, анти-CTLA4, анти-CD137, анти-CD2, анти-CD28, анти-CD40, анти-HVEM, анти-BTLA, анти-CD160, анти-TIGIT, анти-TIM-1/3, анти-LAG-3, анти-2B4, анти-VISTA, анти-OX40, анти-CD40 агониста, CD40-L, агонистов TLR, анти-ICOS, ICOS-L, агониста STING, ингибитораIDO, агонистов онколитических вирусов и агонистов В-клеточных рецепторов. Комбинация продукта предназначена для применения в лечении или предотвращении заболевания у SIRPa v1-

положительного субъекта. Композиция может представлять собой, в частности, фармацевтическую композицию. Такая композиция может содержать фармацевтически приемлемые компоненты, такие как, но не ограничиваясь ими, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель, или наполнитель, при применении для системного или местного введения. Термин «фармацевтически подходящий носитель или наполнитель» относится к нетоксичному твердому, полутвердому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему веществу и составу, такому как фосфатные буферные растворы, дистиллированная вода, эмульсии, такие как эмульсии масло-в-воде, смачивающие агенты и т.п., декстроза, физиологический раствор, этанол и их комбинации.

[80] Настоящее изобретение также относится к комбинации соединений, содержащей:

(i) антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело, которое:

- специфично связывается с SIRPa v1 и/или SIRPa v2 человека, в частности с SIRPa v1 человека и SIRPa v2 человека, и которое ингибирует связывание CD47 человека с SIRPA v1 и/или SIRPA v2, в частности, которое ингибирует связывание CD47 человека с SIRPA v1 и SIRPA v2;
- не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRP<sub>g</sub> человека; и, в частности, не связывается специфично с SIRP<sub>g</sub> человека;
- усиливает перекрестную презентацию антигена, в частности ракового антигена, антигенпрезентирующими клетками, в частности дендритными клетками, Т-клеткам человека, в частности CD8<sup>+</sup> Т-клеткам человека;

(ii) по меньшей мере один второй терапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из химиотерапевтических агентов, радиотерапевтических агентов, иммунотерапевтических агентов, агентов клеточной терапии, антибиотиков и пробиотиков, в частности иммунотерапевтических агентов, выбранных из группы, состоящей из блокатора контрольных точек или активатора клеток приобретенного иммунитета, в частности выбранного из группы, состоящей из анти-PDL1, анти-PD1, анти-CTLA4, анти-CD137, анти-CD2, анти-CD28, анти-CD40, анти-HVEM, анти-BTLA, анти-CD160, анти-TIGIT, анти-TIM-1/3, анти-LAG-3, анти-2B4, анти-VISTA, анти-OX40, анти-CD40 агониста, CD40-L, агонистов TLR, анти-ICOS, ICOS-L, агониста STING, ингибитора IDO, агонистов онколитических вирусов и В-клеточных рецепторов;

для применения в лечении или предотвращении заболевания, в частности рака, или для применения в терапевтической вакцинации против заболевания, в частности против рака.

В конкретном варианте реализации антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело специфично связывается с SIRPa v1 человека и ингибирует связывание CD47 человека с SIRPA v1.

[81] Настоящее изобретение также относится к комбинации соединений, содержащей антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело, в частности антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело для любого применения, описанного в настоящем документе, или антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело, полученное в соответствии с любым способом, описанным в настоящем документе, или антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело, выбранное в соответствии с любым способом, описанным в настоящем документе, и по меньшей мере один антиген, полученный или происходящий из группы, состоящей из антигенов вируса папилломы человека, вируса Эпштейна-Барр, полиомавируса клеток Меркеля, вируса иммунодефицита человека, вируса Т-клеточного лейкоза человека, вируса герпеса человека-8, вируса гепатита В, вируса гепатита С, цитомегаловируса, или из группы антигенов с единичной точечной мутацией, происходящих из группы, состоящей из антигенов гена CTNNB1, гена CASP8, гена hER2, гена p53, гена KRAS, гена NRAS, или опухолевых антигенов, в частности опухолевых антигенов, полученных или происходящих из группы, состоящей из онкогена *ras*, опухолевых антигенов BCR-ABL, опухолевых антигенов ETV6-AML1, генов, кодирующих антиген меланомы (MAGE), антигенов BAGE, антигенов GAGE, антигенов *ssx*, антигенов *пу-eso-1*, опухолевых антигенов циклина-A1, антигена MART-1, антигена gp100, антигена CD19, простат-специфического антигена, антигена простатической кислой фосфатазы, раково-эмбрионального антигена, антигена альфафетопротеина, антигена карциномы 125, антигена муцина 16, антигена муцина 1, антигена обратной транскриптазы теломеразы человека, антигена EGFR, антигена MOK, антигена RAGE-1, антигена PRAME, антигена p53 дикого типа, антигена онкогена ERBB2, опухолевого антигена сиалил-Tn, антигена опухоли Вильмса 1, антигена мезотелина, углеводных антигенов, антигена В-катенина, антигена MUM-1, антигена CDK4 и антигена ERBB2IP, в частности опухолеассоциированного антигена (TAA) меланомы мелана-А. Такая комбинация соединений может подходить для применения в качестве лекарственного средства или в качестве композиции вакцины, или для применения в лечении или предотвращении заболевания у SIRPa v1-положительного субъекта.

[82] Согласно настоящему изобретению также предложена комбинация соединений, содержащая:

(i) антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело, которое содержит:

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

где:

HCDR1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 9,

HCDR2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 10 или SEQ ID No: 11, в частности, HCDR2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 11;

HCDR3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 12 или SEQ ID No: 13, или SEQ ID No: 14, или SEQ ID No: 15; в частности, HCDR3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 13 или SEQ ID No: 14, или SEQ ID No: 15, в частности, HCDR3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 15;

и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 16 и SEQ ID No: 17; в частности, вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 17;

и которое усиливает перекрестную презентацию антигена, в частности ракового антигена, антигенпрезентирующими клетками, в частности дендритными клетками, Т-клеткам человека, в частности CD8<sup>+</sup> Т-клеткам человека;

(ii) по меньшей мере один антиген, выбранный из группы, состоящей из антигенов вируса папилломы человека, вируса Эпштейна-Барр, полиомавируса клеток Меркеля, вируса иммунодефицита человека, вируса Т-клеточного лейкоза человека, вируса герпеса человека-8, вируса гепатита В, вируса гепатита С, HCV, корового антигена вируса гепатита В (HBC), цитомегаловируса, или из группы антигенов с единичной точечной мутацией, происходящих из группы, состоящей из антигенов гена *ctnnb1*, гена *casp8*, гена *her2*, гена *p53*, гена *kras*, гена *ng2*, или опухолевых антигенов, в частности опухолевых антигенов, полученных или происходящих из группы, состоящей из онкогена *ras*, опухолевых антигенов BCR-ABL, опухолевых антигенов ETV6-AML1, генов, кодирующих антиген меланомы (MAGE), антигенов BAGE, антигенов GAGE, антигенов *ssx*, антигенов *pu-eso-1*, опухолевых антигенов циклина-A1, антигена MART-1, антигена gp100, антигена CD19, простат-специфического антигена, антигена

простатической кислой фосфатазы, раково-эмбрионального антигена, антигена альфафетопротеина, антигена карциномы 125, антигена муцина 16, антигена муцина 1, антигена обратной транскриптазы теломеразы человека, антигена EGFR, антигена МОК, антигена RAGE-1, антигена PRAME, антигена p53 дикого типа, антигена онкогена ERBB2, опухолевого антигена сиалил-Tn, антигена опухоли Вильмса 1, антигена мезотелина, углеводных антигенов, антигена В-катенина, антигена MUM-1, антигена CDK4 и антигена ERBB2IP, в частности опухолеассоциированного антигена (ТАА) меланомы мелана-А, или любого конкретного мутированного антигена (неоантигена или неоэпитопа);

для применения в лечении или предотвращении заболевания, в частности рака, или для применения в терапевтической вакцинации против заболевания, в частности против рака, и при этом происходит усиление перекрестной презентации по меньшей мере одного указанного антигена антигенпрезентирующими клетками, в частности дендритными клетками, Т-клеткам, в частности CD8<sup>+</sup> Т-клеткам.

[83] Указанное заболевание, в частности, выбрано из группы, состоящей из инфекционного заболевания, хронического воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, неврологического заболевания, повреждения головного мозга, повреждения нерва, полицитемии, гемохроматоза, травмы, септического шока, хронического инфекционного заболевания, в частности инфекционного заболевания, вызванного *Pseudomonas* и цитомегаловирусом, фиброза, атеросклероза, ожирения, диабета II типа и дисфункции трансплантата. Заболевание может быть также выбрано из группы, состоящей из рака, в частности воспалительного рака и рака с инфильтрацией миелоидными клетками, в частности с инфильтрацией СКМП и/или ОАМ-клетками, метастаза рака, в частности метастаза рака молочной железы, меланомы. В конкретном варианте реализации заболевание представляет собой рак, содержащий раковые клетки, экспрессирующие по меньшей мере один указанный антиген.

[84] В конкретном варианте реализации настоящего изобретения комбинация содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело для применения в предотвращении и/или лечении заболевания, в частности рака, или для применения в терапевтической вакцинации против заболевания, в частности против рака, при этом указанное антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело усиливает перекрестную презентацию антигена, экспрессируемого при указанном заболевании, в частности при раке, и вовлечено в индукцию Т-клеточного ответа, подходящего для лечения указанного заболевания.

[85] В конкретном варианте реализации настоящего изобретения комбинация содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 18; SEQ ID No: 19; SEQ ID No: 20; SEQ ID No: 21; SEQ ID No: 22 и SEQ ID No: 23; в частности, указанный переменный домен тяжелой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20.

[86] В конкретном варианте реализации настоящего изобретения комбинация содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело для применения в предотвращении и/или лечении заболевания, которое содержит или состоит из:

- переменного домена тяжелой цепи, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 20;
- переменного домена легкой цепи, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 17.

[87] Было показано, что как ДНК-, так и РНК-вирусы способны вызывать рак у людей. Вирус Эпштейна-Барр, вирус папилломы человека, вирус гепатита В и вирус герпеса человека-8 (HHV-8, также известный как вирус герпеса, вызывающий саркому Капоши) представляют собой ДНК-вирусы, способные вызывать развитие раковых заболеваний у людей. Т-лимфотрофный вирус человека 1 типа и вирусы гепатита С представляют собой два РНК-вируса, которые вносят вклад в развитие раковых заболеваний у людей. Соответственно, введение комбинации соединений, содержащей соединение, направленное против SIRPa v1 человека, и антиген, полученный или происходящий из этих вирусов, может приводить к усилению перекрестной презентации этих антигенов Т-клеткам человека и таким образом может усиливать ответ на раковые клетки, демонстрирующие такие антигены.

[88] Указанная комбинация соединений также подходит для применения в лечении карциномы, в частности, когда экспрессируются вирусные антигены, как при карциноме шейки матки, карциноме носоглотки, печеночно-клеточной карциноме, саркоме Капоши и некоторых лейкозах (Liao, 2006). Комбинация соединений также подходит для применения в лечении глиобластом, при которых экспрессируются белки цитомегаловируса. Например, карцинома из клеток Меркеля (ККМ) представляет собой все более распространенный нейроэндокринный рак кожи и основную причину смерти от немеланомного рака кожи, и описано, что она связана с полиомавирусом клеток Меркеля (MCV), первым полиомавирусом, непосредственно связанным с раком у человека (Chang and Moore, 2012). Комбинация соединений также подходит для применения в лечении раковых опухолей

шейки матки, в которых экспрессируются белки вируса гепатита В, и/или опухолей шеи, раковых заболеваний кожи, в частности у пациента с ослабленным иммунитетом, и/или раковых опухолей аногенитальной области. Комбинация соединений также подходит для применения в лечении злокачественных опухолей, ассоциируемых с вирусом Эпштейна-Барр, таких как В-клеточные и Т-клеточные лимфомы, такие как лимфома Беркитта, болезнь Ходжкина, посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание, лейомиосаркома и карциномы носоглотки, и некоторые случаи рака желудка. Комбинация соединений также подходит для применения в лечении рака, связанного с ВИЧ-инфекцией, включая рак анального канала, болезнь Ходжкина, рак легкого, раковые опухоли ротовой полости, раковые опухоли горла, некоторые виды рака кожи и рак печени.

[89] Комбинация соединений также подходит для применения в лечении раковых заболеваний, при которых некоторые антигенные пептиды являются следствием онкогенных мутаций. В частности, антигены, происходящие из генов CTNNB1, CASP8 и HER2, могут содержать точечные мутации. Ожидают, что опухоли с высокой частотой мутаций, такие как меланома, карцинома легкого, или микросателлитной нестабильностью (MSI), наблюдаемой при карциноме толстой и прямой кишки, содержат больше мутированных антигенов. Другие онкогены, P53, KRAS или NRAS, также связаны с различными раковыми заболеваниями. Также идентифицированы пептиды или опухолевые антигены, полученные в результате хромосомных транслокаций, такие как BCR-ABL в случае гематологических раковых заболеваний, или ETV6-AML1. Мутации, которые постоянно активируют онкоген Ras, обнаруживают в 20-25% всех опухолей у человека и вплоть до 90% в случае некоторых видов рака, таких как рак поджелудочной железы. Комбинация соединений также подходит для применения в лечении раковых заболеваний, при которых антигены кодируются протоонкогенами клеток зародышевой линии. Опухолевые антигены, связанные с протоонкогенами клеток зародышевой линии, представляют собой гены, кодирующие антиген меланомы (MAGE). Более 25 функциональных генов на X-хромосоме определены как гены MAGE (MAGEA, MAGEB и MAGEC), и MAGEA1, MAGEA2 и MAGEA3 вовлечены в различные раковые опухоли. Другие гены, такие как BAGE, GAGE, LAGE/NY-ESO1, SSX, также связанные с X-хромосомой, экспрессируются в различных раковых опухолях, а не в здоровых тканях, за исключением клеток зародышевой линии и трофобластических клеток. Существуют данные о том, что NY-ESO-1 экспрессируется приблизительно 80% синовиальных сарком, а также 10-50% метастатических меланом, рака молочной железы, яичников и легкого. MAGEA3 представляет собой один из наиболее часто экспрессируемых ТАА (опухолеассоциированных антигенов) в различных опухолях, включая меланому. Были

идентифицированы пептиды или опухолевые антигены, которые происходят из циклина-A1, белка, обладающего пропролиферативными и антиапоптотическими свойствами. Эти антигены экспрессируются в яичке и при остром миелоидном лейкозе.

[90] Комбинация соединений также подходит для применения в лечении раковых опухолей, в которых раковые клетки экспрессируют антигены с низкой опухолевой специфичностью. Большинство идентифицированных дифференцировочных антигенов присутствует на клетках меланомы, а также в здоровых клетках. Пептиды или опухолевые антигены, происходящие из белков, такие как тирозиназа, gp100/pmel17, мелан-A/MART-1, gp75/TRP1 или TRP2, часто встречаются у пациентов с меланомой и здоровых добровольцев. MART-1, gp100, CEA, CD19 представляют собой тканевые дифференцировочные антигены, CD19 представляет собой опухолевый антиген, который экспрессируется только на здоровых и злокачественных В-клетках. Были также идентифицированы пептиды или опухолевые антигены из простат-специфического антигена (PSA) и простатической кислой фосфатазы (PAP), двух белков, экспрессируемых в здоровых тканях предстательной железы и опухолевых тканях предстательной железы. Раково-эмбриональный антиген (CEA) часто сильно экспрессируется при раке толстой и прямой кишки, и в других эпителиальных опухолях, а также присутствует на более низком уровне в различных здоровых эпителиальных клетках кишечного тракта, а также при карциноме толстой и прямой кишки, желудка, поджелудочной железы, немелкоклеточной карциноме легкого и карциноме молочной железы. Альфафетопротейн (AFP) и CEA представляют собой онкофетальные антигены, вырабатываемые на ранних стадиях эмбрионального развития и обычно исчезающие после развития иммунной системы, но aberrантно присутствующие в некоторых раковых опухолях, таких как печеночно-клеточная карцинома. Уровень CA-125 (карциномный антиген 125 или MUC16, известный как муцин 16) повышен при эпителиальном раке яичников, но указанный антиген может экспрессироваться в ряде гинекологических (рак эндометрия, фаллопиевой трубы) и негинекологических (рак поджелудочной железы, молочной железы, толстой кишки и легкого) раковых опухолей. Сверхэкспрессия MUC1 (муцин 1, белок, связанный с клеточной поверхностью) часто связана с раком толстой кишки, молочной железы, яичников, легкого, желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы.

[91] Комбинация соединений также подходит для применения в лечении раковых заболеваний, при которых раковые клетки сверхэкспрессируют опухолевые антигены. Сверхэкспрессируемые антигены являются общими для многих видов опухолей. hTERT, EGFR, мезотелин представляют собой обычные белки, сверхэкспрессируемые раковыми клетками. Обратная транскриптаза теломеразы человека (hTERT) представляет собой



распространенный опухолевый антиген, экспрессируемый приблизительно в 85% всех раковых опухолей. Существуют данные о «сверхэкспрессии» ряда антигенных пептидов или опухолевых антигенов; интересным примером сверхэкспрессируемого антигена является пептид RAGE-1, кодируемый геном MOK, в почечно-клеточной карциноме. RAGE-1 также экспрессируется в опухолях разных гистологических типов. Антигены, происходящие из гена PRAME, также сверхэкспрессируются в ряде видов опухолей, но экспрессируются на низких уровнях в различных здоровых тканях. Другие сверхэкспрессируемые гены включают те, которые происходят из ингибитора выживания белка апоптоза, белка p53 дикого типа или онкогена и фактора роста ERBB2 (HER2/NEU), который сверхэкспрессируется во многих эпителиальных опухолях, таких как карцинома яичников и молочной железы. HER2 экспрессируется во многих эпителиальных опухолях и сверхэкспрессируется приблизительно в 25% всех первичных карцином молочной железы, при этом сверхэкспрессия HER2 ассоциируется с неблагоприятным прогнозом. Опухолевые антигены сиалил-Tn (STn) (углеводный антиген с коровой областью) обнаруживают в метастатических раковых опухолях молочной железы и других раковых опухолях. Также были идентифицированы пептиды или опухолевые антигены, которые происходят из белка опухоли Вильмса 1 (WT1, первоначально описан в случаях наследственной опухоли Вильмса). Он представляет собой фактор транскрипции, уровни экспрессии которого в 10–1000 раз выше в лейкозных клетках по сравнению со здоровыми клетками, а также который сверхэкспрессируется при остром лейкозе, хроническом миелоидном лейкозе и миелодиспластическом синдроме. Мезотелин представляет собой гликопротеин клеточной поверхности, нормальная экспрессия которого ограничена мезотелиальными клетками, выстилающими плевру, брюшину и перикард, но он также экспрессируется на высоком уровне во многих раковых опухолях, включая злокачественную мезотелиому, рак поджелудочной железы, рак яичников, аденокарциному легкого, рак эндометрия, рак желчных путей, рак желудка и острый миелоидный лейкоз у детей (Hassan et al., 2016).

[92] Комбинация соединений также подходит для применения в лечении раковых опухолей, в которых экспрессируются опухолеспецифические мутированные антигены. Мутированный антиген может быть описан с помощью подходов к идентификации (на основе секвенирования экзома или масс-спектрометрии) и отнесен к персонализированным опухолевым антигенам. Они также представляют собой конкретную мишень для комбинации соединений согласно настоящему изобретению, увеличивающей перекрестную презентацию этих антигенов. MUM-1, первоначально описанный для меланомы, В-катенин, CDK4, ERBB2IP являются примерами опухолеспецифических

мутированных антигенов. CEA, HER2, MUC-1, углеводные антигены (Tn, TF, STn), p53 - ген-супрессор опухоли, мутированный в раковых опухолях, hTERT и WT1 представляют собой опухолеспецифические мутированные антигены, вовлеченные в раковые опухоли молочной железы.

[93] Другой аспект настоящего изобретения относится к любой комбинации соединений, определенных выше в настоящей заявке, для одновременного, отдельного или последовательного применения в предотвращении или лечении, или вакцинации в случае любого состояния или любого заболевания, поддающегося облегчению или предотвращению. В частности, указанное состояние или заболевание, поддающееся облегчению, представляет собой состояние или заболевание, в которое вовлечен CD47, в частности при котором происходит сверхэкспрессия CD47, при этом указанное состояние или заболевание, в частности, выбрано из группы, состоящей из рака, в частности воспалительного рака и рака с инфильтрацией миелоидными клетками, в частности с инфильтрацией СКМП и/или ОАМ-клетками, инфекционного заболевания, хронического воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, неврологического заболевания, повреждения головного мозга, повреждения нерва, полицитемии, гемохроматоза, травмы, септического шока, хронического инфекционного заболевания, в частности инфекционного заболевания, вызванного *Pseudomonas* и цитомегаловирусом, фиброза, атеросклероза, ожирения, диабета II типа, меланомы и дисфункции трансплантата, в частности меланомы, в частности, рака, при котором раковые клетки сверхэкспрессируют CD47.

[94] Другой аспект настоящего изобретения относится к комбинированному продукту, определенному выше, для одновременного, отдельного или последовательного применения в лечении любого состояния, поддающегося облегчению или предотвращению путем дифференцировки моноцитарных супрессорных клеток миелоидного происхождения (Мо-СКМП) в несупрессивные клетки.

[95] Один из вариантов реализации настоящего изобретения относится к способу лечения любого состояния, поддающегося облегчению или предотвращению путем дифференцировки моноцитарных супрессорных клеток миелоидного происхождения (Мо-СКМП) в несупрессивные клетки, у нуждающегося в этом субъекта, включающему одновременное, отдельное или последовательное введение указанному субъекту эффективного количества комбинированного продукта, определенного выше, при этом указанный субъект является SIRPα v1-положительным.

[96] Один из вариантов реализации настоящего изобретения относится к применению комбинированного продукта, определенного выше, в изготовлении лекарственного средства для лечения любого состояния, поддающегося облегчению или предотвращению

путем дифференцировки моноцитарных супрессорных клеток миелоидного происхождения (Mo-СКМП) в несупрессивные клетки, при этом указанный субъект является SIRPa v1-положительным.

[97] Один из аспектов настоящего изобретения относится к комбинированному продукту, определенному выше, для одновременного, отдельного или последовательного применения в лечении любого состояния, поддающегося облегчению или предотвращению путем модификации поляризации макрофагов в провоспалительные макрофаги.

[98] Один из вариантов реализации настоящего изобретения относится к способу лечения любого состояния, поддающегося облегчению или предотвращению путем модификации поляризации макрофагов в провоспалительные макрофаги, у нуждающегося в этом субъекта, включающему одновременное, отдельное или последовательное введение указанному субъекту эффективного количества комбинированного продукта, определенного выше, при этом указанный субъект является SIRPa v1-положительным.

[99] Один из вариантов реализации настоящего изобретения относится к применению комбинированного продукта, определенного выше, в изготовлении лекарственного средства для лечения любого состояния, поддающегося облегчению или предотвращению путем модификации поляризации макрофагов в провоспалительные макрофаги.

[100] Один из аспектов настоящего изобретения относится к комбинированному продукту, определенному выше, для одновременного, отдельного или последовательного применения в лечении патологии, выбранной из группы, состоящей из рака, инфекционного заболевания, хронического воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, неврологического заболевания, повреждения головного мозга, повреждения нерва, полицитемии, гемохроматоза, травмы, септического шока, хронического инфекционного заболевания (например, вызванного *Pseudomonas* или цитомегаловирусом), фиброза, атеросклероза, ожирения, диабета II типа и дисфункции трансплантата, или для применения в вакцинации.

[101] Один из вариантов реализации настоящего изобретения относится к способу лечения патологии, выбранной из группы, состоящей из рака, инфекционного заболевания, хронического воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, неврологического заболевания, повреждения головного мозга, повреждения нерва, полицитемии, гемохроматоза, травмы, септического шока, хронического инфекционного заболевания (например, вызванного *Pseudomonas* или цитомегаловирусом), фиброза, атеросклероза, ожирения, диабета II типа и дисфункции трансплантата, у нуждающегося в этом субъекта, включающему одновременное, отдельное или последовательное введение

указанному субъекту эффективного количества комбинированного продукта, определенного выше.

[102] Один из вариантов реализации настоящего изобретения относится к применению комбинированного продукта, определенного выше, в изготовлении лекарственного средства для лечения патологии, выбранной из группы, состоящей из рака, инфекционного заболевания, хронического воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, неврологического заболевания, повреждения головного мозга, повреждения нерва, полицитемии, гемохроматоза, травмы, септического шока, хронического инфекционного заболевания (например, вызванного *Pseudomonas* или цитомегаловирусом), фиброза, атеросклероза, ожирения, диабета II типа и дисфункции трансплантата, или для применения в вакцинации.

[103] Настоящее изобретение также относится к любой комбинации соединений, такой как описана в настоящем документе.

[104] Настоящее изобретение также относится к способу помощи клиническому врачу *in vitro* или *ex vivo* в принятии решения о лечении пациента антителом к SIRPa человека или его антигенсвязывающим фрагментом, или антигенсвязывающим миметиком антитела, или модифицированным антителом, в частности, при котором антитело к SIRPa v1 человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело предназначено для введения пациенту, при этом указанный способ включает определение присутствия SIRPa v1 в биологическом образце, предварительно полученном от пациента, при этом указанный SIRPa v1, в частности, детектируют антителом к SIRPa v1 человека, определенным в настоящем документе, или полученным, как определено в настоящем документе, или соединением, выбранным в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, и при этом присутствие SIRPa v1 в биологическом образце указывает на то, что лечение, вероятно, будет эффективным.

[105] Настоящее изобретение также относится к антителу, его антигенсвязывающему фрагменту, антигенсвязывающему миметику антитела или модифицированному антителу для применения в лечении или предотвращении состояния, при этом пациент, получающий указанное лечение, является SIRPa v2-положительным, способу получения и/или выбора антитела анти-SIRPa v2 или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, или модифицированного антитела. Такое антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело для применения ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека и не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с

SIRPa v1 человека и, в частности, не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRP $\alpha$  человека. Такое антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело может обладать такой же способностью связываться, что и соединения, направленные против SIRPa v1 человека, описанные согласно настоящему изобретению, за исключением того, что эта способность относится к его связыванию с SIRPa v2 человека. Более того, такое соединение, направленное против SIRPa v2 человека, может обладать по меньшей мере одной из следующих характеристик, в частности, несколькими, в частности, всеми следующими характеристиками:

- оно связывается с SIRPa v2 человека с аффинностью (KD), составляющей по меньшей мере  $10E-8$  M, в частности по меньшей мере  $10E-9$  M, более предпочтительно по меньшей мере  $10E-10$  M; и/или
- оно уменьшает или ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека; и/или
- оно не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека; и/или
- оно не ингибирует пролиферацию Т-клеток человека; и/или
- оно не ингибирует активацию Т-клеток человека; и/или
- оно усиливает активацию макрофагов; и/или
- оно усиливает перекрестную презентацию по меньшей мере одного антигена антигенпрезентирующими клетками Т-клеткам человека, в частности CD8<sup>+</sup> Т-клеткам человека.

[106] Настоящее изобретение также относится к применению полипептида, в частности антигена, для получения и/или для выбора антитела к SIRPa v2 человека или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, или модифицированного антитела для применения. Соответственно, согласно настоящему изобретению предложен полипептид, подходящий, в частности, для получения антитела к SIRPa v2 человека и/или для выбора, и/или получения такого антитела, и/или для тестирования аффинности связывания такого антитела. Для этого также предложен полипептид, в частности антиген, содержащий или состоящий из эпитопа SIRPa v1 человека, состоящего из SEQ ID No: 2 (KGSPDT) или SEQ ID No: 29 (KFRKGGSPDTE), или SEQ ID No: 30 (TEFKSGAGTELSVR), для применения в выборе антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или антигенсвязывающего миметика антитела, который ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека и который не предотвращает или не уменьшает связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека, в частности который не

связывается специфично с SIRPa v1 человека, в частности который не связывается специфично с SIRPg человека.

[107] Такой полипептид можно применять как полипептид, содержащий эпитоп SIRPa v1 человека, либо для получения, и/либо для выбора соединения, направленного против SIRPa v2 человека. Настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, кодирующему такой полипептид, как подробно описано для SIRPa v1. Комбинации соединений могут содержать такое соединение, направленное против SIRPa v2 человека, вместо соединения, направленного против SIRPa v1. Способы оценки вероятности эффективности лечения *ex vivo* или *in vivo* могут быть направлены на определение SIRPa-v2-положительного субъекта или на детектирование SIRPa v2, например, путем применения соединения, направленного против SIRPa v2 человека, или путем детектирования аллеля SIRPa v2, как определено в настоящей заявке.

[108] Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело для применения согласно настоящему изобретению (также называемое соединением, направленным против SIRPa человека) или комбинацию соединений, содержащую соединение анти-SIRPa, описанное в настоящем документе; указанная фармацевтическая композиция содержит фармацевтический носитель, при этом указанная фармацевтическая композиция необязательно также содержит другой активный ингредиент. Соответственно, также предложена фармацевтическая композиция, при этом указанная фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый или совместимый ингредиент. Термин «фармацевтически приемлемый или совместимый ингредиент» относится к фармацевтически приемлемому разбавителю, адьюванту, вспомогательному веществу или носителю, совместно с которым можно вводить антитело к SIRPa человека, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело. Фармацевтическую композицию можно вводить путем местного введения, в частности подкожного введения, внутриопухолевого введения.

[109] Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело для применения согласно настоящему изобретению можно вводить путем инъекции, посредством катетера, посредством суппозитория или посредством имплантата, при этом указанный имплантат представляет собой пористый, непористый или желатиновый материал, включая мембрану, такую как

сиаластиковая (sialastic) мембрана, или волокно, в частности, для длительной доставки. В других вариантах реализации антитела, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело для применения согласно настоящему изобретению можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В других вариантах реализации антитела, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело для применения согласно настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное количество связывающего агента и один или более фармацевтически совместимых ингредиентов. Например, фармацевтическая композиция, как правило, содержит один или более фармацевтических носителей (например, стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла минерального, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п.). Вода является более типичным носителем, когда фармацевтическую композицию вводят внутривенно. В качестве жидких носителей, в частности, для растворов для инъекций можно также использовать солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают, например, крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Композиция при необходимости может также содержать незначительные количества смачивающих агентов или эмульгаторов, или рН буферных агентов. Эти композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т.п. Композиция может быть представлена в виде суппозитория с традиционными связующими веществами и носителями, такими как триглицериды. Составы для перорального введения могут содержать стандартные носители, такие как маннитол, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.д. фармацевтической степени чистоты. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны E. W. Martin в «Remington's Pharmaceutical Sciences». Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество соединения, как правило, в очищенной форме, совместно с подходящим количеством носителя для получения формы для надлежащего введения пациенту.

[110] В типичных вариантах реализации фармацевтическую композицию представляют в соответствии с рутинными методиками в виде фармацевтической композиции, подходящей для внутривенного введения людям. Как правило, композиции для внутривенного введения

представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости фармацевтическая композиция может также содержать солюбилизирующий агент и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты поставляют либо по отдельности, либо в смеси друг с другом в единичной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или не содержащего воды концентрата в герметично закрытой емкости, такой как ампула, на которой указано количество активного агента. Если фармацевтическая композиция предназначена для введения путем инфузии, ее можно дозировать с помощью инфузионного флакона, содержащего стерильную воду или солевой раствор фармацевтической степени чистоты. Если фармацевтическую композицию вводят путем инъекции, может быть предоставлена ампула со стерильной водой для инъекций или солевым раствором для того чтобы ингредиенты можно было смешивать перед введением.

[111] Кроме того, фармацевтическая композиция может быть представлена в виде фармацевтического набора, содержащего (а) емкость, содержащую соединение, связывающее SIRPa v1 человека (например, антитело или производное), в лиофилизированной форме, и (b) вторую емкость, содержащую фармацевтически приемлемый разбавитель (например, стерильную воду) для инъекций. Указанный фармацевтически приемлемый разбавитель можно использовать для восстановления или разведения лиофилизированного соединения, направленного против SIRPa v1 человека. Такая емкость (емкости) необязательно может содержать сведения в форме, предусмотренной государственным органом по контролю производства, применения или продажи фармацевтических препаратов или биологических продуктов, отражающие разрешение государственного органа на производство, применение или продажу для введения человеку. В качестве альтернативы, набор может подходить для местного введения, в частности подкожного введения или перорального введения, и, соответственно, содержать предварительно заполненную емкость, такую как предварительно заполненный шприц или безыгольное устройство, такое как флакон, в частности, когда композиция предназначена для введения подкожно или перорально соответственно.

[112] Количество соединения, направленного против SIRPa человека (например, антитела или производного), которое является эффективным для лечения или предотвращения заболевания, или для вакцинации против заболевания, может быть определено стандартными клиническими методами.

[113] Настоящее изобретение также относится к соединению анти-SIRPa для применения согласно настоящему изобретению в комбинации с другим терапевтическим или профилактическим лечением, в частности в комбинации с радиотерапией, химиотерапией,



иммунотерапией, стимуляторами или ингибиторами индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), агонистами стимулятора генов интерферона (STING), проапоптотическими противораковыми лекарственными средствами, антиангиогенными противораковыми лекарственными средствами.

[114] В конкретном варианте реализации настоящего изобретения соединение анти-SIRPa для применения согласно настоящему изобретению представлено в комбинации с неоантигеном или неоэпитопом, при этом соединение анти-SIRPa усиливает перекрестную презентацию указанного неоантигена или указанного неоэпитопа антигенпрезентирующими клетками Т-клеткам человека, в частности CD8<sup>+</sup> Т-клеткам человека. Неоантигены и неоэпитопы можно идентифицировать или детектировать в опухоли способами, известными в этой области техники.

[115] Настоящее изобретение также относится к способу оценки вероятности эффективности лечения антителом к SIRPa v1 человека или его антигенсвязывающим фрагментом, или модифицированным антителом у субъекта, представляющего собой человека, при этом указанный способ включает:

- определение присутствия SIRPa v1 человека в биологическом образце, предварительно полученном от субъекта, представляющего собой человека; и когда указанный субъект, представляющий собой человека, является SIRPa v1-положительным;
- введение терапевтического количества: антитела анти-SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или модифицированного антитела, описанного в настоящем документе; или любой комбинации, описанной в настоящем документе; или любого соединения, описанного в настоящем документе.

[116] Такой способ представляет особый интерес, когда у субъекта, представляющего собой человека, диагностирован рак или есть вероятность развития рака. В предпочтительном варианте реализации лечение антителом анти-SIRPa или его антигенсвязывающим фрагментом, или модифицированным антителом, вероятно, является эффективным, когда субъект, представляющий собой человека, имеет по меньшей мере один аллель SIRPa v1, т.е. когда биологический образец от субъекта, представляющего собой человека, является SIRPa v1-положительным.

[117] Определение присутствия SIRPa v1 в биологическом образце, полученном от субъекта, можно осуществлять любым известным способом, известным в этой области техники, позволяющим определять аллели, кодирующие SIRPa, у субъекта, представляющего собой человека. Такие способы представляют собой, например, но не ограничиваются ими, сортировку клеток, такую как FACS, генотипирование, секвенирование гена, гибридизацию *in situ*, вестерн-блоттинг, ELISA и т.п.

[118] Настоящее изобретение также относится к следующим вариантам реализации:

**1.** Антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело, содержащее:

a) переменный домен тяжелой цепи, содержащий HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

где:

HCDR1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 9,

HCDR2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 10 или SEQ ID No: 11,

HCDR3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 12 или SEQ ID No: 13, или SEQ ID No: 14, или SEQ ID No: 15;

и

b) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID No: 16 или в SEQ ID No: 17,

при этом указанное антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека и не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека;

для применения в предотвращении и/или лечении заболевания у субъекта, который является SIRPa v1-положительным.

**2.** Антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела для применения согласно варианту реализации 1, отличающееся тем, что переменный домен тяжелой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 18 или в SEQ ID No: 19; или в SEQ ID No: 20; или в SEQ ID No: 21; или в SEQ ID No: 22; или в SEQ ID No: 23; в частности, переменный домен тяжелой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 20;

отличающееся тем, что переменный домен легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 17.

**3.** Антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело для применения согласно варианту реализации 1 или 2, отличающееся тем, что заболевание выбрано из группы, состоящей из инфекционного заболевания, хронического воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, неврологического заболевания, повреждения головного мозга, повреждения нерва, полицитемии, гемохроматоза, травмы, септического шока, хронического инфекционного заболевания, в частности инфекционного заболевания,

вызванного *Pseudomonas* и цитомегаловирусом, фиброза, атеросклероза, ожирения, диабета II типа и дисфункции трансплантата.

**4.** Антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело для применения согласно варианту реализации 1 или 2, отличающееся тем, что заболевание выбрано из группы, состоящей из рака, в частности воспалительного рака и рака с инфильтрацией миелоидными клетками, в частности с инфильтрацией СКМП и/или ОАМ-клетками, меланомы, или отличающееся тем, что применение по п. 1 или 2 предназначено для терапевтической вакцинации против одного из этих заболеваний, в частности для терапевтической вакцинации против меланомы.

**5.** Антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело для применения согласно варианту реализации 4, отличающееся тем, что заболевание представляет собой рак, и у субъекта экспрессируется или детектирован по меньшей мере один антиген, выбранный из группы, состоящей из антигенов вируса папилломы человека, вируса Эпштейна-Барр, полиомавируса клеток Меркеля, вируса иммунодефицита человека, вируса Т-клеточного лейкоза человека, вируса герпеса человека-8, вируса гепатита В, вируса гепатита С, HCV, корового антигена вируса гепатита В (HBC), цитомегаловируса, или из группы антигенов с единичной точечной мутацией, происходящих из группы, состоящей из антигенов гена *ctnnb1*, гена *casp8*, гена *her2*, гена *p53*, гена *kras*, гена *nras*, или опухолевых антигенов, в частности опухолевых антигенов, полученных или происходящих из группы, состоящей из онкогена *ras*, опухолевых антигенов BCR-ABL, опухолевых антигенов ETV6-AML1, генов, кодирующих антиген меланомы (MAGE), антигенов BAGE, антигенов GAGE, антигенов *ssx*, антигенов *pu-eso-1*, опухолевых антигенов циклина-A1, антигена MART-1, антигена *gp100*, антигена CD19, простат-специфического антигена, антигена простатической кислой фосфатазы, раково-эмбрионального антигена, антигена альфафетопротейна, антигена карциномы 125, антигена муцина 16, антигена муцина 1, антигена обратной транскриптазы теломеразы человека, антигена EGFR, антигена MOK, антигена RAGE-1, антигена PRAME, антигена *p53* дикого типа, антигена онкогена ERBB2, опухолевого антигена сиалил-Tn, антигена опухоли Вильмса 1, антигена мезотелина, углеводных антигенов, антигена В-катенина, антигена MUM-1, антигена CDK4 и антигена ERBB2IP, в частности опухолеассоциированного антигена (ТАА) меланомы мелана-А.

**6.** Антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела для применения согласно любому из вариантов реализации 1-5, отличающийся тем, что антитело вводят SIRPa v1-положительному

субъекту, демонстрирующему заболевание, при котором CD47 сверхэкспрессируется в клетках, в частности в раковых клетках, в частности в случае рака, при котором CD47 сверхэкспрессируется раковыми клетками.

7. Антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела для применения согласно любому из вариантов реализации 1-6, обладающий следующими свойствами:

- он не связывается специфично с SIRPa v2 человека; и
- он не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPg человека;

и необязательно по меньшей мере одним из следующих свойств:

- он связывается с SIRPa v1 человека с аффинностью, составляющей по меньшей мере  $1E-9$  M; и/или
- он не связывается специфично с SIRPg человека; и/или
- он не ингибирует активацию и/или пролиферацию Т-клеток человека *in vivo*; и/или
- он усиливает активацию макрофагов; и/или
- он усиливает перекрестную презентацию по меньшей мере одного антигена антигенпрезентирующими клетками Т-клеткам человека, в частности CD8+ Т-клеткам человека.

8. Применение полипептида, в частности применение антигена, содержащего или состоящего из эпитопов SIRPa v1 человека, состоящих из SEQ ID No: 1 или SEQ ID No: 4, или SEQ ID No: 25, в частности, дополнительно содержащего по меньшей мере один из эпитопов SIRPa v1 человека, состоящих из SEQ ID No: 5 и/или SEQ ID No: 6 [линейные эпитопы]; и/или SEQ ID No: 7 и/или SEQ ID No: 8 [конформационные эпитопы], в получении или в выборе антитела к SIRPa v1 человека или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, или модифицированного антитела, которое специфично связывается с SIRPa v1 человека и которое ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека, и которое не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека.

9. Применение полинуклеотида, кодирующего антиген SIRPa v1 человека, при этом указанный выделенный полинуклеотид кодирует эпитоп SIRPa v1 человека, содержащий аминокислотные остатки SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 4 или SEQ ID No: 25, в частности дополнительно включающий по меньшей мере один эпитоп SIRPa v1 человека, содержащий или состоящий из аминокислотных остатков SEQ ID No: 5 и/или SEQ ID No: 6 [линейные эпитопы], и/или SEQ ID No: 7 и/или SEQ ID No: 8 [конформационные эпитопы], для получения полипептида согласно варианту реализации 8, в частности, антигена.

**10.** Способ получения антитела к SIRPa v1 человека, при этом указанный способ включает иммунизацию животного, не относящегося к человеку, в частности млекопитающего, не относящегося к человеку, по меньшей мере одним антигеном, определенным в варианте реализации 9, или по меньшей мере одним антигеном, содержащим или состоящим из эпитопа SIRPa v1 человека, состоящего из SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 4 или SEQ ID No: 25; и, в частности, забор полученной сыворотки или В-клеток от указанного иммунизированного животного, не относящегося к человеку, для получения антител, направленных против указанного антигена, в частности, где антиген содержит или состоит из эпитопов SIRPa v1 человека, состоящих из SEQ ID No: 1 или SEQ ID No: 4, или SEQ ID No: 25, и по меньшей мере одного из эпитопов SIRPa v1 человека, состоящих из SEQ ID No: 5; и/или SEQ ID No: 6; и/или SEQ ID No: 7 и/или SEQ ID No: 8.

**11.** Способ увеличения перекрестной презентации антигена антигенпрезентирующими клетками, в частности дендритными клетками, Т-клеткам, в частности CD8<sup>+</sup> Т-клеткам, при этом указанный способ включает введение субъекту соединения, выбранного из группы, состоящей из антитела к SIRPa человека или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, или модифицированного антитела, при этом указанное соединение обладает по меньшей мере следующими свойствами:

1. оно не связывается специфично с SIRPa v2 человека; и
2. оно связывается с SIRPa v1 человека с аффинностью, составляющей по меньшей мере  $1E-9$  M; и
3. оно уменьшает или ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека; и
4. оно не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v2; и  
необязательно

указанное соединение необязательно обладает по меньшей мере одним из следующих свойств:

- i) оно не ингибирует пролиферацию Т-клеток; и/или
- ii) оно не ингибирует активацию Т-клеток; и/или
- iii) оно усиливает активацию макрофагов; и/или
- iv) оно не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRP<sub>g</sub> человека.

**12.** Способ помощи клиническому врачу *in vitro* или *ex vivo* в принятии решения о лечении пациента антителом к SIRPa человека или антигенсвязывающим фрагментом, или антигенсвязывающим миметиком антитела, или модифицированным антителом, в частности, при котором антитело к SIRPa v1 человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, или модифицированное антитело предназначено для введения пациенту, при этом указанный способ включает определение

присутствия SIRPa v1 в биологическом образце, предварительно полученном от пациента, при этом указанный SIRPa v1, в частности, детектируют антителом к SIRPa v1 человека, определенным согласно настоящему изобретению, или полученным, как определено согласно настоящему изобретению, или соединением, выбранным согласно настоящему изобретению, и при этом присутствие SIRPa v1 в биологическом образце указывает на то, что лечение, вероятно, будет эффективным.

**13.** Способ согласно варианту реализации 10, отличающийся тем, что выделенное антитело к SIRPa v1 человека специфично связывается с SIRPa v1 человека с аффинностью, составляющей по меньшей мере  $1E-9$  M, и не связывается специфично с SIRPa v2 человека, в частности отличающийся тем, что выделенное антитело к SIRPa v1 человека представляет собой антагонист связывания CD47 человека с SIRPa v1 человека и не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека и SIRPg человека.

**14.** Способ выбора и выделения соединения из группы, состоящей из антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или антигенсвязывающего миметика антитела, или модифицированного антитела, при этом указанный способ включает по меньшей мере следующие этапы:

- a) тестирование способности соединения специфично связываться с SIRPa v1 человека и
- b) тестирование способности соединения уменьшать или ингибировать связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека; и
- c) тестирование способности соединения не предотвращать или не ингибировать связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека; и
- d) тестирование способности соединения связываться с аминокислотными остатками D и V, расположенными в положениях 130 и 132 соответственно в SIRPa последовательности SEQ ID No: 3; или расположенными в положениях 100 и 102 соответственно в SIRPa последовательности SEQ ID No: 25;

и необязательно:

- e) тестирование способности соединения не связываться специфично с SIRPa v2 человека; и/или
- f) тестирование способности соединения не связываться специфично с SIRPg человека; и/или
- g) тестирование способности соединения не предотвращать или не ингибировать связывание CD47 человека с SIRPg человека,

при этом выделенное соединение обладает следующими свойствами:

1. оно специфично связывается с SIRPa v1 человека;
2. оно уменьшает или ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека; и

3. оно не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека;

и необязательно по меньшей мере одним из следующих свойств:

4. оно не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPg человека; и/или

5. оно связывается с SIRPa v1 человека с аффинностью, составляющей по меньшей мере  $1E-9$  M; и/или

6. оно не связывается специфично с SIRPg человека; и/или

7. оно не связывается специфично с SIRPa v2 человека.

**15.** Способ выбора и выделения соединения согласно варианту реализации 14, дополнительно включающий по меньшей мере один из следующих этапов:

v) тестирование пролиферации Т-клеток в присутствии соединения; и/или

vi) тестирование активации Т-клеток в присутствии соединения; и/или

vii) тестирование активации макрофагов в присутствии соединения; и/или

viii) тестирование перекрестной презентации антигена, в частности опухолевого антигена, в частности опухолеассоциированного антигена (ТАА) меланомы мелана-А, антигенпрезентирующими клетками, в частности дендритными клетками, Т-клеткам человека в присутствии соединения, в частности перекрестной презентации антигена дендритными клетками CD8<sup>+</sup> Т-клеткам человека,

отличающийся тем, что выделенное соединение обладает по меньшей мере одним из следующих свойств:

1. оно не ингибирует пролиферацию Т-клеток человека; и/или

2. оно не ингибирует активацию Т-клеток человека; и/или

3. оно усиливает активацию макрофагов; и/или

4. оно усиливает перекрестную презентацию антигена антигенпрезентирующими клетками Т-клеткам человека.

**16.** Способ диагностики тяжести заболевания *in vitro* или *ex vivo* у субъекта, представляющего собой человека, в частности способ диагностики, подходящий для применения в персонализированной медицине, в котором антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, определенный в любом варианте реализации настоящего изобретения или полученный, как определено согласно настоящему изобретению, или соединение, выбранное согласно настоящему изобретению, применяют для детектирования SIRPa-положительных клеток в биологическом образце, предварительно полученном от субъекта, и в котором необязательно количественно определяют экспрессию SIRPa v1.

**17.** Способ диагностики тяжести заболевания *in vitro* или *ex vivo* у субъекта, представляющего собой человека, в частности способ диагностики, подходящий для применения в персонализированной медицине, в котором антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, определенный в любом варианте реализации настоящего изобретения или полученный, как определено в любом варианте реализации настоящего изобретения, или соединение, выбранное согласно любому варианту реализации настоящего изобретения, применяют для детектирования SIRPa-положительных клеток в биологическом образце, предварительно полученном от субъекта, и в котором необязательно количественно определяют экспрессию SIRPa v1.

**18.** Композиция, содержащая антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело для применения согласно любому из вариантов реализации 1-7 и по меньшей мере один фармацевтический носитель.

**19.** Набор, содержащий антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, антигенсвязывающий миметик антитела или модифицированное антитело для применения согласно любому из вариантов реализации 1-7 и 18 и устройство, подходящее для местного введения, в частности устройство для подкожной или пероральной доставки, в частности устройство, включающее предварительно заполненный шприц или, в частности, безыгольное устройство.

**20.** Комбинация соединений, содержащая антитело согласно любому из вариантов реализации 1-7 или полученное согласно любому варианту реализации, описанному в настоящем документе, или соединение, выбранное согласно любому варианту реализации, описанному в настоящем документе, и по меньшей мере один антиген, полученный или происходящий из группы, состоящей из антигенов вируса папилломы человека, вируса Эпштейна-Барр, полиомавируса клеток Меркеля, вируса иммунодефицита человека, вируса Т-клеточного лейкоза человека, вируса герпеса человека-8, вируса гепатита В, вируса гепатита С, HCV, корового антигена вируса гепатита В (HBC), цитомегаловируса, или из группы антигенов с единичной точечной мутацией, происходящих из группы, состоящей из антигенов гена *ctnnb1*, гена *casp8*, гена *her2*, гена *p53*, гена *kras*, гена *ngas*, или опухолевых антигенов, в частности опухолевых антигенов, полученных или происходящих из группы, состоящей из онкогена *ras*, опухолевых антигенов BCR-ABL, опухолевых антигенов ETV6-AML1, генов, кодирующих антиген меланомы (MAGE), антигенов BAGE, антигенов GAGE, антигенов *ssx*, антигенов *пу-eso-1*, опухолевых антигенов циклина-A1, антигена MART-1, антигена *gp100*, антигена CD19, простат-специфического антигена, антигена



простатической кислой фосфатазы, раково-эмбрионального антигена, антигена альфафетопротеина, антигена карциномы 125, антигена муцина 16, антигена муцина 1, антигена обратной транскриптазы теломеразы человека, антигена EGFR, антигена МОК, антигена RAGE-1, антигена PRAME, антигена p53 дикого типа, антигена онкогена ERBB2, опухолевого антигена сиалил-Tn, антигена опухоли Вильмса 1, антигена мезотелина, углеводных антигенов, антигена В-катенина, антигена MUM-1, антигена CDK4 и антигена ERBB2IP, в частности опухолеассоциированного антигена (ТАА) меланомы мелана-А, для применения в качестве лекарственного средства или в качестве композиции вакцины, для применения в лечении или предотвращении заболевания у SIRPa v1-положительного субъекта.

**21.** Антигенсвязывающий миметик антитела, который:

- специфично связывается с SIRPa v1 человека и ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека;
- не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRP человека; и, в частности, не связывается специфично с SIRPg человека;

для применения в лечении или предотвращении заболевания, в частности рака, или для применения в терапевтической вакцинации против заболевания, в частности против рака, при этом указанный антигенсвязывающий миметик антитела усиливает перекрестную презентацию антигена, экспрессируемого при указанном заболевании, в частности при раке, и вовлечен в индукцию Т-клеточного ответа, подходящего для лечения указанного заболевания.

**22.** Антигенсвязывающий миметик антитела для применения согласно варианту реализации 21, применяемый в предотвращении и/или лечении заболевания у субъекта, который является SIRPa v1-положительным.

**23.** Антигенсвязывающий миметик антитела для применения согласно варианту реализации 21 или 22, отличающийся тем, что заболевание представляет собой рак, в частности воспалительный рак, рак с инфильтрацией миелоидными клетками, в частности с инфильтрацией дендритными клетками и/или СКМП, и/или ОАМ-клетками, метастаз рака, в частности метастаз рака молочной железы, меланому, или отличающийся тем, что применение согласно варианту реализации 21 или 22 предназначено для терапевтической вакцинации против одного из этих заболеваний, в частности для терапевтической вакцинации против меланомы.

**24.** Антигенсвязывающий миметик антитела для применения согласно любому из вариантов реализации 21-23, обладающий следующими свойствами:

- он не связывается специфично с SIRPa v2 человека;

- он не ингибирует связывание CD47 человека с SIRP<sub>g</sub> человека; в частности он не связывается специфично с SIRP<sub>g</sub> человека;
- он связывается с SIRP<sub>a</sub> v1 человека с аффинностью, составляющей по меньшей мере 10E-9 M;
- он усиливает перекрестную презентацию по меньшей мере одного антигена антигенпрезентирующими клетками Т-клеткам человека, в частности дендритными клетками, в частности CD8<sup>+</sup> Т-клеткам человека.

**25.** Антигенсвязывающий миметик антитела для применения согласно варианту реализации 24, дополнительно обладающий по меньшей мере одним из следующих свойств:

- он не ингибирует активацию и/или пролиферацию Т-клеток человека *in vivo* и/или
- он усиливает активацию макрофагов.

**26.** Антигенсвязывающий миметик антитела для применения согласно любому из вариантов реализации 21-25, дополнительно содержащий по меньшей мере один фармацевтический носитель.

**27.** Антигенсвязывающий миметик антитела для применения согласно любому из вариантов реализации 21-26, отличающийся тем, что заболевание представляет собой рак, и у субъекта экспрессируется или детектирован по меньшей мере один антиген, выбранный из группы, состоящей из антигенов вируса папилломы человека, вируса Эпштейна-Барр, полиомавируса клеток Меркеля, вируса иммунодефицита человека, вируса Т-клеточного лейкоза человека, вируса герпеса человека-8, вируса гепатита В, вируса гепатита С, HCV, корового антигена вируса гепатита В (HBC), цитомегаловируса, или из группы антигенов с единичной точечной мутацией, происходящих из группы, состоящей из антигенов гена *ctnnb1*, гена *casp8*, гена *her2*, гена *p53*, гена *kras*, гена *nras*, или опухолевых антигенов, в частности опухолевых антигенов, полученных или происходящих из группы, состоящей из онкогена *ras*, опухолевых антигенов BCR-ABL, опухолевых антигенов ETV6-AML1, генов, кодирующих антиген меланомы (MAGE), антигенов BAGE, антигенов GAGE, антигенов *ssx*, антигенов *pu-eso-1*, опухолевых антигенов циклина-A1, антигена MART-1, антигена *gp100*, антигена CD19, простат-специфического антигена, антигена простатической кислотой фосфатазы, раково-эмбрионального антигена, антигена альфафетопротеина, антигена карциномы 125, антигена муцина 16, антигена муцина 1, антигена обратной транскриптазы теломеразы человека, антигена EGFR, антигена MOK, антигена RAGE-1, антигена PRAME, антигена *p53* дикого типа, антигена онкогена ERBB2, опухолевого антигена сиалил-Tn, антигена опухоли Вильмса 1, антигена мезотелина, углеводных антигенов, антигена В-

катенина, антигена MUM-1, антигена CDK4 и антигена ERBB2IP, в частности опухолеассоциированного антигена (ТАА) меланомы мелана-А.

**28.** Антигенсвязывающий миметик антитела для применения согласно любому из вариантов реализации 21-27, дополнительно содержащий по меньшей мере один антиген, полученный или происходящий из группы, состоящей из антигенов вируса папилломы человека, вируса Эпштейна-Барр, полиомавируса клеток Меркеля, вируса иммунодефицита человека, вируса Т-клеточного лейкоза человека, вируса герпеса человека-8, вируса гепатита В, вируса гепатита С, HCV, корового антигена вируса гепатита В (HBC), цитомегаловируса, или из группы антигенов с единичной точечной мутацией, происходящих из группы, состоящей из антигенов гена *ctnnb1*, гена *casp8*, гена *her2*, гена *p53*, гена *kras*, гена *ng2*, или опухолевых антигенов, в частности опухолевых антигенов, полученных или происходящих из группы, состоящей из онкогена *ras*, опухолевых антигенов BCR-ABL, опухолевых антигенов ETV6-AML1, генов, кодирующих антиген меланомы (MAGE), антигенов BAGE, антигенов GAGE, антигенов *ssx*, антигенов *pu-eso-1*, опухолевых антигенов циклина-A1, антигена MART-1, антигена *gp100*, антигена CD19, простат-специфического антигена, антигена простатической кислой фосфатазы, раково-эмбрионального антигена, антигена альфафетопротеина, антигена карциномы 125, антигена муцина 16, антигена муцина 1, антигена обратной транскриптазы теломеразы человека, антигена EGFR, антигена MOK, антигена RAGE-1, антигена PRAME, антигена *p53* дикого типа, антигена онкогена ERBB2, опухолевого антигена сиалил-Tn, антигена опухоли Вильмса 1, антигена мезотелина, углеводных антигенов, антигена В-катенина, антигена MUM-1, антигена CDK4 и антигена ERBB2IP, в частности опухолеассоциированного антигена (ТАА) меланомы мелана-А, для применения в качестве лекарственного средства или в качестве композиции вакцины, для применения в лечении или предотвращении заболевания у SIRPa v1-положительного субъекта.

### **Краткое описание чертежей**

**Фиг.1. Выравнивание последовательностей семейства SIRP.** Выравнивание белковой последовательности дистального по отношению к мембране домена для вариантов v1 и v2 SIRPa, SIRPb и SIRPg, и локализация SNP в белковой последовательности (пронумерованные стрелки от 1 до 16). Серый прямоугольник соответствует последовательностям сигнального пептида, подчеркивания жирным шрифтом показывают линейные эпитопы, распознаваемые антителом к SIRPa человека, серые пунктирные прямоугольники показывают конформационные эпитопы, распознаваемые антителом к SIRPa v1 человека. SEQ ID NO. с 32 по 35 соответствуют последовательностям,

представленным на Фиг.1 как «P78328\_SIRPa\_ЧЕЛОВЕК\_Вариант1»; «SIRPa\_ЧЕЛОВЕК\_Вариант»; «O00241\_SIRPB\_ЧЕЛОВЕК»; и «Q9P1W8\_SIRPG\_ЧЕЛОВЕК» соответственно.

**Фиг.2. Связывание антител SIRPa к вариантам V1 и V2 SIRPa человека, экспрессируемым моноцитами крови.** Выбирали здоровых доноров, для которых уже проведено секвенирование экзона 3 SIRPa. Путем сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) тестировали связывание собственного антитела анти-SIRPa (анти-SIRPa v1-FITC в левой части чертежа) и коммерческого SE7C2 (в правой части чертежа) на моноцитах крови от доноров, выбранных из SIRPa V1/V1- и SIRPa V2/V2-гомозиготных, а также SIRPa V1/V2-гетерозиготных.

**Фиг.3. Антагонистическая активность антитела к SIRPa v1 человека на моноцитах крови от доноров, которые являются SIRPa v1/v1-гомозиготными донорами, SIRPa v1/v2-гетерозиготными донорами или SIRPa v2/v2-гомозиготными донорами.** Конкурентный анализ посредством FACS одного из антител к SIRPa v1 человека в отношении взаимодействия SIRPa-CD47 с использованием клеток гомозиготных или гетерозиготных доноров. Зависимость доза-ответ для антитела к SIRPa v1 человека использовали для конкуренции со связыванием CD47 с вариантами SIRPa от разных доноров. Процент связывания CD47 приводили к контролю и результаты представляли для каждого донора клеток: V2/V2-гомозиготного (треугольник), V1/V2-гетерозиготного (квадрат) и V1/V1-гомозиготного (круг).

**Фиг.4. Исследование связывания вариантов SIRPa с применением антитела к SIRPa v1 человека и антитела Kwar путем Elisa.** Оценка связывания путем ELISA с использованием иммобилизованных мутированных вариантов SIRPa (SIRPa с v1 по v8, см. Таблицу 2 в Примере 1), связанных с Fc-доменом мыши. Антитело к SIRPa v1 человека и антитело Kwar (которое, как известно, связывает как SIRPa v1, так и SIRPa v2) сравнивали на предмет способности связывать различные мутированные варианты SIRPa. Обнаружение проводили с использованием антитела осла к иммуноглобулину человека и путем колориметрии при 450 нм с использованием субстрата TMB. ED50 (нг/мл) представляет собой концентрацию указанного антитела для достижения 50% сигнала в этом анализе.

**Фиг.5. Перекрестная презентация антигена мыши дендритными клетками (ДК).** ДК мыши предварительно нагружали антигеном овальбумином, а затем культивировали совместно с трансгенными Т-клетками от мышей ОТИ или ОТП (трансгенных по экспрессии TCR, ориентированной на молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I или II для овальбумина (OVA)). Пролиферацию Т-

клеток измеряли путем включения тимидина (CD8+ Т-клетки ОТИ или CD4+ Т-клетки ОТИ) в различных условиях: контроль без антигена (Ag) (незаштрихованный круг) или антитело изотипического контроля (крестики), антитела мыши анти-SIRPa: P84 (квадрат) и MY1 (круг) или антитело анти-CD47 (треугольник). **А:** результаты, полученные для CD8-положительных Т-клеток ОТИ. **А:** результаты, полученные для CD4-положительных Т-клеток ОТИ-И.

**Фиг.6. Перекрестная презентация антигена человека дендритными клетками.**

Определяли фенотип моноцитов от HLA-A2+ здоровых добровольцев по SIRPa, и в экспериментах двух видов использовали как гомозиготные (v1/v1), так и гетерозиготные (v1/v2) моноциты. **А.** Экспрессия IL-2 в CD8+ Т-клетках. Результаты, полученные в случае SIRPa v1-гомозиготных незрелых ДК, показаны кругом и результаты, полученные в случае SIRPa v1/v2-гетерозиготных незрелых ДК, показаны квадратом. Незрелые ДК, нагруженные меланом-А, использовали для активации мелан-А/HLA-A2+ специфического клона тимомы, которую измеряли по секреции IL-2 после культивации в течение 48 часов. **В.** Экспрессия IFNg в CD8+ Т-клетках, стимулированных незрелыми ДК (нДК), нагруженными меланом-А. нДК предварительно инкубировали во время фазы загрузки совместно с различными антителами: анти-SIRPa v1 (круг), анти-SIRPa/g (квадрат), анти-SIRPa v1 + анти-SIRPa/g (ромб), B6H12 (перевернутый треугольник) и CC2C6 (треугольник). Экспрессию IFNg оценивали путем проточной цитометрии.

**Фиг.7. Аллогенный ответ Т-клеток (CD4- и CD8-положительных клеток) на антитела к SIRPa v1 человека и к CD47 человека в присутствии дендритных клеток.**

Т-клетки человека, выделенные из мононуклеарных клеток периферической крови здоровых добровольцев, стимулировали аллогенными дендритными клетками (ДК) в соотношении 5 Т-клеток:1 ДК в течение 5 дней. Антитела добавляли в 0 день культивации. **А:** пролиферация, измеренная путем включения H<sup>3</sup>-тимидина в течение последних 12 часов культивации. **В:** процент секреции IFNg, измеренный путем ELISA. Результаты приводили к контрольным условиям. Анти-SIRPa v1 (квадрат) соответствует клеткам, обработанным собственным антителом, специфичным в отношении SIRPa v1, которое не связывает SIRPa v2 и SIRPg. Моноклональное антитело (mAb) к CD47 (треугольник) соответствует клеткам, обработанным антителом, которое связывается с CD47.

**Фиг.8. Биоанализ поляризации макрофагов, позволяющий сравнить моноциты доноров V1/V1 и V1/V2, обработанные антителом анти-SIRPa v1.** Секрецию MIP-1a/CCL-3 и MIP-1b/CCL-4 измеряли путем ELISA в надосадочной жидкости клеток, не обработанных (круг) или обработанных антителом к SIRPa v1 человека (квадрат). **А:**

результаты, полученные в случае клеток от V1/V1-гомозиготных доноров. **В:** результаты, полученные в случае клеток от V1/V2-гетерозиготных доноров.

**Фиг.9. Анализ связывания антител анти-SIRPa на моноцитах человека, гомозиготных по SIRPa v2, путем FACS и определение ED50 антитела к SIRPa v2 путем ELISA.** Оценка путем цитофлуориметрии на моноцитах v2/v2 человека (предварительно окрашенных ингибитором связывания рецептора Fc человека) химерного антитела 18D5 или антитела SIRP29, или других гуманизированных антител анти-SIRPa. Обнаружение проводили с помощью PE-меченого mAb мыши к Fc человека на цитометре Cantoll. ED50 представляет собой концентрацию указанного антитела для достижения 50% сигнала. **А:** среднее значение интенсивности флуоресценции окрашенных v2/v2-положительных клеток. **В:** определение ED50 путем ELISA для каждого антитела. Для большинства гуманизированных антител 18D5 ED50 не поддавалась определению.

**Фиг.10. Конкурентный анализ CD47 методом Blitz с использованием рекомбинантного белка SIRPg человека, предварительно инкубированного совместно с антителами анти-SIRP.** Рекомбинантный белок SIRPg-His иммобилизовали на биосенсоре NINTA в концентрации 10 мкг/мл и добавляли указанные антитела в концентрации 20 мкг/мл (концентрация насыщения). Затем добавляли CD47Fc в концентрации 100 мкг/мл и выводили значения аффинности после периода ассоциации (ka), составляющего 120 с, с последующим периодом диссоциации (kd), составляющим 120 с, с определением константы аффинности (KD). Аффинность (KD) CD47 к SIRPg определяли в различных условиях: в присутствии антитела LSB2.20 (антитела, которое специфично связывается с SIRPg); антитела kwar и антител SIRP29.

**Фиг.11. Влияние антител анти-SIRPa на модель метастазов рака молочной железы у мышей.** Модель рака молочной железы 4T1 использовали для исследования эффективности анти-SIRPa мыши (антитело p84 и антитело MY-1) в отношении метастазов в легких. На фигуре представлено количество узелков метастазов в легких у мышей, получавших или не получавших лечение антителами анти-SIRPa. Мыши, получавшие лечение изотипическим контролем, обозначены ромбом, мыши, получавшие лечение антителом p84, обозначены кругом и мыши, получавшие лечение антителом MY-1, обозначены квадратом. Получали значимые результаты для контроля и каждого антитела анти-SIRPa.

## **Примеры**

**Пример 1: идентификация эпитопа, позволяющего получать антитела к SIRPa v1 человека**

Ранее было описано, что SIRPa человека демонстрирует некоторый уровень полиморфизма в домене 1 IgV, который взаимодействует с CD47. Этот полиморфизм расположен в основном в экзоне 3 гена SIRPa (SEQ ID No: 27) (Takenaka *et al.*, 2007). В 37 различных полученных от доноров геномных последовательностях разного происхождения Takenaka *et al.* идентифицировали 10 различных последовательностей/аллелей с 2 главными аллелями: вариант 1 (v1) и вариант 2 (v2). Остальные аллели отличаются от последовательностей V1 или V2 только 1 или 2 SNP. Соответственно, семейство SIRPa подразделяется на два подсемейства: изоформы SIRPa v1 и изоформы SIRPa v2. Эти разные аллели обуславливают немного отличающиеся белки, но все варианты схожим образом связывают лиганд CD47. Частота аллеля v1 у Takenaka *et al.* составляет 78% (89% для V1 и V1-подобного), тогда как частота генотипа для гомозиготных V1/V1-подобных доноров составляет 65%. 24% из их 37 доноров демонстрировали гетерозиготный генотип.

КОДИРУЮЩИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК И БЕЛКОВЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДЛЯ SIRPA V1 И V2:

V1 последовательности SIRPa человека получали в.ncbi (ID гена: 140885).

Эталонная последовательность геномной ДНК для экзона 3 SIRPa v1 (транскрипт SIRPA-201 ID ENST00000400068.7) (SEQ ID No: 27):

```
GAGTGGCGGGTGAGGAGGAGCTGCAGGTGATTCAGCCTGACAAGTCCGTGTTGGTT
GCAGCTGGAGAGACAGCCACTCTGCGCTGCACTGCGACCTCTCTGATCCCTGTGGGG
CCCATCCAGTGGTTCAGAGGAGCTGGACCAGGCCGGGAATTAATCTACAATCAAAA
AGAAGGCCACTTCCCCCGGGTAACAACCTGTTTCAGACCTCACAAAGAGAAACAACA
TGGACTTTTCCATCCGCATCGGTAACATCACCCAGCAGATGCCGGCACCTACTACT
GTGTGAAGTTCCGGAAGGGAGCCCCGATGACGTGGAGTTTAAGTCTGGAGCAGGC
ACTGAGCTGTCTGTGCGCG
```

Аминокислотная последовательность одного SIRPa v1 (ссылка Genbank NP\_001035111.1 (UniProtKB: P78324) (SEQ ID No: 3):

```
MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKSVLVAAGETATLRCTATS
LIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTY
YCVKFRKGGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFSR
DITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTRDVDHSQVICEVAHVTLQG
DPLRGTANLSETIRVPPTLEVTTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVSRT
ETASTVTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVS AH
PKEQGSNTAAENTGSNERNIYIVGVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLH
EPEKNAREITQDTNDITYADLNLPKGKKPAPQAAEPNNHTEYASIQTSPQPASEDTLTYA
DLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVPRK
```

Аминокислотная последовательность одного SIRPa v2 (SEQ ID No: 28):

Последовательность белка, представляющего собой вариант 2, указана в Takenaka et al., 2007. Кодирующую последовательность ДНК получали в ncbi (GenBank: BC075849.1). В базе данных ncbi не найдена последовательность гена для этого варианта.

MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKSVSVAAGESAILHCTVTS  
LIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTY  
CVKFRKGSPTFEKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDI  
LKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTRDVDHSQVICEVAHVTLQGDPL  
RGTANLSETIRVPPTLEVTTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVSRTE  
STVTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVS AHPKE  
QGSNTAAENTGSNERNIYIVVGVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPE  
KNAREITQDNDITYADLNLPKGKKPAPQAAEPNNHTEYASIQTSPQASEDTLTYADLD  
MVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVPRK

Эталонная последовательность геномной ДНК для экзона 3 SIRPa v2 (SEQ ID No: 31):

GAGTGGCGGGTGAGGAGGAGCTGCAGGTGATTCAGCCTGACAAGTCCGTATCAGTT  
GCAGCTGGAGAGTCGGCCATTCTGCACTGCACTGTGACCTCCCTGATCCCTGTGGGG  
CCCATCCAGTGGTTCAGAGGAGCTGGACCAGCCCGGGAATTAATCTACAATCAAAA  
AGAAGGCCACTTCCCCCGGGTAACAACCTGTTTCAGAGTCCACAAAGAGAGAAAACA  
TGGACTTTTCCATCAGCATCAGTAACATCACCCCAGCAGATGCCGGCACCTACTACT  
GTGTGAAGTTCCGGAAAGGGAGCCCTGACACGGAGTTTAAGTCTGGAGCAGGCACT  
GAGCTGTCTGTGCGTGC

Выравнивали аминокислотные последовательности D1-домена SIRPa v1, SIRPa v2, SIRPb и SIRPg, как показано на Фиг. 1.

### АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПА ПОСРЕДСТВОМ БИОИНФОРМАТИКИ

Чтобы изучить больше данных по полиморфизму SIRPa у человека использовали данные из проекта «1000 геномов» (1KG, > 2500 различных геномов человека) для идентификации соответствующих SNP в экзоне 3 SIRPa человека. Авторы настоящего изобретения с использованием Haploview определили, что SNP SIRPa делились на 2 блока гаплотипов (данные не представлены).

Для исследования частоты генотипа и анализа различий между гомозиготными и гетерозиготными донорами, авторы настоящего изобретения сначала идентифицировали 18 SNP (**Таблица 1**) в экзоне 3 SIRPa человека (полиморфном экзоне, известном из литературы, и экзоне, ответственном за связывание с лигандом) и сохраняли SNP, связанные с изменением кодона (изменением аминокислотной последовательности). SNP нумеровали от 1 до 18. SNP 1 не анализировали, поскольку он не известен в литературе.



SNP7 и SNP18 не анализировали с точки зрения частоты генотипа, поскольку они оба соответствуют синонимичному кодону (отсутствует изменение на уровне белка). Затем авторы настоящего изобретения определили частоту аллелей и генотипов SNP с помощью проекта «1000 геномов» 3 фазы, включающего более 5000 доноров из 5 суперпопуляций: n=1030, восточноазиатская (EAS), n=1010, европейская (EUR), n=1338, африканская (AFR), n=704, смешанная американская (AMR), и n=988, южноазиатская (SAS). Учитывали всех индивидуумов из проекта «1000 геномов» 3 фазы.

	Мутации нуклеотидов (SIRPa v1 - SIRPA v2)	Положение и мутации аминокислот (SIRPA v1 - SIRPA v2)	Справочный номер (rs)
SNP1	g-a	44 L-S	rs386811660
SNP2	a-t	50 T-S	rs17855609
SNP3	a-g	51 A	rs17853846
SNP4	c-t	52 T-I	rs17855610
SNP5	g-a	54 R-H	rs17855611
SNP6	c-t	57 A-V	rs17855612
SNP7	t-c	60 L	rS17853847
SNP8	g-c	75 G-A	rs1057114 (=rs72620874)
SNP9	c-g	95 D-E	rs138283486
SNP10	c-t	96 L-S	rs149634649
SNP11	t-c	97 T	rs146163282
SNP12	a-g	100 N-E	rs17855613
SNP13	c-a	101 N	rs17855614
SNP14	c-a	107 R-S	rs17855615
SNP?	g-a	109 G-S	
SNP15+ SNP16	gt - ac	132 V - T	rs115287948 rs114499682
SNP17 =(SNP15 + SNP16)	gt - ac	132 V - T	s386811663
SNP18	c - t	145 R	rs6136375

Таблица 1: идентификация SNP в вариантах SIRPa и положений аминокислот

Затем авторы настоящего изобретения объединяли в кластеры физически смежные SNP с приблизительно одинаковой частотой (отличие <1%) и наносили среднюю частоту этих объединенных в кластеры SNP на круговую диаграмму в соответствии с популяционной генетикой. Наконец, они проводили корреляцию с эпитопом собственного антитела к SIRPa v1 человека (поскольку оно демонстрирует низкое связывание у доноров V2/V2 и слабо блокирует связывание CD47 у доноров V2/V2, данные не представлены), определенным двумя способами (способами определения линейных или конформационных эпитопов). Они также учитывали SNP, связанные с мутацией в SIRP-гамма (поскольку собственное антитело не связывается с SIRP-гамма). Наконец, авторы настоящего изобретения также дополнили этот анализ путем сравнения различий в

последовательностях между SIRPa V1 человека, SIRPa V2 человека и мутациями, обнаруженными у яванских макак (*Macaca fascicularis*) или макак-резус (*Macaca mulatta*), поскольку собственное антитело не обладает перекрестной реактивностью с обезьяной.

#### ВЗАИМОСВЯЗЬ СВЯЗЫВАНИЯ анти-SIRPa И SNP:

Способ: активность связывания для антител анти-SIRPa оценивали путем ELISA. Для ELISA-анализа собственное антитело к SIRPa v1 человека и антитело Kwar тестировали с использованием 8 различных мутированных hSIRPa (SIRPa с v1 по v8; см. Таблицу 2). Различные варианты мутированного hSIRPa (SIRPa с v1 по v8) иммобилизовали на пластике в концентрации 0,5 мкг/мл в карбонатном буфере (pH 9,2) и добавляли очищенное антитело для измерения связывания. После инкубации и промывки добавляли меченые пероксидазой антитела ослы к IgG человека (Jackson Immunoresearch; США; справочный номер 709-035-149) и обнаруживали традиционными методами.

Результаты: для оценки влияния SNP SIRPa человека на связывающую способность собственного антитела к SIRPa v1 человека получали 8 различных рекомбинантных белков SIRPa человека (Таблица 2). Внеклеточные домены этих белков SIRPa подвергали слиянию с Fc мыши из IgG2a и оценивали связывающую способность собственного антитела к SIRPa v1 человека в отношении этих вариантов SIRPa (Фиг.4). Собственное антитело утрачивает свое свойство связывания в ELISA, когда SNP 15+16 мутированы в последовательности V1 (Фиг.4A). В экспериментах, описанных в настоящей заявке, применяемое антитело к SIRPa v1 человека соответствует антителу, содержащему переменный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 20; и переменный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 17. Другая мутация SNP не изменяла свойство связывания собственного антитела. Для сравнения свойства связывания KWAR23 (которое, как описано, связывает как V1, так и V2) не модифицировали ни одной из мутаций SNP (Фиг.4B), что подтверждает то, что белок SIRPa V8 (SNP15+16) является функциональным и что антиген, содержащий эпитоп, локализованный в окружении SNP 15 + 16, позволяет получать антитела анти-SIRPa v1, которые не распознают или не связываются специфично с SIRPa v2.

SIRPa V1
SIRPa V2
SIRPa V3 (SNP1+2+3+4+5+6)
SIRPa V4 (SNP8)
SIRPa V5 (SNP9+10+11)
SIRPa V6 (SNP12+13)
SIRPa V7 (SNP14+?)
SIRPa V8 (SNP15+16)

Таблица 2: рекомбинантные белки SIRPa

## ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА SIRPA НА СВОЙСТВА АНТИТЕЛ - АНАЛИЗ АНТАГОНИЗМА SIRPA-CD47 ПУТЕМ FACS НА МОНОЦИТАХ

**СПОСОБ:** моноциты человека (очищенные путем элютриации из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) человека на платформе DTC, Nantes и замороженные в ДМСО в концентрации 10 М/мл при -80°C или в жидком азоте) размораживали в 40 мл полной среды RPMI. Затем сразу же центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин. Клетки ресуспендировали в 10 мл среды RPMI и подсчитывали на Malassez. Замороженные моноциты человека размораживали, добавляли разведенные образцы, а затем добавляли биотинилированный CD47Fc. Затем обнаруживали биотинилированный CD47Fc с помощью стрептавидина-PE и измеряли флуоресценцию путем проточной цитометрии. Применяли следующий протокол: - помещали 100000 моноцитов человека на лунку в планшет P96 с V-образным дном; - центрифугировали 1 минуту при 2500 об/мин и опустошали лунки, щелкая по планшету; - клетки промывали 2 раза 200 мкл PSE (центрифугировали 1 минуту при 2500 об/мин и опустошали лунки); - готовили 8 разведений образца, начиная с 10 мкг/мл (концентрировали 2х, конечная концентрация 5 мкг/мл) и разводя 3 этапами; - к клеткам добавляли 12,5 мкл образца/лунка и перемешивали; - инкубировали в течение 15 минут на льду; - готовили раствор биотинилированного CD47Fc, концентрированный 2х, определенный в соответствии с пунктом, и к клеткам добавляли 12,5 мкл этого раствора/лунка и перемешивали; - инкубировали в течение 30 минут на льду; - добавляли 175 мкл PSE/лунка; - центрифугировали 1 минуту при 2500 об/мин и опустошали лунки; - клетки 2 раза промывали 200 мкл PSE (центрифугировали 1 минуту при 2500 об/мин и опустошали лунки). Для биотинилированного CD47Fc выбирали промежуточную концентрацию. В этом случае для тестирования антагонистического действия брали 5 мкг/мл биотинилированного CD47Fc. Этот этап необходимо было проводить каждый раз, поскольку процент CD47-положительных клеток зависит от конкретного донора; - разводили стрептавидин-PE в соотношении 1/1000, добавляли 25 мкл/лунка - инкубировали в течение 15 минут на льду; - добавляли 175 мкл PSE/лунка; - центрифугировали 1 минуту при 2500 об/мин и опустошали лунки; - клетки 2 раза промывали 200 мкл PSE (центрифугировали 1 минуту при 2500 об/мин и опустошали лунки); - переносили окрашенные клетки в планшет P96 canto с V-образным дном и прочитывали на BD canto II.

**РЕЗУЛЬТАТЫ:** авторы настоящего изобретения анализировали свойства связывания собственного антитела анти-SIRPa v1 путем проточной цитометрии на моноцитах крови от здоровых доноров, для которых уже проведено секвенирование экзона

3 SIRPa (Фиг.2). Они выбрали V1/V1-гомозиготных доноров, V2/V2-гомозиготных доноров, а также V1/V2-гетерозиготных доноров. На Фиг.3 показано, что антитело к SIRPa v1 человека значительно меньше связывается у доноров V2/V2. Для сравнения авторы настоящего изобретения обнаружили, что коммерческое mAb анти-SIRPa (клон SE7C2) связывает только белок V2. Данные для SE7C2 показывают, что доноры V2/V2 экспрессируют белок SIRPa на поверхности на схожем уровне в сравнении с донорами V1/V2, что подтверждает то, что уменьшение связывания антитела к SIRPa v1 человека у доноров V2/V2 обусловлено не более низкой экспрессией, а малым связыванием этого антитела с этим белком SIRPa v2 (Фиг.2).

Затем авторы настоящего изобретения анализировали путем проточной цитометрии антагонистическое свойство собственного антитела к SIRPa v1 человека предотвращать связывание рекомбинантного белка CD47 человека на моноцитах крови от здоровых доноров (Фиг.3). Для исследования влияния полиморфизма SIRPa на антагонистическое действие на связывание CD47-Fc проводили анализ антагонистического действия на замороженных моноцитах человека, генотипированных по SIRPa. Данные, представленные на Фиг.3, демонстрируют, что антитело к SIRPa v1 человека значительно противодействует связыванию CD47 у доноров V1/V1 (n=3), тогда как оно только снижает наполовину связывание CD47 у V1/V2-гетерозиготных донорах (n=5). Слабое (25%) антагонистическое действие антитела к SIRPa v1 человека наблюдали у V2/V2-гомозиготных доноров (n=3). Как показано на Фиг.3, собственное антитело распознавало SIRPa V1 и очень слабо распознавало SIRPa V2. Это указывает на то, что собственное антитело оказывает сильное антагонистическое действие на связывание CD47-Fc на моноцитах человека, V1/V1-гомозиготных по SIRPa, очень слабое антагонистическое действие на V2/V2-гомозиготных моноцитах человека и промежуточное антагонистическое действие на V1/V2-гетерозиготных моноцитах человека.

## ВЫВОД

Не было описано, что полиморфизм SIRPa влияет на связывание CD47, но может влиять на распознавание моноклональными антителами к SIRPa человека. Takenaka *et al.* определили несколько вариантов с высокой гомологией последовательностей относительно последовательностей V1 или V2. Другие варианты представляют собой различные комбинации среди последовательностей V1 и V2 и их можно рассматривать как V1-подобные или V2-подобные варианты в зависимости от преобладающего генотипа. Эти результаты подтверждены данными из проекта «1000 геномов», которые демонстрируют, что существуют два основных варианта SIRPa: V1 и V2. Вариант 1 чаще всего встречается среди мирового населения, за исключением восточноазиатской суперпопуляции. Анализ

SNP согласно настоящему изобретению показал, что частота аллеля SIRPa V1 (V1/V1 и V1/V2), соответствующая эпитопу, позволяющему получать и/или выбирать антитела к SIRPa v1 человека, составляет 76-86% в США и Европейском союзе, и V1/V1-гомозиготные пациенты составляют от 40 до 50% населения США и Европейского союза (на основе частоты SNP 15 и 16). Проведенный авторами настоящего изобретения анализ на n=184 донорах показал, что собственное антитело к SIRPa v1 человека прочно связывает у 83-86% доноров v1 (V1/V1 и V1/V2). V1/V1-гомозиготные доноры составляли от 40 до 50% анализируемой когорты. Хотя анализ антагонистического действия в отношении CD47 интересным образом показал, что собственное антитело препятствовало связыванию только наполовину, функциональные анализы поляризации макрофагов, представленные на Фиг.8, и перекрестной презентации опухолевого антигена дендритными клетками человека, представленные на Фиг.6, показали, что собственное антитело к SIRPa v1 человека демонстрирует одинаковую биологическую эффективность у доноров как V1/V1, так и V1/V2.

**Пример 2: сравнение блокады взаимодействия SIRPa-CD47 при перекрестной презентации иммунным клеткам у мыши и человека**  
**ПЕРЕКРЕСТНАЯ ПРЕЗЕНТАЦИЯ У МЫШИ (Фиг.5)**

**ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА:** моноклональное антитело, представляющее собой аллостерический антагонист, нацеленное на домен 2 SIRP $\alpha$  мыши (клон P84 - IgG1 крысы), очищали из гибридомы. Моноклональное антитело, представляющее собой ортостерический антагонист, нацеленное на домен 1 SIRP $\alpha$  мыши (клон MY-1 – IgG2a мыши) (García et al., 2011), искусственно переконструировали в Fc-домен IgG1 из исходной гибридомы. Оба антитела анти-SIRP $\alpha$  блокируют передачу сигнала через SIRP $\alpha$  в миелоидных клетках. Очищали IgG1-мыши изотипического контроля (клон 3G8). Суррогатное антагонистическое моноклональное антитело к CD47 мыши (клон M1AP410) приобретали у BioXCell (#BE0283).

**ЭКСПРЕССИЯ SIRP $\alpha$  МЫШИ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ СЕЛЕЗЕНКИ:** природные ДК выделяли из селезенки интактных мышей путем CD11c-положительного магнитного отбора и разделяли по экспрессии ими CD8 $\alpha$  путем сортировки клеток с помощью BD FACS ARIA II. Как описано в литературе, CD8 $\alpha$ <sup>+/+</sup> ДК, которые являются лучшими антигенпрезентирующими клетками (АПК) для перекрестной презентации, экспрессируют SIRP $\alpha$  на уровне от низкого до отрицательного, тогда как CD8 $\alpha$ <sup>-/-</sup> ДК экспрессируют SIRP $\alpha$  (и, как известно, менее эффективно перекрестно презентуют антигены).

**ФУНКЦИЯ ПРЕЗЕНТАЦИИ АНТИГЕНА ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ СЕЛЕЗЕНКИ:** согласно литературным данным  $CD8\alpha^{+/+}$  ДК с низким/отрицательным уровнем экспрессии SIRPa являются лучшими антигенпрезентирующими клетками (АПК) для перекрестной презентации антигена (Ag) по сравнению с  $CD8\alpha^{-/-}$  ДК (экспрессирующими SIRPa на высоком уровне) (Naan et al., 2000; Hochrein et al., 2001). Однако указанные два подтипа ДК эквивалентно загружали и презентировали экзогенный Ag на молекулах главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II. Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что протокол, используемый для оценки роли SIRPa в перекрестной презентации Ag в случае OVA и Т-клеток OT-I, позволяет восстановить свойства этих ДК (данные не представлены). Действительно,  $CD8\alpha^{+/+}$  ДК индуцировали большую пролиферацию Т-клеток OT-I (от  $CD8^{+}$  овалбумин-специфичных TCR-трансгенных мышей), чем  $CD8\alpha^{-/-}$  ДК, что указывает на лучшее процессирование, загрузку и презентацию Ag на молекулах МНС класса I, тогда как презентация экзогенного антигена является высокой для обоих подтипов ДК селезенки, как наблюдали при пролиферации Т-клеток OT-II (от  $CD4^{+}$  овалбумин-специфичных TCR-трансгенных мышей). Таким образом, экспрессия SIRPa отрицательно коррелировала со способностью дендритных клеток перекрестно презентировать антиген  $CD8^{+}$  Т-клеткам, что позволяет предположить, что SIRPa подавляет перекрестную презентацию у мышей.

**ПЕРЕКРЕСТНАЯ ПРЕЗЕНТАЦИЯ АНТИГЕНА У МЫШИ:**  $CD8\alpha^{+/+}$  и  $CD8\alpha^{-/-}$  ДК нагружали овалбумином (OVA) в течение ночи в присутствии GM-CSF. Затем  $CD8^{+}$  Т-клетки, выделенные из селезенки трансгенных мышей OT-I, и  $CD4^{+}$  Т-клетки, выделенные из селезенки трансгенных мышей OT-II, культивировали совместно с подтипами ДК, нагруженных OVA, в течение 3 дней. Трансгенные мыши экспрессируют TCR, специфичный для МНС I (OT-I) и II (OT-II) OVA. Пролиферацию оценивали путем включения  $^3H$ -тимидина в течение последних 16 часов культивации. Добавляли 10 мкг/мл mAb анти-SIRPa во время инкубации ДК совместно с белком OVA и во время пролиферации Т-клеток с ДК, нагруженными OVA. Этот протокол позволяет оценить влияние блокады SIRPa во время процессирования белка дендритными клетками, а затем презентации пептида OVA молекулами МНС класса I дендритными клетками  $CD8^{+}$  Т-клеткам OT-I и молекулами МНС класса II  $CD4^{+}$  Т-клеткам OT-II, что демонстрирует перекрестную презентацию антигена и презентацию экзогенного антигена соответственно.

Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что блокада SIRPa или CD47 у мыши усиливала презентацию антигена SIRPa<sup>+</sup> дендритными клетками селезенки. На  $CD8\alpha^{+/+}$  ДК (с низким/отрицательным уровнем SIRPa) не влияла блокада пути SIRPa/CD47 в отношении их способности перекрестно представлять OVA Т-клеткам OT-I (не показано).

Однако блокада либо SIRPa блокирующими антителами P84 или MY-1, либо CD47 антителом M1AP410 усиливает перекрестную презентацию антигена CD8 $\alpha$ -/-SIRPa+ дендритными клетками, на что указывает увеличение пролиферации CD8+ OT-I (Фиг.5А).

**ПРЕЗЕНТАЦИЯ ЭКЗОГЕННОГО АНТИГЕНА:** авторы настоящего изобретения анализировали влияние блокады SIRPa/CD47 на презентацию экзогенного Ag; они обнаружили, что блокада пути SIRPa/CD47 не модифицировала презентацию антигена CD8 $\alpha$ +/+ дендритными клетками с низким/отрицательным уровнем SIRPa (не показано). Подобно процессу перекрестной презентации блокада SIRPa/CD47 в SIRPa-положительных CD8 $\alpha$ -/- ДК увеличивала процессирование экзогенного антигена и презентацию на молекулах МНС класса II, измеряемую по пролиферации CD4+ клеток OT-II (Фиг.5В).

## **ВЫВОД**

Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что блокирование пути SIRPa/CD47 (моноклональными антителами анти-SIRPa или анти-CD47) у мыши увеличивало как перекрестную презентацию антигена МНС-I (ответ Т CD8), так и презентацию антигена МНС-II (ответ Т CD4). Эти результаты подтвердили предположение других авторов, таких как (Liu et al., 2016, 2015; Xu et al., 2017).

## **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ПРЕЗЕНТАЦИЯ У ЧЕЛОВЕКА (Фиг.6)**

**ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА:** антагонистическое моноклональное антитело, нацеленное на SIRPa человека (собственное антитело к SIRPA v1 человека - IgG4 человека), получали и очищали авторы настоящего изобретения. IgG4-человека изотипического контроля приобретали у Biolegend (клон QA16A15). Антагонистическое моноклональное антитело, нацеленное на CD47 человека (клон B6H12), приобретали у BioXCell (#BE0019-1) и использовали клон CC2C6 от BioLegend (#TBD2). В некоторых экспериментах антитело анти-SIRPa:g (клон SIRP29 из WO201356352) использовали отдельно или в комбинации с собственным антителом анти-SIRPa V1.

**МЕЛАН-А-СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ОТВЕТ:** перекрестную презентацию клетками человека оценивали по презентации длинного пептида (25-мерного, что подразумевает, что указанный пептид не может «стыковаться» с молекулами МНС класса I без процессирования) опухолеассоциированного антигена (ТАА) меланомы мелан-А HLA-A2+ дендритными клетками TCR-специфическим Т-клеткам, которые специфично распознают комплексы HLA-A2/мелан-А. Для оценки перекрестной презентации антигена использовали два разных вида TCR-специфических Т-клеток. Первый представлял собой клон Т-лимфоцитов от пациента с меланомой, специфичный в отношении этих комплексов HLA-A2/мелан-А (любезный подарок доктора Н. Лабаррьера (N. Labarrière), Нантский университет, Франция, Vignard et al., J. Immunol 2005). Второй клон представлял собой

трансгенную линию клеток тимомы мыши, трансдуцированную TCR клона Т-клеток этого же пациента с меланомой и трансфицированную корцептором CD8 человека. ДК получали *in vitro* из моноцитов крови HLA-A2+ здоровых добровольцев (ЗД; добровольцы из Etablissement Français de Sang, Нант). Одновременно фенотипировали моноциты по полиморфизму SIRPa. После культивации в течение 7 дней совместно с GM-CSF и IL-4 индуцировали незрелые ДК (нДК). Затем нДК нагружали в течение ночи длинным 25-мерным пептидом мелан-А в присутствии антагонистических антител, нацеленных на путь SIRPa/CD47, и, наконец, независимо культивировали совместно с двумя различными мелан-А/HLA-A2-специфическими клонами Т-клеток. Клон Т-клеток человека от пациента с меланомой культивировали совместно с нДК, нагруженными меланом-А, в течение 5 часов и оценивали активацию Т-клеток путем проточной цитометрии посредством внутриклеточного окрашивания IFNg.

TCR-трансгенный клон тимомы культивировали совместно с нДК, нагруженными меланом-А, в течение 48 часов и оценивали активацию Т-клеток путем ELISA-анализа секреции IL-2.

Для валидации протокола в качестве отрицательного контроля использовали нДК, нагруженные меланом-А, от HLA-A2-отрицательных доноров, а также ненагруженные нДК от HLA-A2+ здоровых добровольцев. Результаты (не представлены) показали, что только HLA-A2+ нагруженные меланом-А нДК были способны индуцировать секрецию IFNg клонами Т-клеток человека. Секрецию IL-2 клетками тимомы мыши измеряли только у HLA-A2-положительных доноров и сравнивали с HLA-A2- ДК, нагруженными меланом-А (данные не представлены), с демонстрацией специфичности двух различных HLA-A2/мелан А-специфических клонов Т-клеток.

Определяли фенотип моноцитов от HLA-A2+ здоровых добровольцев по SIRPa, и в 2 разных эксперимента включали как V1-гомозиготные, так и V1/v2-гетерозиготные моноциты.

**КЛОН КЛЕТОК ТИМОМЫ, ИСКУССТВЕННО СКОНСТРУИРОВАННЫЙ *IN VITRO*:** после 48 часов стимуляции TCR-трансгенного клона клеток тимомы нДК человека, нагруженными меланом-А, измеряли секрецию IL-2. При этом первом считывании перекрестной презентации антигена авторы настоящего изобретения наблюдали увеличение секреции IL-2 клоном тимомы у большинства доноров, когда SIRPa блокировало специфическое антитело анти-SIRPa (собственное антитело к SIRPa v1 человека) во время загрузки мелан-А и анализа стимуляции (**Фиг.6А**). Не наблюдали различия между V1-гомозиготными и V1/V2-гетерозиготными донорами ДК.



**КЛОН Т-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ОТ ПАЦИЕНТА С МЕЛАНОМОЙ:** после 5 часов стимуляции клонов CD8 Т-клеток человека нДК человека, нагруженными меланом-А, оценивали экспрессию IFNg путем проточной цитометрии. На Фиг.6В представлена экспрессия IFNg в CD8+ Т-клетках. SIRPa или CD47 блокировали во время загрузки меланом-А и во время стимуляции Т-клеток. Тестировали различные антитела: к SIRPa v1 человека; анти-SIRPa/g (SIRP29), анти-CD47 (B6H16 и CC2C6). На **Фиг.6В** показано, что блокада SIRPa собственным антителом к SIRPa v1 человека приводила к увеличению экспрессии IFNg опухолевый антиген-специфическими Т-клетками человека, индуцированными нДК от гомозиготных или гетерозиготных доноров. Интересно, что авторы настоящего изобретения показали, что положительное влияние блокады SIRPa на презентацию Ag не ограничивалось нДК, гомозиготными по SIRPa v1, поскольку подобное увеличение наблюдали у большинства V1/V2-гетерозиготных доноров. Неожиданно, авторы настоящего изобретения обнаружили, что в отличие от перекрестной презентации у мыши, у человека указанные два mAb анти-CD47 не оказывали положительного влияния на секрецию IFNg у большинства доноров и в худшем случае сильно подавляли базальный уровень активации Т-клеток у большинства доноров. Более удивительно то, что анти-SIRPa, которое не является SIRPa-специфичным, но также связывает SIRPg и ингибирует связывание CD47 с SIRPg, не индуцирует экспрессию IFNg Т-клетками, что указывает на то, что перекрестная презентация незрелыми дендритными клетками Т-клеткам характерно для собственного антитела к SIRPa v1 человека. Необычно то, что добавление неселективного антитела к SIRPa/g к селективному собственному антителу к SIRPa v1 препятствует повышенной секреции IFNg путем селективной блокады SIRP-альфа, а не гамма. Эти результаты, полученные у человека с различными антителами анти-CD47 и антителом анти-SIRPa/g, не были предсказуемыми в отношении результатов в моделях у мышей и могли объяснить некоторые интересные результаты, полученные авторами настоящего изобретения, демонстрирующие, что различные mAb анти-CD47 и анти-SIRPg (Piccio et al., 2005), но не специфическое антитело анти-SIRPa v1 согласно настоящему изобретению, сильно ингибировали пролиферацию поликлональных Т-клеток человека и реакцию смешанных лимфоцитов человека у человека.

## **ВЫВОД**

Два разных клон, используемые для оценки перекрестной презентации антигена, показали схожие результаты по блокаде SIRPa на нДК во время загрузки Ag и презентации Ag Т-клеткам. Авторы настоящего изобретения впервые показали, что SIRPa человека играет ингибирующую роль в перекрестной презентации антигена, измеряемой по секреции IFNg или IL2, которую можно уменьшать посредством селективных mAb анти-SIRPa. Это

не было предсказуемо, поскольку блокада CD47 различными антителами анти-CD47 или неселективным антителом анти-SIRPa/g не оказывала такого влияния на Т-клетки человека, что находит объяснение с учетом предыдущих наблюдений за иммуносупрессивными свойствами mAb анти-CD47 у человека, но не у мыши. Из уровня техники известно, что SIRPa ингибирует созревание ДК мыши. Авторы настоящего изобретения впервые обнаружили, что специфическое антитело анти-SIRPa может представлять собой терапевтическое соединение для усиления перекрестной презентации Ag у человека. Хотя mAb анти-CD47 у мыши обладают схожим усиливающим действием, что и анти-SIRPa мыши, влияние анти-SIRPa человека на перекрестную презентацию ДК человека не было предсказуемым. Понимание авторами настоящего изобретения иммунного механизма, опосредуемого взаимодействием SIRPa-CD47, позволило им предположить, что иммуносупрессивные свойства анти-CD47 у человека обусловлены его взаимодействием с SIRPg, который не экспрессируется у мышей. Удивительно, но генетический статус доноров ДК: гомозиготный или гетерозиготный по SIRPa V1 не демонстрировал никаких различий при активации Т-клеток человека.

### **Пример 3: влияние блокады SIRP/CD47 на поликлональную стимуляцию**

**СПОСОБ:** мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПКч) выделяли из лейкоцитарной пленки здоровых добровольцев. CD4 или CD8 Т-клетки выбирали путем позитивного отбора с использованием AutoMACS (Miltenyi) и высевали в 96-луночный круглодонный планшет (50000 клеток/луночка). Пролиферативные сигналы обеспечивали либо микрогранулы, покрытые анти-CD3/анти-CD28 (Life Technologies) в соотношении 1 гранула на 1 Т-клетку в течение трех дней, либо аллогенные зрелые дендритные клетки, полученные *in vitro*, в соотношении 5 Т-клеток на 1 зрелую дендритную клетку (зДК) в течение 5 дней. Антитела, нацеленные на пути SIRPa/CD47 и/или SIRPg/CD47, добавляли с начала тестирования пролиферации в концентрации насыщения (10 мкг/мл). Пролиферацию измеряли путем включения H<sup>3</sup>-тимидина в течение последних 12 часов культивации. Антитело анти-CD47 (коммерческий справочный номер: B6H12), антитела анти-SIRPa (HEFLB, указанные в патенте (WO2017178653)).

**РЕЗУЛЬТАТЫ:** для исследования иммуносупрессивного действия блокады CD47 на Т-лимфоциты человека МКПК выделяли у 3 разных здоровых добровольцев и часть клеток облучали (35 Гр). Каждого донора (респондер) включали в реакцию смешанных лимфоцитов с каждым из двух остальных доноров (облученные стимуляторы). Блокирующие антитела добавляли в начале реакции смешанных лимфоцитов (MLR) и пролиферацию Т-клеток измеряли путем включения тимидина в последние 16 часов пятидневной культивации. Авторы настоящего изобретения обнаружили сильное

ингибирование пролиферации Т-клеток человека моноклональным антителом анти-CD47, тогда как анти-SIRPa (собственное антитело к SIRPa v1 человека) значительно не отличалось от контрольных условий (Фиг.7). Определяли величину секреции IFNg, которая также отражает активацию Т-клеток, в надосадочной жидкости 4-дневной культуры. Авторы настоящего изобретения наблюдали также резкое ингибирование секреции цитокина моноклональным антителом анти-CD47 (B6H12), что указывает и подтверждает предыдущие результаты, полученные авторами настоящего изобретения и другими группами, что CD47 имеет важное значение для активации Т-клеток у человека.

**Пример 4: влияние антитела анти-SIRPa на поляризацию макрофагов в биоанализе с использованием моноцитов от здоровых доноров: биоанализе, позволяющем измерить выработку хемокинов: MIP-1a/CCL-3 и MIP-1b/CCL-4**

Для исследования влияния собственного антитела к SIRPa v1 человека на поляризацию и активацию макрофагов измеряли секрецию некоторых хемокинов, в частности MIP-1a/CCL-3 и MIP-1b/CCL-4, в надосадочной жидкости свежих или замороженных моноцитов человека, генотипированных как V1-гомозиготные по SIRPa или V1/V2-гетерозиготные, культивированных совместно с GM-CSF для индукции неполяризованных незрелых макрофагов (Фиг.8). Тестировали два источника рекомбинантного CD47-Fc в концентрации 10 мкг/мл: #12283-H02H SinoBiological и #4670-CD-050 R&D systems. Количественное определение MIP-1a/CCL-3 и MIP-1b/CCL4 осуществляли путем ELISA в надосадочных жидкостях культуры (R&D systems: Human CCL3/MIP-1 alpha DuoSet ELISA#DY270 и Human CCL4/MIP-1 beta DuoSet ELISA#DY271). В целом, результаты показали, что в присутствии покрытого CD47-Fc, собственного антитела к SIRPa v1 человека значительно увеличивалась секреция MIP-1a и MIP-1b как у гомозиготных по V1 SIRPa (Фиг.8А), так и гетерозиготных (генотип V1/ 2) доноров (Фиг.8В).

**ВЫВОД**

Авторы настоящего изобретения определили, что секрецию M1-связанных хемокинов MIP-1a/CCL-3 и MIP-1b/CCL-4 значительно повышало собственное антитело к SIRPa v1 человека в присутствии покрытого рекомбинантного CD47-Fc. CD47-Fc индуцирует функциональную супрессию миелоидных клеток человека, в частности, в соответствии со снижением базальной секреции MIP-1a/CCL-3 и MIP-1b/CCL-4. Блокирование взаимодействия SIRPa-CD47 антителом анти-SIRPa восстанавливает функцию миелоидных клеток, на что указывает секреция MIP-1a и MIP-1b в надосадочной жидкости. Генотип доноров касательно экспрессии аллеля SIRPa V1 не влияет на индукцию

этих хемокинов, что позволяет предположить пороговый эффект в отношении блокады SIRPa для наблюдения функционального эффекта.

**Пример 5: анализ связывания SIRPa на v2/v2-моноцитах человека путем цитофлуориметрии**

СПОСОБ: для измерения связывания антител анти-SIRPa на моноцитах человека сначала добавляли ингибитор связывания рецептора Fc человека (BD pharmingen; США; справочный номер 564220) в течение 30 минут при комнатной температуре с блокированием рецепторов Fc человека на моноцитах человека для уменьшения фона. Затем антитело инкубировали в течение 30 минут при 4°C и промывали перед окрашиванием в течение 30 минут при 4°C PE-меченым антителом к Fc IgG человека (Biolegend; США; справочный номер 409303). Для антител мыши использовали PE-меченое антитело к igG мыши (Jackson immunoresearch; справочный номер 715-116-151). Образцы анализировали на цитофлуориметре BD LSRII или Canto II.

РЕЗУЛЬТАТЫ: как показано на **Фиг.9**, результаты указывают на связывание антитела SIRP29 и химерного антитела 18D5 исходного антитела согласно настоящему изобретению на SIRPa v2/v2-моноцитах человека и отсутствие связывания для всех гуманизированных антител анти-SIRPa (как измерено с помощью MFI (средняя интенсивность флуоресценции), что указывает на то, что гуманизация антител индуцирует утрату специфичности в отношении SIRPa v2.

**Пример 6: конкурентный анализ влияния антител анти-SIRPa на взаимодействие CD47-SIRPg методом Blitz**

СПОСОБ: этот анализ выполняли с помощью Blitz (Forté Bio; США; справочный номер C22-2 No 61010-1). На первом этапе hSIRPg-His (Sino Biologicals, Пекин, Китай; справочный номер 11828-H08H) иммобилизовали в концентрации 10 мкг/мл гистиридиновым «хвостом» на биосенсоре Ni-NTA (Forté Bio; США; справочный номер 18-0029) в течение 30 секунд. На втором этапе добавляли антитело в концентрации 20 мкг/мл (концентрация насыщения) в течение 120 секунд. Затем осуществляли ассоциацию CD47Fc человека (Sino Biologicals, Пекин, Китай; справочный номер 12283-H02H) в концентрации 100 мкг/мл при конкуренции с различными антителами в течение 120 секунд (антитела LSB2.20, Kwar или SIRP29). Диссоциацию CD47Fc проводили в буфере для кинетического анализа в течение 120 секунд. Данные анализа получали с помощью программного обеспечения Blitz pro 1.2, которое рассчитывало константу ассоциации ( $k_a$ ) и константу диссоциации ( $k_d$ ), и определяло константу аффинности KD ( $k_a/k_d$ ).

РЕЗУЛЬТАТЫ: как показано на **Фиг.10**, в нормальных условиях аффинность CD47 к SIRPg составляет около  $6,10^{-8}$  M, Kwar23 и SIRP29 значительно уменьшают связывание

CD47 с SIRP<sub>g</sub>, тогда как LSB2.20, коммерческое антитело анти-SIRP<sub>g</sub>, не нарушает взаимодействие CD47-SIRP<sub>g</sub>. Эти результаты подчеркивают специфичность собственного антитела анти-SIRP<sub>a</sub> v1 согласно настоящему изобретению в отношении SIRP<sub>a</sub> по сравнению с антителами уровня техники.

#### **Пример 7: доклиническая модель рака молочной железы 4T1: модель метастазов**

Эту ортотопическую и сингенную доклиническую модель 4T1 использовали для оценки эффекта двух различных видов специфической монотерапии, направленной против SIRP<sub>a</sub> мышей, в модели, в которой инфильтрация миелоидными клетками имеет важное значение и хорошо описана. Действительно, ранее сообщали, что модель 4T1 преимущественно инфильтрирована CD11b<sup>+</sup> миелоидными клетками (DuPré et al., 2007), в частности СКМП (Markowitz et al., 2013).

Известно, что эта модель индуцирует метастазирование. Поэтому авторы настоящего изобретения забирали печень и легкие и подсчитывали метастазы у мышей, которые получали или не получали лечение антителами мыши анти-SIRP<sub>a</sub>. Изотипический контроль и антитела анти-SIRP<sub>a</sub> использовали в количестве 8 мг/кг с 4 дня по 28 день (3 раза/неделя). Блокада SIRP<sub>a</sub> двумя разными антителами, специфично нацеленными на SIRP<sub>a</sub> (и нарушающими связывание CD47 с SIRP<sub>a</sub>), продемонстрировала мощный клинический эффект при монотерапии в отношении развития опухоли в агрессивной модели трижды негативного рака молочной железы (TNBC). Авторы настоящего изобретения также анализировали метастазы в легких и печени после умерщвления путем сравнения суррогатов P84 (ссылка: MABS164, антитело анти-SHPS-1, клон P84 от Merck Millipore) и MY1-mG1 (описанный в Yanagita et al.). У контрольных мышей развивались метастазы в легких, тогда как у мышей, получавших лечение MY1-mG1 или P84, этого не происходило. На Фиг.11 представлены результаты по метастазам в легких для mAb анти-SIRP<sub>a</sub>: P84 и MY-1, оба из которых демонстрировали одинаковую эффективность в отношении метастазов в легких.

Эти результаты в модели у мышей, которая не экспрессирует SIRP<sub>g</sub> на своих клетках, подчеркивают важное значение специфичного направленного воздействия на SIRP<sub>a</sub> для применения при раке и, в частности, для лечения или предотвращения метастазов. У человека, клетки которого экспрессируют SIRP<sub>g</sub>, будет подходящим специфичное направленное воздействие на SIRP<sub>a</sub> без нарушения при этом взаимодействия CD47-SIRP<sub>g</sub>, например, антителами согласно настоящему изобретению.

#### **Ссылки**

- Chang, Y., and Moore, P.S. (2012). Merkel Cell Carcinoma: A Virus-Induced Human Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 7, 123–144.
- DuPré, S.A., Redelman, D., and Hunter, K.W. (2007). The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *Int. J. Exp. Pathol.* 88, 351–360.
- Haan, J.M.M. den, Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). Cd8<sup>+</sup> but Not Cd8<sup>-</sup> Dendritic Cells Cross-Prime Cytotoxic T Cells in Vivo. *J. Exp. Med.* 192, 1685–1696.
- Hassan, R., Thomas, A., Alewine, C., Le, D.T., Jaffee, E.M., and Pastan, I. (2016). Mesothelin Immunotherapy for Cancer: Ready for Prime Time? *J. Clin. Oncol.* 34, 4171–4179.
- Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., and O’Keeffe, M. (2001). Differential production of IL-12, IFN- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  by mouse dendritic cell subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 5448–5455.
- Liao, J.B. (2006). Viruses and Human Cancer. *Yale J. Biol. Med.* 79, 115–122.
- Liu, Q., Wen, W., Tang, L., Qin, C.-J., Lin, Y., Zhang, H.-L., Wu, H., Ashton, C., Wu, H.-P., Ding, J., et al. (2016). Inhibition of SIRP $\alpha$  in dendritic cells potentiates potent antitumor immunity. *OncoImmunology* 5, e1183850.
- Liu, X., Pu, Y., Cron, K., Deng, L., Kline, J., Frazier, W.A., Xu, H., Peng, H., Fu, Y.-X., and Xu, M.M. (2015). CD47 blockade triggers T cell-mediated destruction of immunogenic tumors. *Nat. Med. advance online publication*.
- Markowitz, J., Wesolowski, R., Papenfuss, T., Brooks, T.R., and Carson, W.E. (2013). Myeloid Derived Suppressor Cells in Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 140, 13–21.
- Piccio, L., Vermi, W., Boles, K.S., Fuchs, A., Strader, C.A., Facchetti, F., Cella, M., and Colonna, M. (2005). Adhesion of human T cells to antigen-presenting cells through SIRP $\beta$ 2-CD47 interaction costimulates T-cell proliferation. *Blood* 105, 2421–2427.
- Takenaka, K., Prasolava, T.K., Wang, J.C.Y., Mortin-Toth, S.M., Khalouei, S., Gan, O.I., Dick, J.E., and Danska, J.S. (2007). Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat. Immunol.* 8, 1313–1323.
- Xu, M.M., Pu, Y., Han, D., Shi, Y., Cao, X., Liang, H., Chen, X., Li, X.-D., Deng, L., Chen, Z.J., et al. (2017). Dendritic Cells but Not Macrophages Sense Tumor Mitochondrial DNA for Cross-priming through Signal Regulatory Protein  $\alpha$  Signaling. *Immunity* 47, 363–373.e5.
- Yanagita, T., Murata, Y., Tanaka, D., Motegi, S., Arai, E., Daniwijaya, E.W., Hazama, D., Washio, K., Saito, Y., Kotani, T., et al. Anti-SIRP $\alpha$  antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy. *JCI Insight* 2.
- Zong, J., Keskinov, A.A., Shurin, G.V., and Shurin, M.R. (2016). Tumor-derived factors modulating dendritic cell function. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 65, 821–833.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к SIRPa человека, антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела или указанное антитело, которое является модифицированным, содержащие:

(a) переменный домен тяжелой цепи, содержащий определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), HCDR2 и HCDR3,

где:

HCDR1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 9,

HCDR2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 10 или SEQ ID No: 11,

HCDR3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 12 или SEQ ID No: 13, или SEQ ID No: 14, или SEQ ID No: 15;

и

(b) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID No: 16 или SEQ ID No: 17,

для применения в лечении или предотвращении заболевания, в частности рака, или для применения в терапевтической вакцинации против заболевания, в частности против рака, при этом указанное антитело, антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела или указанное антитело, которое является модифицированным, усиливают перекрестную презентацию антигена, экспрессируемого при указанном заболевании, в частности при указанном раке, и вовлечены в индукцию Т-клеточного ответа, подходящего для лечения указанного заболевания.

2. Антитело к SIRPa человека, или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, или указанное антитело, которое является модифицированным, для применения по п. 1, которые:

- специфично связываются с вариантом-1 SIRPa (SIRPa v1) человека и ингибируют связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека, не предотвращают или не ингибируют связывание CD47 человека с SIRPg человека; и, в частности, не связываются специфично с SIRPg человека.

3. Антитело к SIRPa человека, или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, или указанное антитело, которое является модифицированным, содержащие:

a) переменный домен тяжелой цепи, содержащий HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

где:

HCDR1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 9,  
HCDR2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 10 или  
SEQ ID No: 11,

HCDR3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 12 или  
SEQ ID No: 13, или SEQ ID No: 14, или SEQ ID No: 15;

и

b) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность  
SEQ ID No: 16 или SEQ ID No: 17;

при этом указанное антитело к SIRPa человека, или антигенсвязывающий фрагмент  
указанного антитела, или антигенсвязывающий миметик антитела ингибируют связывание  
CD47 человека с SIRPa v1 человека и не предотвращают или не ингибируют связывание  
CD47 человека с вариантом-2 SIRPa (SIRPa v2) человека;

для применения в предотвращении и/или лечении заболевания у субъекта, который  
является SIRPa v1-положительным.

**4.** Антитело к SIRPa человека, или антигенсвязывающий фрагмент указанного  
антитела, или указанное антитело, которое является модифицированным, для применения  
по любому из пп. 1-3,

отличающиеся тем, что указанный переменный домен тяжелой цепи содержит или  
состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 18 или SEQ ID No: 19; или SEQ  
ID No: 20; или SEQ ID No: 21; или SEQ ID No: 22; или SEQ ID No: 23; в частности,  
указанный переменный домен тяжелой цепи содержит или состоит из аминокислотной  
последовательности SEQ ID No: 20;

при этом указанный переменный домен легкой цепи содержит или состоит из  
аминокислотной последовательности SEQ ID No: 17.

**5.** Антитело к SIRPa человека, или антигенсвязывающий фрагмент указанного  
антитела, или указанное антитело, которое является модифицированным, для применения  
по любому из пп. 1-4, при этом указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из  
рака, в частности воспалительного рака и рака с инфильтрацией миелоидными клетками, в  
частности с инфильтрацией дендритными клетками и/или супрессорными клетками  
миелоидного происхождения (СКМП), и/или опухолеассоциированными макрофагами  
(ОАМ), метастаза рака, в частности метастаза рака молочной железы, меланомы, или тем,  
что применение по п. 1 или п. 4 предназначено для терапевтической вакцинации против



одного из указанных заболеваний, в частности для терапевтической вакцинации против меланомы.

6. Антитело к SIRPa человека, или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, или указанное антитело, которое является модифицированным, для применения по любому из пп. 1-5, обладающие следующими свойствами:

- не связывается специфично с SIRPa v2 человека; и
- не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPg человека; в частности не связывается специфично с SIRPg человека; и
- связывается с SIRPa v1 человека с аффинностью, составляющей по меньшей мере  $10E-9$  M; и
- усиливает перекрестную презентацию по меньшей мере одного антигена антигенпрезентирующими клетками в отношении Т-клеток человека, в частности дендритными клетками, в частности в отношении CD8<sup>+</sup> Т-клеток человека;

и необязательно по меньшей мере одним из следующих свойств:

- не ингибирует активацию и/или пролиферацию Т-клеток человека *in vivo*; и/или
- усиливает активацию макрофагов.

7. Антитело к SIRPa человека, или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, или указанное антитело, которое является модифицированным, для применения по любому из пп. 1-6, отличающиеся тем, что указанное заболевание представляет собой рак, и у указанного субъекта экспрессируется или детектирован по меньшей мере один антиген, выбранный из группы, состоящей из антигенов вируса папилломы человека, вируса Эпштейна-Барр, полиомавируса клеток Меркеля, вируса иммунодефицита человека, вируса Т-клеточного лейкоза человека, вируса герпеса человека-8, вируса гепатита В, вируса гепатита С, HCV, корового антигена вируса гепатита В (HBC), цитомегаловируса, или из группы антигенов с единичной точечной мутацией, происходящих из группы, состоящей из антигенов гена *ctnnb1*, гена *casp8*, гена *her2*, гена *p53*, гена *kras*, гена *ngas*, или опухолевых антигенов, в частности опухолевых антигенов, полученных или происходящих из группы, состоящей из онкогена *gas*, опухолевых антигенов BCR-ABL, опухолевых антигенов ETV6-AML1, генов, кодирующих антиген меланомы (MAGE), антигенов BAGE, антигенов GAGE, антигенов *ssx*, антигенов *pu-eso-1*, опухолевых антигенов циклина-A1, антигена MART-1, антигена *gp100*, антигена CD19, простат-специфического антигена, антигена простатической кислой фосфатазы, раково-эмбрионального антигена, антигена

альфафетопротеина, антигена карциномы 125, антигена муцина 16, антигена муцина 1, антигена обратной транскриптазы теломеразы человека, антигена EGFR, антигена МОК, антигена RAGE-1, антигена PRAME, антигена p53 дикого типа, антигена онкогена ERBB2, опухолевого антигена сиалил-Tn, антигена опухоли Вильмса 1, антигена мезотелина, углеводных антигенов, антигена В-катенина, антигена MUM-1, антигена CDK4 и антигена ERBB2IP, в частности опухолеассоциированного антигена (ТАА) меланомы мелана-А.

**8.** Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела или указанное антитело, которое является модифицированным, для применения по любому из пп. 1-7 и дополнительно содержащая по меньшей мере один фармацевтический носитель.

**9.** Применение полипептида, в частности применение антигена, содержащего или состоящего из эпитопа SIRPa v1 человека, состоящего из SEQ ID No: 1; SEQ ID No: 4 или SEQ ID No: 25, в получении или в выборе антитела к SIRPa v1 человека или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела, или антигенсвязывающего миметика антитела, или указанного антитела, которое является модифицированным, которые специфично связываются с SIRPa v1 человека и которые ингибируют связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека, и которые не предотвращают или не ингибируют связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека и с SIRPg человека, в частности которые усиливают перекрестную презентацию антигена антигенпрезентирующими клетками, в частности дендритными клетками, Т-клеткам человека, в частности CD8+ Т-клеткам.

**10.** Способ получения антитела к SIRPa v1 человека, при этом указанный способ включает иммунизацию животного, не являющегося человеком, в частности млекопитающего, не являющегося человеком, по меньшей мере одним антигеном, определенным по п. 9, или по меньшей мере одним антигеном, содержащим или состоящим из эпитопа SIRPa v1 человека, состоящего из SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 4 или SEQ ID No: 25; и, в частности, сбор полученной сыворотки или В-клеток от указанного иммунизированного животного, не являющегося человеком, для получения антител, направленных против указанного антигена.

**11.** Применение по п. 9 или способ по п. 10, дополнительно включающие этап выбора и выделения антитела к SIRPa v1 человека, при этом указанный этап выбора включает по меньшей мере один из следующих этапов:

- a. тестирование связывающей способности указанного антитела с SIRPa v1 человека, в частности связывающей способности указанного антитела с антигеном, перечисленным в п. 7; и/или
- b. тестирование способности указанного антитела уменьшать или ингибировать связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека; и/или
- c. тестирование способности указанного антитела предотвращать или ингибировать связывание CD47 человека с SIRPa v2 человека и/или
- d. тестирование способности указанного антитела предотвращать или ингибировать связывание CD47 человека с SIRPg человека;

и необязательно:

- e. тестирование способности указанного антитела связываться с аминокислотными остатками D и V, расположенными в положениях 130 и 132, соответственно, последовательности SIRPa SEQ ID No: 3; или расположенными в положениях 100 и 102, соответственно, последовательности SIRPa SEQ ID No: 24;
- f. тестирование связывающей способности указанного антитела с SIRPa v2 человека; и/или
- g. тестирование связывающей способности указанного антитела с SIRPg человека;

и при этом указанное выделенное антитело обладает следующими свойствами:

1. оно специфично связывается с SIRPa v1 человека;
2. оно уменьшает или ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека; и
3. оно не уменьшает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRPg человека;

и необязательно по меньшей мере одним из следующих свойств:

4. оно связывается с SIRPa v1 человека с аффинностью, составляющей по меньшей мере  $10E-9$  M; и/или
5. оно связывается с аминокислотными остатками D и V, расположенными в положениях 130 и 132, соответственно, последовательности SIRPa SEQ ID No: 3; или расположенными в положениях 100 и 102, соответственно, последовательности SIRPa SEQ ID No: 24; и/или
6. оно не связывается специфично с SIRPg человека; и/или
7. оно не связывается специфично с SIRPa v2 человека.

**12.** Применение по п. 9 или способ по п. 10 или п. 11, отличающиеся тем, что полученные антитела специфично связываются с SIRPa v1 человека с аффинностью, составляющей по меньшей мере  $1E-9$  M, и не связываются специфично с SIRPa v2 человека, в частности, при этом указанное выделенное антитело к SIRPa v1 человека является антагонистом связывания CD47 человека с SIRPa v1 человека.

**13.** Способ *in vitro* или *ex vivo* для оценки вероятности эффективности лечения антителом к SIRPa человека, или антигенсвязывающим фрагментом указанного антитела, или антигенсвязывающим миметиком антитела, или указанным антителом, которое является модифицированным, у субъекта, представляющего собой человека, в частности, при этом антитело к SIRPa v1 человека или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, или антигенсвязывающий миметик антитела, или антитело, которое является модифицированным, предназначены для введения субъекту, представляющему собой человека, при этом указанный способ включает определение наличия SIRPa v1 в биологическом образце, ранее полученном от указанного субъекта, при этом указанный SIRPa v1, в частности, детектируют антителом к SIRPa v1 человека, определенным по любому из пп. 1-7, композицией по п. 8 или полученным, как определено по п. 9, или соединением, выбранным по п. 10 или п. 11, и при этом присутствие SIRPa v1 в указанном биологическом образце указывает на то, что лечение, вероятно, будет эффективным.

**14.** Способ *in vitro* или *ex vivo* для оценки вероятности эффективности лечения антителом к SIRPa человека или антигенсвязывающим фрагментом указанного антитела, или антигенсвязывающим миметиком антитела, или указанным антителом, которое является модифицированным, у субъекта, представляющего собой человека, в частности, при этом антитело к SIRPa v1 человека или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, или антигенсвязывающий миметик антитела, или указанное антитело, которое является модифицированным, предназначено для введения субъекту, представляющему собой человека, при этом указанный способ включает определение аллелей SIRPa у указанного субъекта, в частности определение содержит ли по меньшей мере один из аллелей SIRPa у указанного субъекта нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотные остатки SEQ ID No: 1 или SEQ ID No: 4, или SEQ ID No: 25, и при этом присутствие нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотные остатки SEQ ID No: 1 или SEQ ID No: 4, или SEQ ID No: 25 в аллеле SIRPa в биологическом образце, ранее полученном от указанного субъекта, указывает на то, что лечение, вероятно, будет эффективным; в частности, определение аллелей SIRPa осуществляют в указанном биологическом образце

посредством полимеразной цепной реакции с использованием праймеров, подходящих для амплификации части гена SIRPa или транскрипта SIRPa, содержащей однонуклеотидный полиморфизм (SNP) 15 и SNP 16 SIRPa человека или содержащей SNP 17 SIRPa человека, и/или части, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотные остатки DDV в SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 4 или SEQ ID No: 25.

**15. Комбинация соединений, содержащая:**

- (i) антитело, антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела или указанное антитело, которое является модифицированным, определенное по любому из пп. 1-7; и/или композицию по п. 8; и
- (ii) по меньшей мере один антиген, выбранный из группы, состоящей из антигенов вируса папилломы человека, вируса Эпштейна-Барр, полиомавируса клеток Меркеля, вируса иммунодефицита человека, вируса Т-клеточного лейкоза человека, вируса герпеса человека-8, вируса гепатита В, вируса гепатита С, HCV, корового антигена вируса гепатита В (HBC), цитомегаловируса, или из группы антигенов с единичной точечной мутацией, происходящих из группы, состоящей из антигенов гена *ctnnb1*, гена *casp8*, гена *her2*, гена *p53*, гена *kras*, гена *ng2*, или опухолевых антигенов, в частности опухолевых антигенов, полученных или происходящих из группы, состоящей из онкогена *ras*, опухолевых антигенов BCR-ABL, опухолевых антигенов ETV6-AML1, генов, кодирующих антиген меланомы (MAGE), антигенов BAGE, антигенов GAGE, антигенов *ssx*, антигенов *pu-eso-1*, опухолевых антигенов циклина-A1, антигена MART-1, антигена *gp100*, антигена CD19, простат-специфического антигена, антигена простатической кислой фосфатазы, раково-эмбрионального антигена, антигена альфафетопротейна, антигена карциномы 125, антигена муцина 16, антигена муцина 1, антигена обратной транскриптазы теломеразы человека, антигена EGFR, антигена MOK, антигена RAGE-1, антигена PRAME, антигена *p53* дикого типа, антигена онкогена ERBB2, опухолевого антигена сиалил-Tn, антигена опухоли Вильмса 1, антигена мезотелина, углеводных антигенов, антигена В-катенина, антигена MUM-1, антигена CDK4 и антигена ERBB2IP, в частности опухолеассоциированного антигена (ТАА) меланомы мелана-А, или любого конкретного мутированного антигена (неоантигена или неоэпитопа);

для применения в лечении или предотвращении заболевания, в частности рака, или для применения в терапевтической вакцинации против заболевания, в частности против рака, при этом указанное антитело, антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, антигенсвязывающий миметик антитела или указанное антитело, которое является

модифицированным, усиливают перекрестную презентацию антигена, экспрессируемого при указанном заболевании, в частности при раке, и вовлечены в индукцию Т-клеточного ответа, подходящего для лечения указанного заболевания, в частности для лечения заболевания у SIRPa v1-положительного субъекта, в частности для лечения или предотвращения заболевания, при котором происходит сверхэкспрессия CD47.

**16.** Комбинация соединений, содержащая:

- (i) антитело, антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, антигенсвязывающий миметик антитела или указанное антитело, которое является модифицированным, определенное по любому из пп. 1-7; и/или композицию по п. 8; и
- (ii) по меньшей мере один второй терапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из химиотерапевтических агентов, радиотерапевтических агентов, иммунотерапевтических агентов, агентов клеточной терапии, антибиотиков и пробиотиков, в частности иммунотерапевтических агентов, выбранных из группы, состоящей из блокатора контрольных точек или активатора клеток приобретенного иммунитета, в частности выбранного из группы, состоящей из анти-PDL1, анти-PD1, анти-CTLA4, анти-CD137, анти-CD2, анти-CD28, анти-CD40, анти-HVEM, анти-BTLA, анти-CD160, анти-TIGIT, анти-TIM-1/3, анти-LAG-3, анти-2B4, анти-VISTA, анти-OX40, анти-CD40 агониста, CD40-L, агонистов TLR, анти-ICOS, ICOS-L, агониста STING, ингибитора IDO, агонистов онколитических вирусов и В-клеточных рецепторов;

для применения в лечении или предотвращении заболевания, в частности рака, или для применения в терапевтической вакцинации против заболевания, в частности против рака, в частности у SIRPa v1-положительного субъекта, в частности для лечения или предотвращения заболевания, при котором происходит сверхэкспрессия CD47.

**17.** Комбинация соединений для применения по п. 15 или п. 16, отличающаяся тем, что указанная комбинация подходит для индукции иммунного ответа у субъекта, в частности, указанная комбинация индуцирует Т-клеточный ответ, подходящий для лечения заболевания, при этом указанная активация включает (i) активацию Т-клеток, в частности CD8<sup>+</sup> Т-клеток; и/или (ii) усиление перекрестной презентации по меньшей мере одного антигена дендритными клетками в отношении CD8<sup>+</sup> Т-клеток; и/или (iii) усиление поляризации макрофагов, в частности поляризации макрофагов M1; или (i), (ii) и (iii).

**18.** Комбинация соединений для применения по любому из пп. 15-17, отличающаяся тем, что указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из рака, в частности воспалительного рака и рака с инфильтрацией миелоидными клетками, в частности с инфильтрацией дендритными клетками или СКМП и/или клетками ОАМ, инфекционного заболевания, хронического воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, неврологического заболевания, повреждения головного мозга, повреждения нерва, полицитемии, гемохроматоза, травмы, септического шока, хронического инфекционного заболевания, в частности инфекционного заболевания, вызванного *Pseudomonas* и цитомегаловирусом, фиброза, атеросклероза, ожирения, диабета II типа, меланомы и дисфункции трансплантата, в частности, меланомы.

**19.** Способ увеличения перекрестной презентации антигена антигенпрезентирующими клетками, в частности дендритными клетками, Т-клеткам, в частности CD8<sup>+</sup> Т-клеткам, при этом указанный способ включает введение субъекту соединения, выбранного из группы, состоящей из антитела к SIRPa человека или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела, или антигенсвязывающего миметика антитела, или указанного антитела, которое является модифицированным, при этом указанное соединение обладает по меньшей мере следующими свойствами:

1. оно не связывается специфично с SIRPa v2 человека; и
2. оно связывается с SIRPa v1 человека с аффинностью, составляющей по меньшей мере  $1E-9$  M; и
3. оно уменьшает или ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa v1 человека; и
4. оно не предотвращает или не ингибирует связывание CD47 человека с SIRP<sub>g</sub> человека, указанное соединение необязательно обладает по меньшей мере одним из следующих свойств:
  - i) оно не ингибирует пролиферацию Т-клеток; и/или
  - ii) оно не ингибирует активацию Т-клеток; и/или
  - iii) оно усиливает активацию макрофагов.

**20.** Способ увеличения перекрестной презентации антигена по п. 19, отличающийся тем, что указанное вводимое соединение представляет собой антитело к SIRPa человека или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, или антитело, которое является модифицированным, содержащие:

- (a) переменный домен тяжелой цепи, содержащий HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где:

HCDR1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 9,  
HCDR2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 10 или  
SEQ ID No: 11,

HCDR3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No: 12 или  
SEQ ID No: 13, или SEQ ID No: 14, или SEQ ID No: 15;

и

(b) переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность  
SEQ ID No: 16 или SEQ ID No: 17.

**21.** Способ оценки вероятности эффективности лечения антителом к SIRPa v1 человека или антигенсвязывающим фрагментом указанного антитела, или указанным антителом, которое является модифицированным, у субъекта, представляющего собой человека, при этом указанный способ включает:

- определение присутствия SIRPa v1 человека в биологическом образце, ранее полученном от указанного субъекта, представляющего собой человека; и в случае, когда указанный субъект, представляющий собой человека, является SIRPa v1-положительным;
- введение терапевтического количества: антитела к SIRPa или антигенсвязывающего фрагмента указанного антитела, или указанного антитела, которое является модифицированным, определенных по любому из пп. 1-8; или комбинации по любому из пп. 15-18; или соединения, выбранного из соединений по п. 11 или п. 12.

**22.** Способ по п. 21, отличающийся тем, что присутствие SIRPa v1 в указанном биологическом образце указывает на то, что лечение, вероятно, будет эффективным у указанного субъекта, представляющего собой человека.

**23.** Способ по п. 21 или п. 22, отличающийся тем, что указанный субъект, представляющий собой человека, который подлежит лечению, имеет рак или имеет вероятность развития рака.



P78324\_SIRPA\_ЧЕЛОВЕК\_Вариант1  
 SIRPA\_ЧЕЛОВЕК\_Вариант2  
 O00241\_SIRPB\_ЧЕЛОВЕК  
 Q9P1W8\_SIRPG\_ЧЕЛОВЕК

		1	2	3	4	5	6	7	
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAG	EEELQVIQPKSVLVAAGETATLRCTATSL								60
MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAG	EEELQVIQPKSVSVAAGESAILHCTVTSL								60
MPVPASWPHLPSPFLMLTL-LLGRLTGVAG	EDELQVIQPEKSVSVAAGESATLRCAMTSL								59
MPVPASWPHPPGPFLLTL-LLG-LTEVAG	EEELQMIQPEKLLLVTVGKTATLHCTVTSL								58

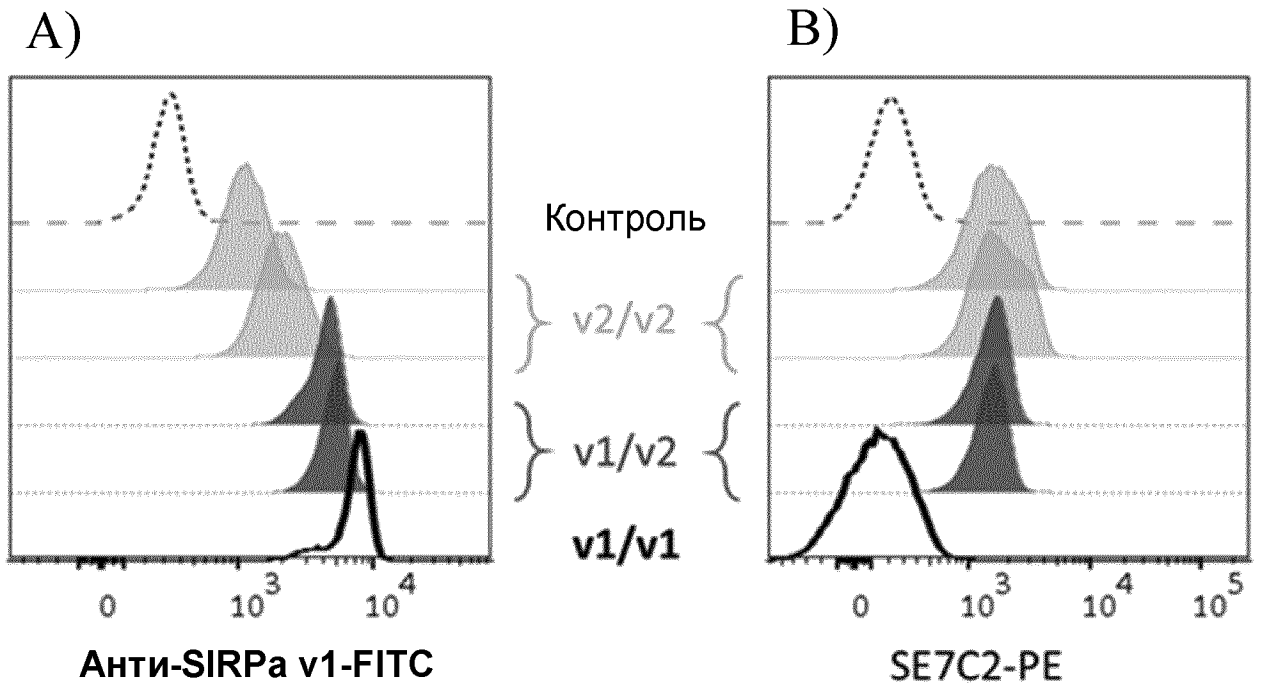
P78324\_SIRPA\_ЧЕЛОВЕК\_Вариант1  
 SIRPA\_ЧЕЛОВЕК\_Вариант2  
 O00241\_SIRPB\_ЧЕЛОВЕК  
 Q9P1W8\_SIRPG\_ЧЕЛОВЕК

		8				9	10	11	12	13		14	?	
		↓				↓	↓	↓	↓	↓		↓	↓	
IPVGP <sup>IQW</sup> FRGAGPGR <sup>EL</sup> LIYNQKEGHFPRVTTVSDLTHRNND <sup>FS</sup> SIRIGNITPADAGTY <sup>Y</sup>														120
IPVGP <sup>IQW</sup> FRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTHRENND <sup>FS</sup> SISISNITPADAGTY <sup>Y</sup>														120
IPVGP <sup>IIMW</sup> FRGAGAGRELIYNQKEGHFPRVTTVSELTRNNLD <sup>FS</sup> SISISNITPADAGTY <sup>Y</sup>														119
LPVGPVLWFRGVGPGR <sup>EL</sup> LIYNQKEGHFPRVTTVSDLTHRNND <sup>FS</sup> SIRISSITPADVGTYY														118

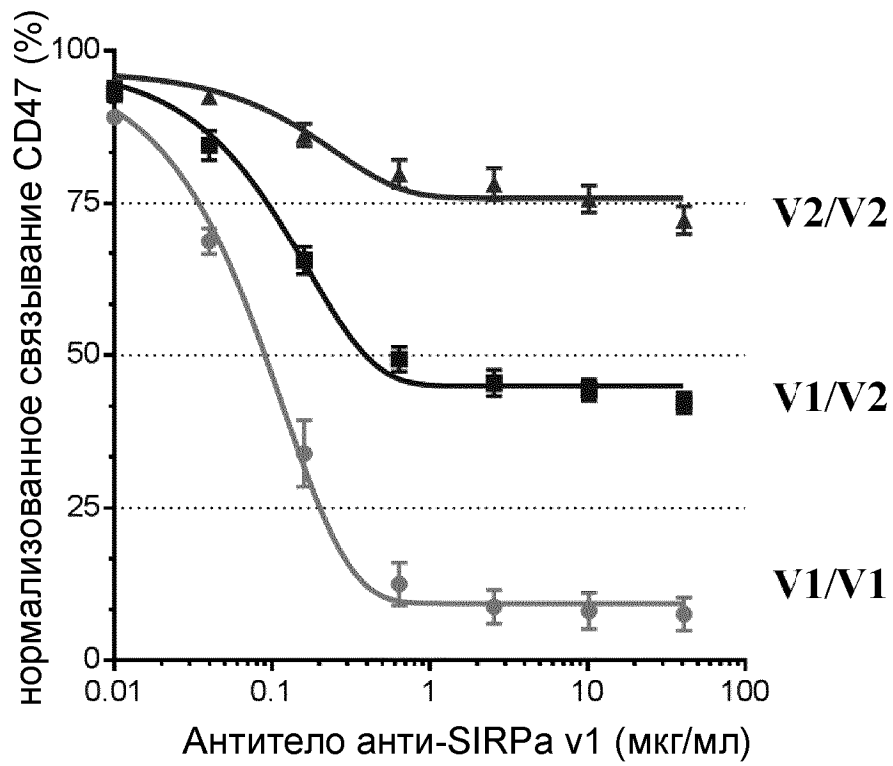
P78324\_SIRPA\_ЧЕЛОВЕК\_Вариант1  
 SIRPA\_ЧЕЛОВЕК\_Вариант2  
 O00241\_SIRPB\_ЧЕЛОВЕК  
 Q9P1W8\_SIRPG\_ЧЕЛОВЕК

		15	16	=	17								
		↓	↓										
CVKFRKGSPDDVEFKSGAGTEL <sup>SV</sup> RAKPSAPVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDI													180
CVKFRKGSPD-TEFKSGAGTEL <sup>SV</sup> RAKPSAPVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDI													179
CVKFRKGSPDDVEFKSGAGTEL <sup>SV</sup> RAKPSAPVVSGPAVRATPEHTVSFTCESHGFSPRDI													179
CVKFRKGSPENVEFKSGPGTEMALGAKPSAPVVLGPAARTTPEHTVSFTCESHGFSPRDI													178

Фигура 1



Фигура 2



Фигура 3

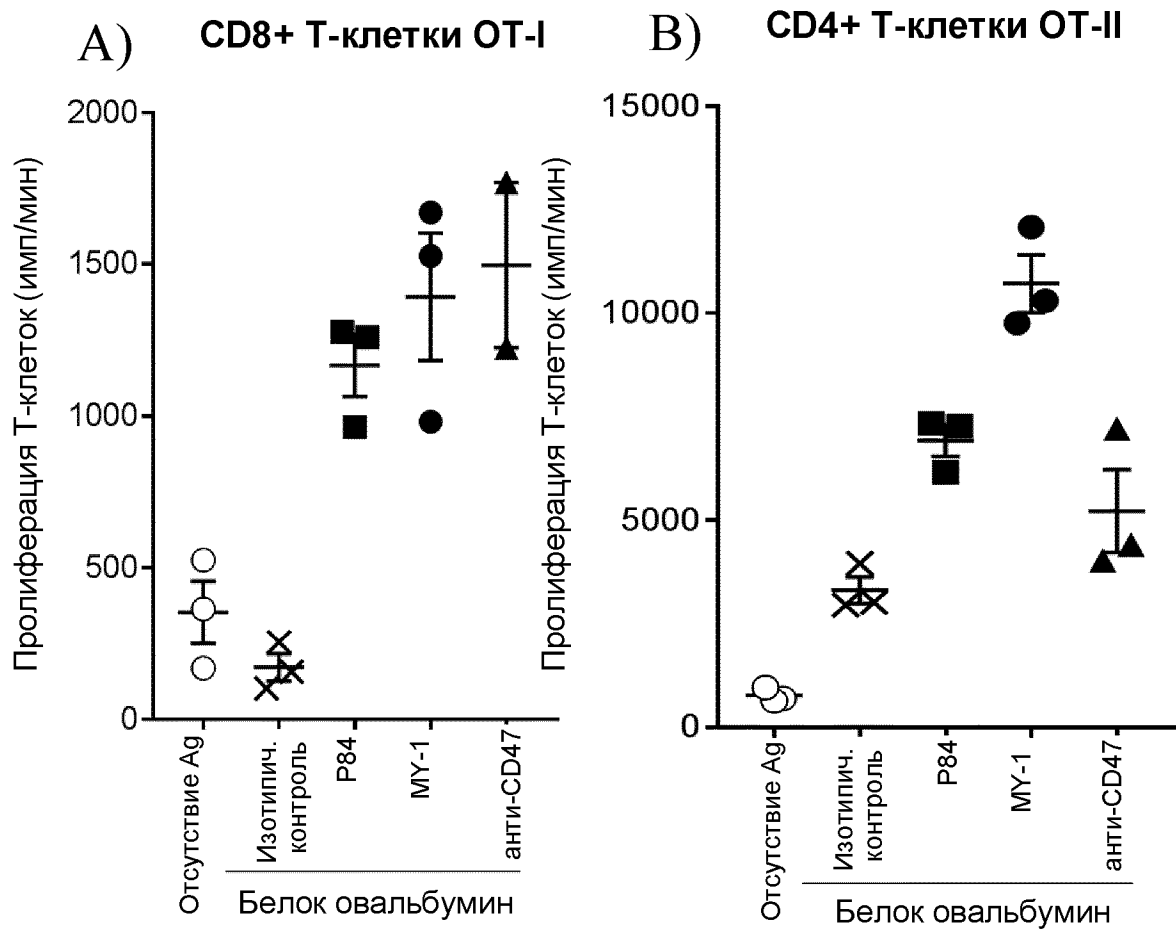
A)

	ED50 (нг/мл)
анти-SIRPa+ SIRPv1	0,78
анти-SIRPa+ SIRPv2	/
анти-SIRPa+ SIRPv3	0,99
анти-SIRPa+ SIRPv4	0,71
анти-SIRPa+ SIRPv5	0,63
анти-SIRPa+ SIRPv6	0,72
анти-SIRPa+ SIRPv7	0,54
анти-SIRPa+ SIRPv8	/
анти-SIRPa + Fc	/

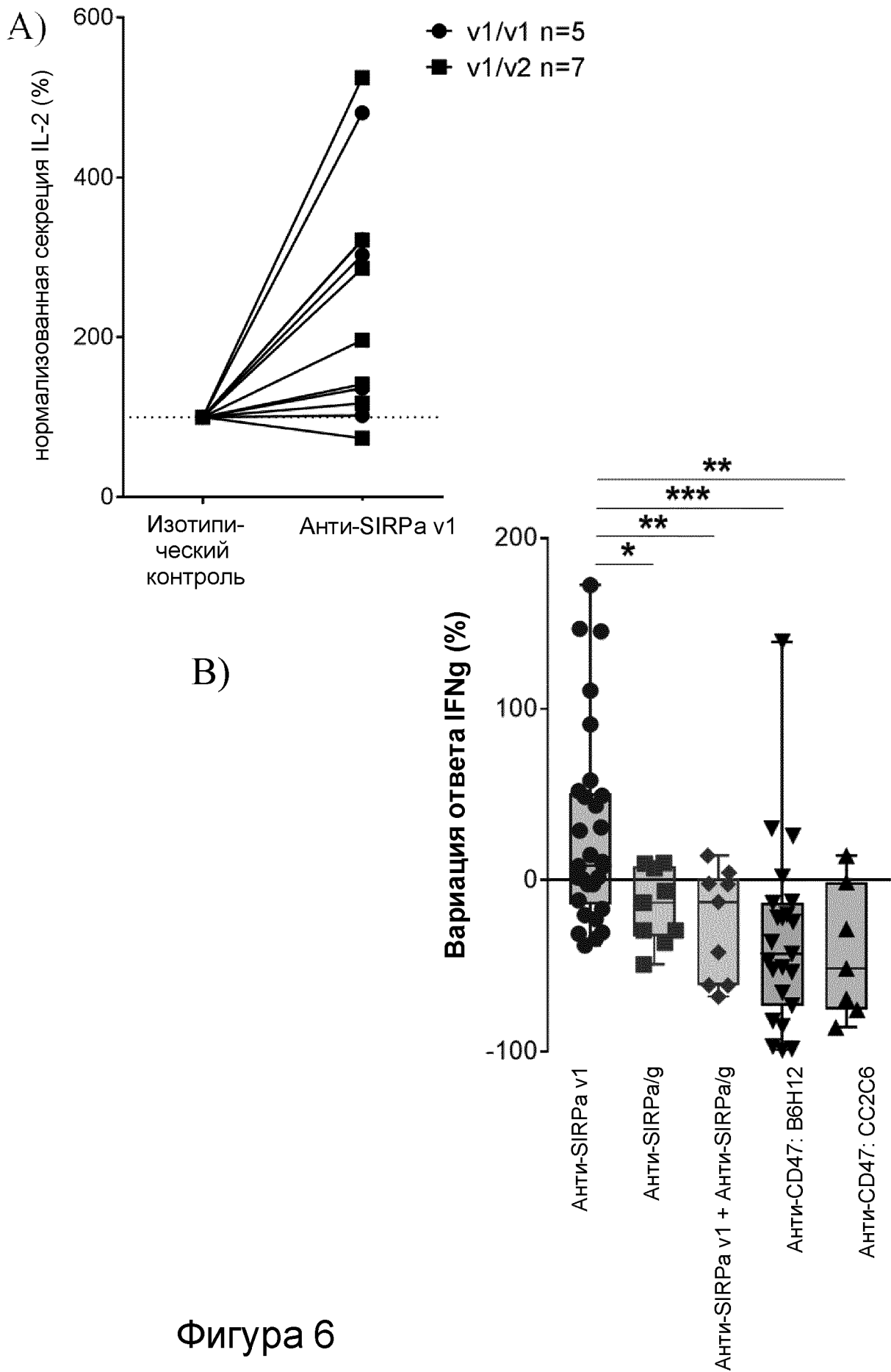
B)

	ED50 (нг/мл)
Kwar23 + SIRPv1	0,77
Kwar23 + SIRPv2	0,77
Kwar23 + SIRPv3	0,77
Kwar23 + SIRPv4	0,74
Kwar23 + SIRPv5	0,78
Kwar23 + SIRPv6	0,75
Kwar23 + SIRPv7	0,60
Kwar23 + SIRPv8	0,93
Kwar23 + Fc	/

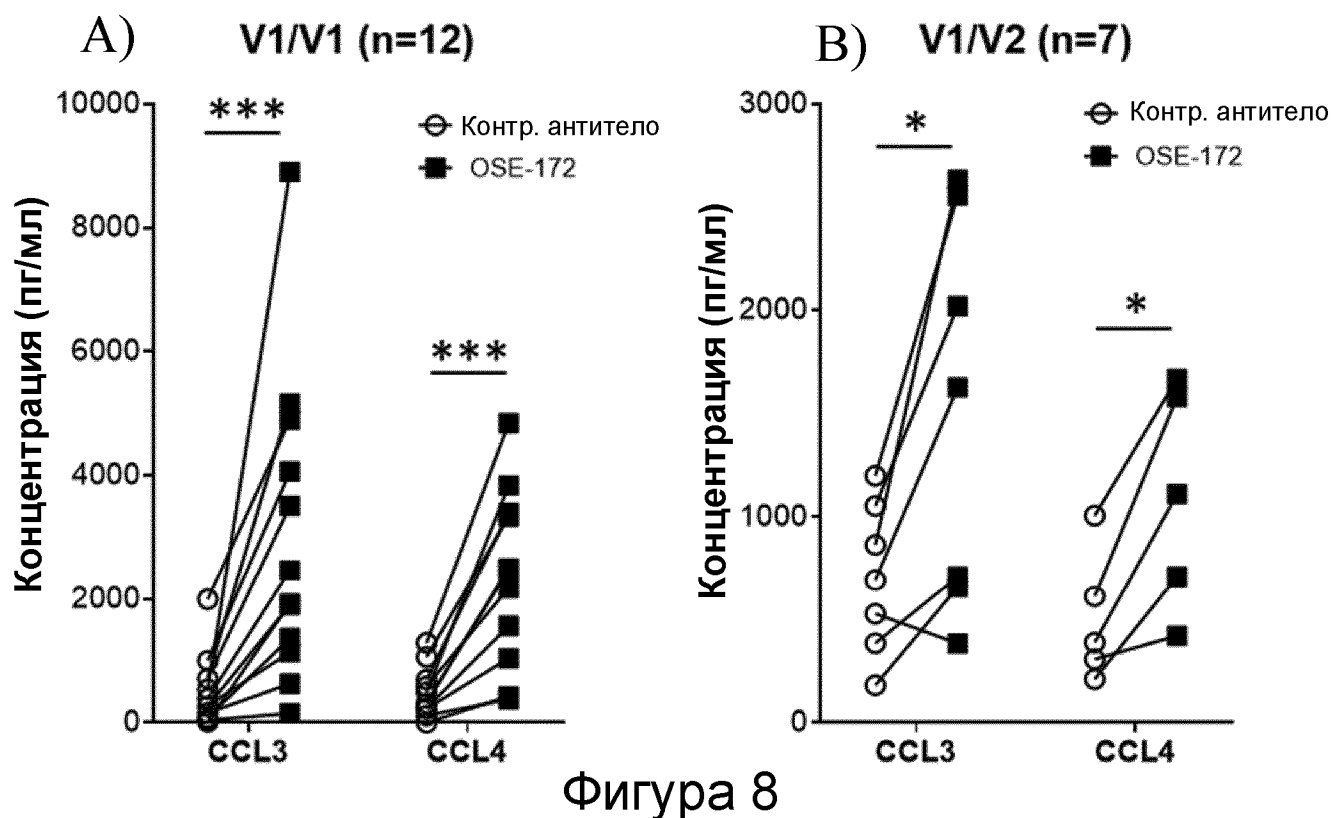
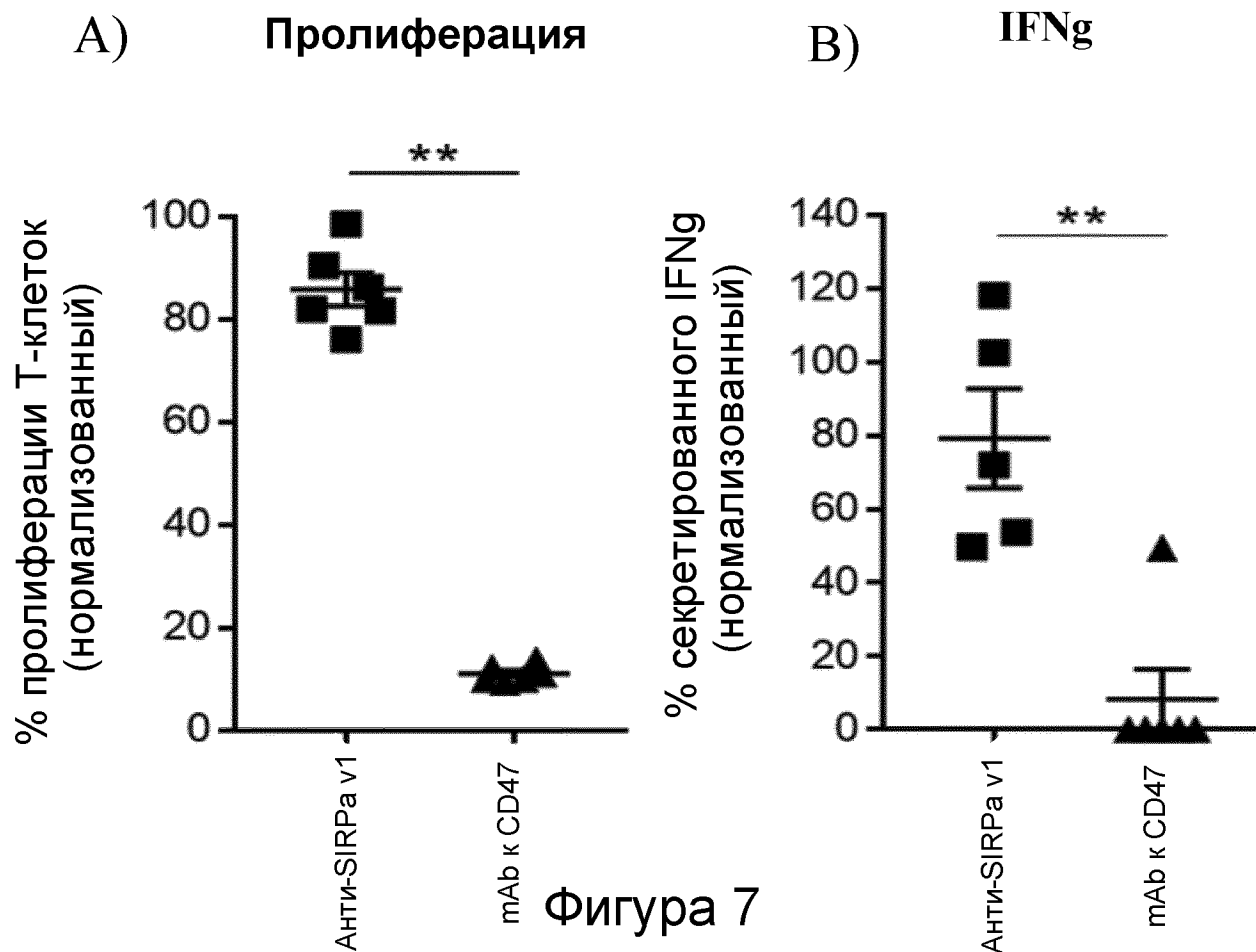
Фигура 4

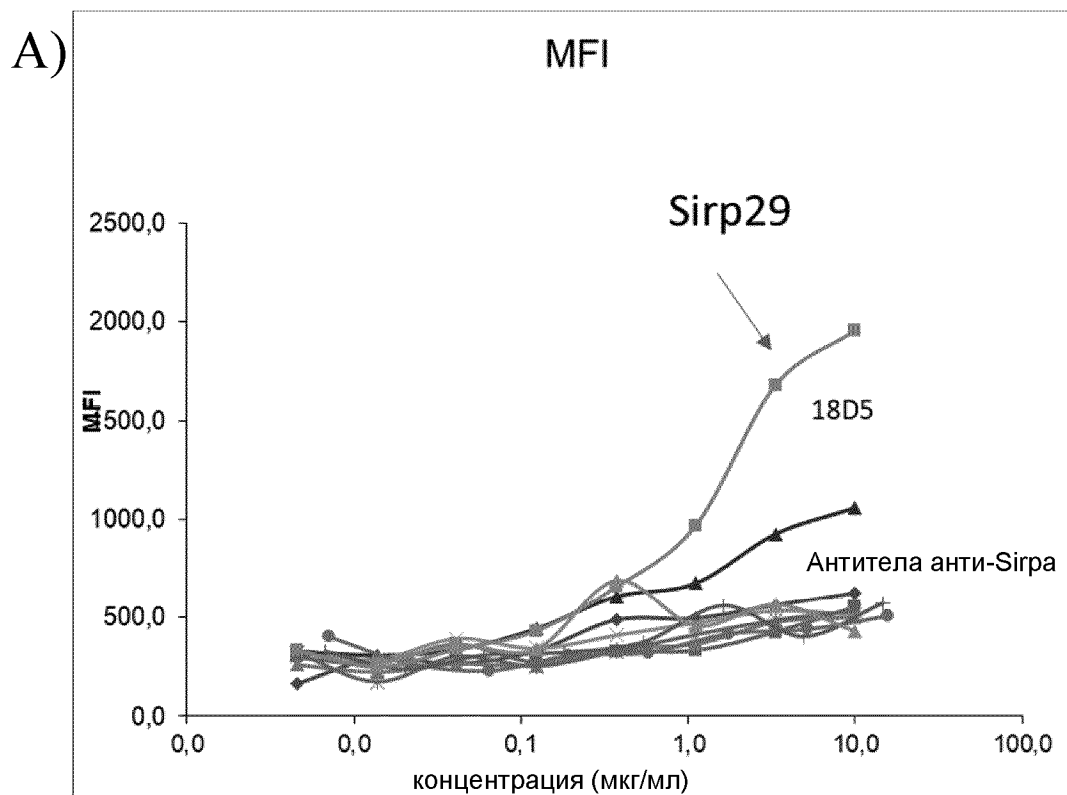


Фигура 5



Фигура 6





B)

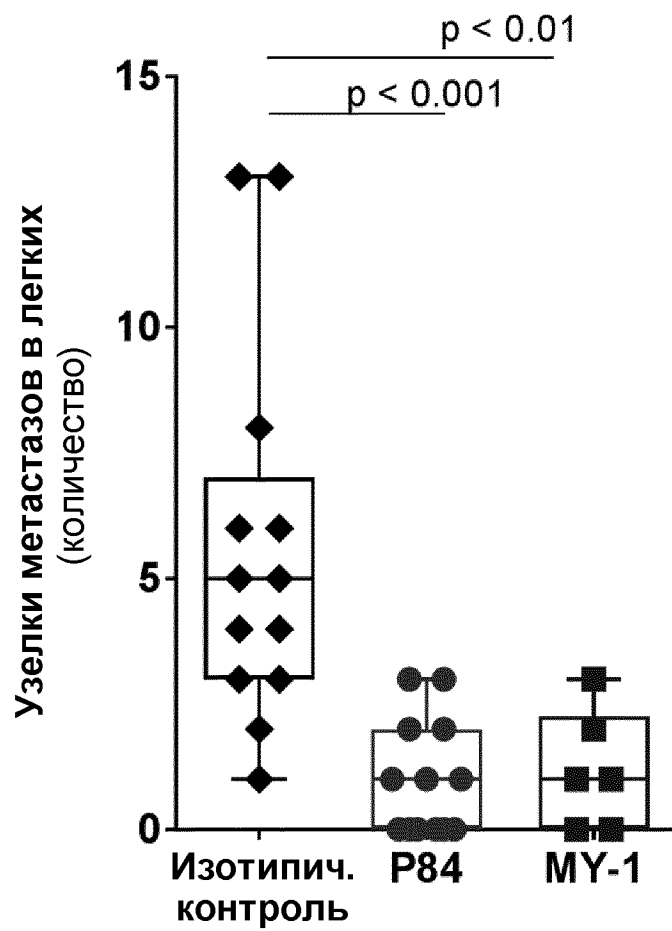
	ED50 мкг/мл
<b>Sirp29</b>	<b>1,13</b>
<b>18D5-химерное</b>	<b>5,72</b>
<b>Гуманизирован. 18D5</b>	<b>4439,44</b>

Фигура 9

Номер	ID образца	Конц. (нМ)	Информация	KD (M)	Ka (1/Мс)	Ka, ошибка	Kd (1/с)	Kd, ошибка	Rmax	Rmax, ошибка	R равновесие
1	LSB2-20	133.3		2.001e-8	7.683e5	2.166e4	1.538e-2	5.21e-4	1.404	0.02729	1.221
2	kwar23	133.3		1.068e-4	3.339e3	1.139e6	3.567e-1	1.048e-1	81.84	27890	0.102
3	slrp29	133.3		3.386e-5	4.279e3	1.086e5	1.449e-1	9.625e-3	36.06	914	0.1414

Фигура 10





Фигура 11