

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291928 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.14

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.24

(54) МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К SIRP α И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) PCT/CN2019/127915

(72) Изобретатель:

(32) 2019.12.24

Ли Жуньшэн (CN)

(33) CN

(74) Представитель:

(86) PCT/CN2020/138800

Нилова М.И. (RU)

(87) WO 2021/129697 2021.07.01

(71) Заявитель:

ЛАНОВА МЕДИСИНС ЛИМИТЕД
(CN)

(57) Предложены антитела или их фрагменты, обладающие специфичностью связывания как с вариантом 1, так и с вариантом 2 сигнального регуляторного белка альфа (SIRP α). Указанные антитела и фрагменты могут дозозависимым и эффективным образом блокировать взаимодействие между SIRP α и CD47 и эффективно индуцировать макрофаг-опосредованный фагоцитоз опухолевых клеток, экспрессирующих CD47.

A1

202291928

202291928

A1

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К SIRP α И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0001] Сигнальный регуляторный белок альфа (SIRP α) является членом семейства сигнальных регуляторных белков (SIRP), а также относится к суперсемейству иммуноглобулинов. Члены семейства SIRP представляют собой трансмембранные гликопротеины рецепторного типа, которые, как известно, участвуют в отрицательной регуляции процессов сигнализации, связанных с рецепторной тирозинкиназой. SIRP α может быть фосфорилирован тирозинкиназами. Было показано, что фосфотирозиновые остатки этой PTP рекрутируют SH2-содержащие протеинтирозинфосфатазы (PTP) и служат субстратами PTP. Было обнаружено, что SIRP α участвует в передаче сигнала, опосредованной различными рецепторами фактора роста. Было продемонстрировано, что CD47 является лигандом. SIRP α имеет очень высокое сходство с несколькими другими членами семейства SIRP. SIRP α экспрессируется главным образом миелоидными клетками, а также стволовыми клетками или нейронами.

[0002] SIRP α выполняет функцию ингибирующего рецептора и взаимодействует с широко экспрессируемым трансмембранным белком CD47, также называемым сигналом «не ешь меня». Это взаимодействие отрицательно регулирует эффекторную функцию клеток врожденной иммунной системы, такую как фагоцитоз клеток-хозяев. SIRP α латерально диффундирует на мембрану макрофага и накапливается в фагоцитарном синапсе для связывания CD47 и сигнала «свой», который ингибирует цитоскелет-интенсивный процесс фагоцитоза макрофагом.

[0003] При лигировании CD47 SIRP α фосфорилируется и рекрутирует фосфатазы, такие как SHP1 и SHP2. Внеклеточная область содержит три домена суперсемейства иммуноглобулинов – один домен V-set и два домена C1-set IgSF. SIRP β и γ имеют схожую внеклеточную структуру, но разные цитоплазматические области, дающие противоположные типы сигналов.

[0004] SIRP α распознает CD47 – антифагоцитарный сигнал, который отличает живые клетки от умирающих клеток. Внеклеточный домен SIRP α связывается с CD47 и передает внутриклеточные сигналы через свой цитоплазматический домен. Связывание CD47 опосредовано через NH2-концевой V-подобный домен SIRP α .

Цитоплазматическая область содержит четыре ITIM, которые становятся фосфорилированными после связывания лиганда. Фосфорилирование опосредует активацию тирозинкиназы SHP2. SIRP α также связывает фосфатазу SHP1, адаптерный белок SCAP2 и FYN-связывающий белок. Рекрутинг к мембране фосфатаз SHP приводит к ингибированию накопления миозина на поверхности клетки и обеспечивает ингибирование фагоцитоза.

[0005] Раковые клетки на высоком уровне экспрессируют CD47, который активирует SIRP α и ингибирует опосредованное макрофагами разрушение. Было показано, что высокоаффинные варианты SIRP α , которые антагонизировали CD47 на раковых клетках, увеличивали фагоцитоз раковых клеток. Было также показано, что антитела к SIRP α помогают макрофагам снижать рост и метастазирование рака, по отдельности и синергически с другими способами лечения рака.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В настоящей заявке предложены антитела к SIRP α , которые обладают высокой аффинностью к обоим вариантам v1 и v2, способны дозозависимо и эффективно блокировать взаимодействие между SIRP α и CD47 и эффективно индуцируют опосредованный макрофагами фагоцитоз клеток, экспрессирующих CD47. В отличие от них известные антитела к SIRP α способны распознавать только вариант 1.

[0007] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α) человека дикого типа, где антитело или его фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где (a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, 21 или 22, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; (b) CDRH1 содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 107 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108.

[0008] В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α) человека дикого типа, где антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, 21 или 22, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

[0009] В некоторых вариантах реализации переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 23-27, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 23-27.

[0010] В некоторых вариантах реализации переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 28-29, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 28-29.

[0011] В некоторых вариантах реализации переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

[0012] В еще одном варианте реализации предложено антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α) человека дикого типа, где антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки

тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 36, 37 или 38, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35.

[0013] В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и 39-44, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и 39-44.

[0014] В некоторых вариантах реализации вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 45-46, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 45-46.

[0015] В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45.

[0016] В еще одном варианте реализации предложено антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α) человека дикого типа, где антитело или его фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, 53 или 54, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, CDRL2 содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

[0017] В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 55-60, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 55-60.

[0018] В некоторых вариантах реализации вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 61-62, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 61-62.

[0019] В некоторых вариантах реализации антитело или фрагмент, раскрытые в настоящей заявке, способны связываться с вариантом 1 и вариантом 2 SIRP α . В некоторых вариантах реализации антитело или фрагмент являются гуманизированными. В некоторых вариантах реализации антитело или фрагмент, раскрытые в настоящей заявке, дополнительно обладают специфичностью связывания со вторым белком-мишенью.

[0020] Также в некоторых вариантах реализации предложены композиции, содержащие антитело или его фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах реализации композиция дополнительно содержит второе антитело, обладающее специфичностью к опухолевому антигену. В некоторых вариантах реализации второе антитело представляет собой опухоль-опсонизирующее антитело.

[0021] Также предложены способы и применения для лечения заболеваний и состояний. В одном варианте реализации предложен способ лечения рака у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту антитела или его фрагмента согласно настоящему изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0022] На **ФИГ. 1** показано перекрестное связывание SIRP α v1 и v2 антителами.

[0023] На **ФИГ. 2** показана аффинность связывания антитела к SIRP α v1.

[0024] На **ФИГ. 3** показана конкуренция антител с CD47 за взаимодействие с SIRP α .

[0025] На **ФИГ. 4** показана индукция антителами опосредованного макрофагами фагоцитоза.

[0026] На **ФИГ. 5** показано увеличение опосредованного макрофагами фагоцитоза опухолевых клеток за счет обработки антителами.

[0027] На **ФИГ. 6** представлены визуализации организмов животных и диаграммы, демонстрирующие, что 03-hz51 синергически взаимодействовало с ритуксимабом, вызывая полное ингибирование роста опухоли на модели лимфомы Raji.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

[0028] Следует отметить, что термин в единственном числе относится к одному или более выраженным таким термином объектам; например, под «антителом» подразумевается одно или более антител. Соответственно, термины в единственном числе, «один или более» и «по меньшей мере один» в настоящей заявке могут использоваться взаимозаменяемо.

[0029] В контексте настоящей заявки подразумевается, что термин «полипептид» охватывает «полипептид» в единственном числе, а также множество «полипептидов», и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин «полипептид» относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот, и не относится к определенной длине продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, «белок», «аминокислотная цепь» или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, охватываются определением «полипептид», и термин «полипептид» может использоваться вместо любого из этих терминов или взаимозаменяемо с ним. Также подразумевается, что термин «полипептид» относится к продуктам постэкспрессионных модификаций полипептида, в том числе, не ограничиваясь перечисленным, гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования,

амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолиза или модификации аминокислотами неприродного происхождения. Полипептид может происходить из естественного биологического источника или быть получен с помощью рекомбинантной технологии, однако он не обязательно транслирован с заданной последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть получен любым способом, в том числе путем химического синтеза.

[0030] «Гомология», или «идентичность», или «сходство» относится к сходству последовательностей двух пептидов или двух молекул нуклеиновой кислоты. Гомология может быть определена путем сравнения положения в каждой последовательности, которые для целей сравнения могут быть выравнены. Когда положение в сравниваемой последовательности занято тем же основанием или аминокислотой, молекулы в этом положении гомологичны. Степень гомологии последовательностей зависит от количества совпадающих или гомологичных положений, общих для последовательностей. «Неродственная» или «негомологичная» последовательность идентична менее чем на 40%, предпочтительно менее чем на 25%, одной из последовательностей согласно настоящему изобретению.

[0031] Если полинуклеотид или полинуклеотидная область (или полипептид или полипептидная область) имеет определенный процент (например, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) «идентичности последовательностей» с другой последовательностью, это означает, что при выравнении последовательностей этот процент оснований (или аминокислот) при сравнении двух последовательностей является одинаковым.

[0032] Термин «эквивалентная нуклеиновая кислота или полинуклеотид» относится к нуклеиновой кислоте, имеющей нуклеотидную последовательность с некоторой степенью гомологии или идентичности нуклеотидной последовательности нуклеиновой кислоты или ее комплемента. Подразумевается, что гомолог двухцепочечной нуклеиновой кислоты включает нуклеиновые кислоты с нуклеотидной последовательностью, которая в некоторой степени гомологична ей или ее комплементу. В одном аспекте гомологи нуклеиновых кислот способны гибридизоваться с нуклеиновой кислотой или ее комплементом. Аналогичным образом «эквивалентный полипептид» относится к полипептиду с некоторой степенью гомологии или идентичности аминокислотной последовательности референсного

полипептида. В некоторых аспектах идентичность последовательностей составляет по меньшей мере приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%. В некоторых аспектах эквивалентный полипептид или полинуклеотид содержит одну, две, три, четыре или пять вставок, делеций, замен и их комбинаций по сравнению с референсным полипептидом или полинуклеотидом. В некоторых аспектах эквивалентная последовательность сохраняет активность (например, связывание с эпитопом) или структуру (например, солевой мостик) референсной последовательности.

[0033] В контексте настоящей заявки «антитело» или «антигенсвязывающий полипептид» относится к полипептиду или полипептидному комплексу, который специфичным образом распознает антиген и связывается с ним. Антитело может представлять собой целое антитело и любой антигенсвязывающий фрагмент или одну его цепь. Таким образом, термин «антитело» включает любую молекулу, содержащую белок или пептид, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, обладающую биологической активностью связывания с антигеном. Их примеры включают, не ограничиваясь перечисленным, определяющий комплементарность участок (CDR) тяжелой или легкой цепи или его лиганд-связывающую часть, вариабельную область тяжелой цепи или легкой цепи, константную область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасный (FR) участок, или любую их часть, или по меньшей мере одну часть связывающего белка.

[0034] Термины «фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» в контексте настоящей заявки представляют собой часть антитела, такую как $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$ и тому подобное. Независимо от структуры фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознается интактным антителом. Термин «фрагмент антитела» включает аптамеры, шпигельмеры и диатела. Термин «фрагмент антитела» также включает любой синтетический или генетически модифицированный белок, действующий как антитело, связываясь с определенным антигеном с образованием комплекса.

[0035] «Одноцепочечный вариабельный фрагмент» или « $scFv$ » относится к слитому белку вариабельных областей тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей иммуноглобулинов. В некоторых аспектах области соединены коротким линкерным пептидом длиной от 10 до приблизительно 25 аминокислот. Линкер может иметь высокое содержание глицина

для гибкости, а также серина или треонина для растворимости, и может либо соединять N-конец V_H с C-концом V_L , либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера. Молекулы scFv известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 5,892,019.

[0036] Термин «антитело» охватывает различные широкие классы полипептидов, которые являются биохимически различимыми. Специалистам в данной области техники известно, что тяжелые цепи подразделяют на гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (γ , μ , α , δ , ϵ), среди которых также есть несколько подклассов (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Именно природа этой цепи определяет «класс» антитела как IgG, IgM, IgA, IgG или IgE, соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgG₅ и т. д., хорошо охарактеризованы и, как известно, придают функциональную специализацию. Модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов легко различимы специалистом в данной области техники с учетом настоящего описания и, соответственно, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов со всей ясностью находятся в пределах объема настоящего изобретения, при этом последующее обсуждение будет большей частью касаться класса IgG молекул иммуноглобулинов. Что касается IgG, стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи молекулярной массой приблизительно 23000 дальтон и два идентичных полипептида тяжелой цепи молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи, как правило, соединены дисульфидными связями в конфигурацию «Y», где легкие цепи заключают в себе тяжелые цепи, начинающиеся в устье «Y» и продолжающиеся через переменную область.

[0037] Антитела, антигенсвязывающие полипептиды, их варианты или производные согласно настоящему изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным, поликлональные, моноклональные, мультиспецифичные, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитоп-связывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fvs, одноцепочечные Fvs (scFv), одноцепочечные антитела, дисульфид-связанные Fvs (sdFv), фрагменты, содержащие домен VK или VH, фрагменты, полученные с помощью экспрессионной библиотеки Fab-фрагментов, и антиидиотипические (анти-

Id) антитела (включая, например, анти-Id-антитела к антителам LIGHT, раскрытым в настоящей заявке). Молекулы иммуноглобулинов или антител согласно настоящему изобретению могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина.

[0038] Легкие цепи подразделяют на каппа или лямбда (K , λ). Каждый класс тяжелой цепи может быть связан с легкой каппа- или лямбда-цепью. Как правило, легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, а «хвостовые» части двух тяжелых цепей связываются друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда молекулы иммуноглобулинов вырабатываются гибридомами, В-клетками или генетически модифицированными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности проходят от N-конца на раздвоенных концах Y-образной конфигурации до C-конца в нижней части каждой цепи.

[0039] Как легкие, так и тяжелые цепи делятся на области структурной и функциональной гомологии. Термины «константный» и «вариабельный» используются в отношении функции. В этой связи следует понимать, что вариабельные домены частей как легкой (VK), так и тяжелой (VH) цепей определяют распознавание антигена и специфичность. Напротив, константные домены легкой цепи (СК) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарный перенос, связывание Fc-рецептора, связывание комплемента и тому подобное. Принято, что номера доменов константной области возрастают при удалении от антигенсвязывающего сайта или аминоконца антитела. N-концевая часть является вариабельной областью, а C-концевая часть является константной областью; домены CH3 и СК фактически содержат карбоксиконец тяжелой и легкой цепей, соответственно.

[0040] Как указано выше, вариабельная область позволяет антителу селективно распознавать и специфичным образом связывать эпитопы на антигенах. То есть, домен VK и домен VH, или подмножество определяющих комплементарность участков (CDR) антитела объединяются, образуя вариабельную область, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более

конкретно, антигенсвязывающий сайт определяется тремя CDR на каждой из VH- и VK-цепей (т. е. CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3). В некоторых случаях, например, в определенных молекулах иммуноглобулинов, происходящих из верблюдовых или полученных на основе иммуноглобулинов верблюдовых с помощью генной инженерии, полная молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей без легких цепей. См., например, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993).

[0041] Во встречающихся в природе антителах шесть «определяющих комплементарность участков» или «CDR», присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие несмежные последовательности аминокислот, расположенные особым образом, образуя антигенсвязывающий домен при принятии антителом его трехмерной конфигурации в водной среде. Остальные аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, называемые «каркасными» участками, демонстрируют меньшую межмолекулярную вариабельность. Каркасные участки в основном принимают конформацию β -листа, а CDR образуют петли, которые соединяют, а в некоторых случаях являются частью структуры β -листа. Таким образом, каркасные участки формируют каркас, который обеспечивает расположение CDR в правильной ориентации посредством межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный занявшими свои положения CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с распознанным эпитопом. Аминокислоты, составляющие CDR и каркасные участки, соответственно, могут быть легко установлены для любой отдельно взятой вариабельной области тяжелой или легкой цепи специалистом в данной области техники, поскольку они были точно определены (см. «Sequences of Proteins of Immunological Interest», Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); и Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)).

[0042] В случае, когда существует два или более определений термина, который используется и/или принят в данной области техники, подразумевается, что определение термина, используемое в настоящей заявке, включает все такие значения, если явно не указано иное. Конкретным примером является использование термина

«определяющий комплементарность участок» («CDR») для описания несмежных антигенсвязывающих сайтов, присутствующих в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Этот конкретный участок был описан в источниках Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, «Sequences of Proteins of Immunological Interest» (1983) и Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), полностью включенных в настоящую заявку посредством ссылки. Определения CDR по Kabat и Chothia включают перекрывающиеся или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, подразумевается, что использование любого из определений в контексте CDR антитела или его вариантов находится в рамках этого термина, как определено и используется в настоящей заявке. Сравнение соответствующих аминокислотных остатков, включающих CDR, как определено в каждом из приведенных выше источников, приведено в таблице ниже. Точные номера остатков, включающих конкретный CDR, будут варьировать в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники могут рутинным образом определять, какие остатки образуют конкретный CDR, при известной аминокислотной последовательности вариабельной области антитела.

	Kabat	Chothia
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

[0043] Kabat *et al.* также определили систему нумерации для последовательностей вариабельных доменов, которая применима к любому антителу. Специалист в данной области техники может однозначным образом применить эту систему «нумерации по Kabat» к любой последовательности вариабельного домена, не полагаясь на какие-либо экспериментальные данные, помимо самой последовательности. В контексте настоящей заявки термин «система нумерации по Kabat» относится к системе нумерации, сформулированной Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, «Sequence of Proteins of Immunological Interest» (1983).

[0044] В дополнение к вышеприведенной таблице система нумерации по Kabat описывает участки CDR следующим образом: CDR-H1 начинается приблизительно с 31 аминокислоты (т. е., приблизительно через 9 остатков после первого остатка цистеина), включает приблизительно 5-7 аминокислот и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-H2 начинается с пятнадцатого остатка после окончания CDR-H1, включает приблизительно 16-19 аминокислот и заканчивается на следующем остатке аргинина или лизина. CDR-H3 начинается приблизительно с тридцать третьего аминокислотного остатка после окончания CDR-H2; включает 3-25 аминокислот; и заканчивается на последовательности W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту. CDR-L1 начинается приблизительно с 24 остатка (т. е., после остатка цистеина); включает приблизительно 10-17 остатков; и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-L2 начинается приблизительно с шестнадцатого остатка после окончания CDR-L1 и включает приблизительно 7 остатков. CDR-L3 начинается приблизительно с тридцать третьего остатка после окончания CDR-L2 (т. е., после остатка цистеина); включает приблизительно 7-11 остатков и заканчивается на последовательности F или W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту.

[0045] Антитела, раскрытые в настоящей заявке, могут иметь происхождение от любого животного, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. В еще одном варианте реализации вариабельная область может иметь происхождение от хрящевых рыб (например, от акул).

[0046] В контексте настоящей заявки термин «константная область тяжелой цепи» включает аминокислотные последовательности, происходящие из тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий константную область тяжелой цепи, содержит по меньшей мере одно из следующего: домен CH1, шарнирный (например, верхняя, средняя и/или нижняя шарнирная область) домен, домен CH2, домен CH3 или его вариант или фрагмент. Например, антигенсвязывающий полипептид для использования в изобретении может содержать полипептидную цепь, содержащую домен CH1; полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен CH2; полипептидную цепь, содержащую домен CH1 и домен CH3; полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен CH3, или полипептидную цепь, содержащую домен CH1,

по меньшей мере часть шарнирного домена, домен CH2 и домен CH3. В еще одном варианте реализации полипептид согласно изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую домен CH3. Кроме того, антитело для использования в изобретении может не иметь по меньшей мере части домена CH2 (например, всего или части домена CH2). Как указано выше, специалисту в данной области техники будет ясно, что константная область тяжелой цепи может быть модифицирована таким образом, что ее аминокислотная последовательность будет отличаться от встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина.

[0047] Константная область тяжелой цепи антитела, раскрытого в настоящей заявке, может происходить из разных молекул иммуноглобулина. Например, константная область тяжелой цепи полипептида может содержать домен CH1, происходящий из молекулы IgG₁, и шарнирную область, происходящую из молекулы IgG₃. В еще одном примере константная область тяжелой цепи может содержать шарнирную область, происходящую частично из молекулы IgG₁ и частично из молекулы IgG₃. В еще одном примере часть тяжелой цепи может содержать химерный шарнир, происходящий частично из молекулы IgG₁ и частично из молекулы IgG₄.

[0048] В контексте настоящей заявки термин «константная область легкой цепи» включает аминокислотные последовательности, происходящие из легкой цепи антитела. Предпочтительно константная область легкой цепи содержит по меньшей мере один из константного каппа-домена или константного лямбда-домена.

[0049] «Пара легкой и тяжелой цепей» относится к объединению легкой цепи и тяжелой цепи, которые могут образовывать димер посредством дисульфидной связи между доменом CL легкой цепи и доменом CH1 тяжелой цепи.

[0050] Как отмечено ранее, структуры субъединиц и трехмерная конфигурация константных областей различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. В контексте настоящей заявки термин «домен VH» включает аминоконцевой переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, и термин «домен CH1» включает первый (наиболее аминоконцевой) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Домен CH1 соседствует с доменом VH и является аминоконцевым относительно шарнирной области молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина.

[0051] В контексте настоящей заявки термин «домен CH2» включает часть молекулы тяжелой цепи, которая простирается, например, с приблизительно 244 остатка до 360 остатка антитела, как указано с помощью традиционных схем нумерации (остатки 244-360, система нумерации по Kabat, и остатки 231-340, система нумерации EU, см. Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, «Sequences of Proteins of Immunological Interest» (1983)). Домен CH2 уникален тем, что он тесно не связан с другим доменом. Скорее, две N-связанные разветвленные углеводные цепи расположены между двумя доменами CH2 интактной нативной молекулы IgG. Также хорошо описано, что домен CH3 простирается от домена CH2 до C-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

[0052] В контексте настоящей заявки термин «шарнирная область» включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет домен CH1 с доменом CH2. Эта шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям перемещаться независимо друг от друга. Шарнирные области можно подразделить на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux *et al.*, *J. Immunol* 161:4083 (1998)).

[0053] В контексте настоящей заявки термин «дисульфидная связь» включает ковалентную связь, образованную между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик со второй тиольной группой. В большинстве встречающихся в природе молекул IgG области CH1 и СК связаны дисульфидной связью и две тяжелые цепи связаны двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 с использованием системы нумерации по Kabat (положение 226 или 229, система нумерации EU).

[0054] В контексте настоящей заявки за термином «химерное антитело» закреплено значение любого антитела, в котором иммунореактивная область или сайт получены или происходят из первого вида, а константная область (которая может быть интактной, частичной или модифицированной в соответствии с настоящим изобретением) получена из второго вида. В отдельных вариантах реализации мишень-связывающая область или сайт будут получены из источника, отличного от человека (например, мыши или примата), а константная область является человеческой.

[0055] В контексте настоящей заявки «процент гуманизации» рассчитывают путем определения количества различий в аминокислотах каркаса (т. е., различий в участках, отличных от CDR) между гуманизированным доменом и доменом зародышевой линии, вычитания этого количества из общего количества аминокислот, а затем деления этой разности на общее количество аминокислот и умножения на 100.

[0056] Под «специфично связывает» или «обладает специфичностью к» обычно подразумевается, что антитело связывается с эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена, и что связывание подразумевает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Согласно этому определению антитело, как говорят, «специфично связывается» с эпитопом, когда оно связывается с этим эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена вероятнее, чем оно связалось бы со случайным, неродственным эпитопом. Термин «специфичность» используется в настоящей заявке для оценки относительной аффинности, с которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, можно считать, что антитело «А» имеет более высокую специфичность для данного эпитопа, чем антитело «В», или об антителе «А» можно сказать, что оно связывается с эпитопом «С» с более высокой специфичностью, чем его специфичность для родственного эпитопа «D».

[0057] В контексте настоящей заявки термины «лечить» или «лечение» относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, где целью является предупреждение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, например, прогрессирования рака. Благоприятные или желательные клинические результаты включают, не ограничиваясь перечисленным, частичное снятие симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) течение заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, уменьшение интенсивности или временное ослабление течения заболевания и ремиссию (частичную или полную), как обнаружимые, так и не обнаружимые. «Лечение» также может означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится. Субъекты, нуждающиеся в лечении, включают уже имеющих состояние или расстройство, а также тех, кто предрасположен к развитию состояния или расстройства, или тех, у кого состояние или расстройство необходимо предупредить.

[0058] Под «субъектом», или «индивидуумом», или «животным», или «пациентом», или «млекопитающим» подразумевается любой субъект, в частности, млекопитающее, для которого желательны диагностика, прогнозирование или терапия. Субъекты-млекопитающие включают людей, одомашненных животных, сельскохозяйственных животных и животных зоопарка, животных, принимающих участие в спорте, или домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и так далее.

[0059] В контексте настоящей заявки такие фразы, как «нуждающемуся в лечении пациенту» или «нуждающийся в лечении субъект», включают субъектов, таких как субъекты-млекопитающие, которые получили бы пользу от введения антитела или композиции согласно настоящему изобретению при применении, например, для обнаружения, для процедуры диагностики и/или для лечения.

Антитела к SIRPα

[0060] Согласно настоящему изобретению предложены антитела и фрагменты к SIRPα, которые обладают высокой аффинностью к обоим вариантам v1 и v2. Вариант 1 (hSIRPαV1) является доминирующим вариантом среди европейцев, африканцев, американцев смешанной расы и уроженцев Южной Азии. Вариант 2 (hSIRPαV2) является доминирующим вариантом среди уроженцев Восточной Азии. Последовательности hSIRPαV1 и hSIRPαV2 отличаются в пределах внеклеточного Ig-подобного V-подобного (IgV) домена. Способность раскрытых в настоящей заявке антител и фрагментов распознавать оба варианта обуславливает их эффективность у самой широкой популяции пациентов.

[0061] Кроме того, раскрытые в настоящей заявке антитела и фрагменты продемонстрировали превосходную аффинность связывания, сильную индукцию макрофаг-опосредованного фагоцитоза и пригодность к производству с точки зрения превосходных химических свойств, процесса производства и контроля качества (СМС).

[0062] Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, способные связываться с обоими вариантами 1 и 2 SIRPα. Примеры антител включают мышинные антитела,

перечисленные в **Таблице 1**, а также гуманизированные антитела из **Таблиц 2-8**.

Также включены антитела, которые содержат те же CDR, что проиллюстрированы в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации раскрытые антитела и фрагменты включают антитела и фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом, что и проиллюстрированные в настоящей заявке, и антитела и фрагменты, которые конкурируют с раскрытыми в настоящей заявке антителами и фрагментами за связывание с SIRP α .

[0063] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело или его фрагмент, включающие переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи с участками CDR, раскрытыми в настоящей заявке, а также их биологические эквиваленты.

[0064] В одном варианте реализации CDR представляют собой CDR 248G3F6, как показано в **Таблицах 2B и 2D**. В одном варианте реализации CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, 21 или 22 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации.

[0065] В одном варианте реализации предложено антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α) человека дикого типа, где антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

15, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

[0066] В одном варианте реализации предложено антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α) человека дикого типа, где антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

[0067] В одном варианте реализации предложено антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α) человека дикого типа, где антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

[0068] В некоторых вариантах реализации переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 23-27, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный

аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 23-27.

[0069] В некоторых вариантах реализации вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 28-29, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 28-29.

[0070] В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

[0071] В одном варианте реализации CDR представляют собой CDR 300A6A6, как показано в **Таблицах 3B и 3D**. В одном варианте реализации CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 36, 37 или 38 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации.

[0072] В одном варианте реализации предложено антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α) человека дикого типа, где антитело или его фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, CDRH3

содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35.

[0073] В одном варианте реализации предложено антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа ($\text{SIRP}\alpha$) человека дикого типа, где антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35.

[0074] В одном варианте реализации предложено антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа ($\text{SIRP}\alpha$) человека дикого типа, где антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35.

[0075] В одном варианте реализации предложено антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа ($\text{SIRP}\alpha$) человека дикого типа, где антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки

тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35.

[0076] В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и 39-44, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и 39-44.

[0077] В некоторых вариантах реализации вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 45-46, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 45-46.

[0078] В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45.

[0079] В одном варианте реализации CDR представляют собой CDR 102A10F2, как показано в **Таблицах 4B и 4D**. В одном варианте реализации CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, 53 или 54 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 или ее вариант,

содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации.

[0080] В одном варианте реализации предложено антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α) человека дикого типа, где антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

[0081] В одном варианте реализации предложено антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α) человека дикого типа, где антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

[0082] В одном варианте реализации предложено антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α) человека дикого типа, где антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи,

содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

[0083] В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 55-60, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 55-60.

[0084] В некоторых вариантах реализации вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 61-62, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 61-62.

[0085] В одном варианте реализации CDR представляют собой CDR 62D2H6, как показано в **Таблицах 5B и 5D**. В одном варианте реализации CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации.

[0086] В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 69-72, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 69-72.

[0087] В некоторых вариантах реализации вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 73-76, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 73-76.

[0088] В одном варианте реализации CDR представляют собой CDR 211F8E11, как показано в **Таблицах 6B и 6D**. В одном варианте реализации CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации.

[0089] В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 и 83-86, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 и 83-86.

[0090] В некоторых вариантах реализации вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID

NO: 10 и 87-90, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 87-90.

[0091] В одном варианте реализации CDR представляют собой CDR 217D11E5, как показано в **Таблицах 7B и 7D**. В одном варианте реализации CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации.

[0092] В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11 и 97-100, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11 и 97-100.

[0093] В некоторых вариантах реализации вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 101-102, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 101-102.

[0094] В одном варианте реализации CDR представляют собой CDR 234B7D5, как показано в **Таблицах 8B и 8D**. В одном варианте реализации CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH3 содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации.

[0095] В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 и 109-112, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 и 109-112.

[0096] В некоторых вариантах реализации вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 113-118, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 113-118.

[0097] Антитела, которые содержали эти участки CDR, будь то мышинные, гуманизированные или химерные, обладали сильной активностью связывания и ингибирования SIRPα. Как показано в **Примере 5**, определенные остатки в CDR могут быть модифицированы для сохранения или улучшения свойства или снижения вероятности посттрансляционных модификаций (PTM). Такие модифицированные CDR могут называться CDR с созревшей аффинностью или CDR со сниженным риском.

[0098] Неограничивающие примеры CDR со сниженным риском представлены в **Таблицах 2В, 3В и 4В**. Модифицированные CDR могут включать CDR, которые имеют вставку, делецию и/или замены одной, двух или трех аминокислот. В некоторых вариантах реализации замены могут представлять собой консервативные замены.

[0099] «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой такую замену, при которой аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепь. В данной области техники установлены семейства

аминокислотных остатков, содержащих схожие боковые цепи, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, не являющийся необходимым аминокислотный остаток в полипептиде иммуноглобулина предпочтительно заменяют другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. В другом варианте реализации цепочку аминокислот можно заменить структурно схожей цепочкой, которая отличается по порядку и/или составу представителей семейства боковых цепей.

[0100] Неограничивающие примеры консервативных аминокислотных замен представлены в таблице ниже, где оценка сходства 0 или выше указывает на консервативную замену между двумя аминокислотами.

Таблица А. Матрица сходства аминокислот

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

Таблица В. Консервативные аминокислотные замены

Для аминокислоты	Замена на
Аланин	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
Аргинин	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Аспарагин	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
Аспарагиновая кислота	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Цистеин	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
Глутамин	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Глутаминовая Кислота	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Глицин	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
Изолейцин	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Лейцин	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Лизин	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Метионин	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Фенилаланин	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Пролин	D-Pro
Серин	D-Ser, Thr, D-Thr, алло-Thr, L-Cys, D-Cys
Треонин	D-Thr, Ser, D-Ser, алло-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Тирозин	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Валин	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

[0101] Специалисту в данной области техники также будет ясно, что антитела, раскрытые в настоящей заявке, могут быть модифицированы таким образом, что их аминокислотная последовательность будет отличаться от встречающегося в природе связывающего полипептида, из которого они происходят. Например, полипептидная или аминокислотная последовательность, происходящая из обозначенного белка, может быть схожей, например, иметь определенный процент идентичности исходной последовательности, например, она может быть на 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична исходной последовательности.

[0102] В отдельных вариантах реализации антитело содержит аминокислотную последовательность или один или более фрагментов, которые обычно не связаны с антителом. Примеры модификаций более подробно описаны ниже. Например, антитело согласно изобретению может содержать гибкую линкерную последовательность или

может быть модифицировано с добавлением функционального фрагмента (например, ПЭГ (полиэтиленгликоля), лекарственного средства, токсина или метки).

[0103] Антитела, их варианты или производные согласно изобретению включают производные, которые были модифицированы, т. е., путем ковалентного присоединения молекулы любого типа к антителу таким образом, что ковалентное присоединение не препятствует связыванию антитела с эпитопом. Например, не ограничиваясь перечисленным, антитела могут быть модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолиза, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т. д. Любая из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена известными способами, включая, не ограничиваясь перечисленным, специфичное химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д. Кроме того, антитела могут содержать одну или более неканонических аминокислот.

[0104] В некоторых вариантах реализации антитела могут быть конъюгированы с терапевтическими агентами, пролекарствами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологического ответа, фармацевтическими агентами или ПЭГ.

[0105] Антитела могут быть конъюгированы или слиты с терапевтическим агентом, который может включать детектируемые метки, такие как радиоактивные метки, иммуномодулятор, гормон, фермент, олигонуклеотид, фотоактивный терапевтический или диагностический агент, цитотоксический агент, который может представлять собой лекарственное средство или токсин, агент, усиливающий контраст ультразвукового изображения, нерадиоактивную метку, их комбинацию и другие подобные агенты, известные в данной области техники.

[0106] Антитела могут быть мечены с возможностью обнаружения путем их связывания с хемилюминесцентным соединением. Присутствие меченого хемилюминесцентным соединением антигенсвязывающего полипептида затем определяют путем обнаружения люминесценции, возникающей в ходе химической реакции. Примерами соединений, особенно подходящих в качестве

хемилюминесцентной метки, являются люминол, изолюминол, ароматический сложный эфир акридиния, имидазол, соль акридиния и сложный оксалатный эфир.

[0107] Антитела также могут быть мечены с возможностью обнаружения с использованием металлов, испускающих флуоресцентное излучение, таких как ^{152}Eu или другие металлы семейства лантаноидов. Эти металлы могут быть присоединены к антителу с использованием таких металл-хелатирующих групп, как диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПА) или этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА). Методики конъюгирования различных фрагментов с антителами хорошо известны, см. например, Arnon *et al.*, «Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy», в Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), стр. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, «Antibodies For Drug Delivery», в Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.*, (eds.), Marcel Dekker, Inc., стр. 623- 53 (1987); Thorpe, «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review», в Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), стр. 475-506 (1985); «Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy», в Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), Academic Press стр. 303-16 (1985), и Thorpe *et al.*, «The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates», *Immunol. Rev.* (52:119-58 (1982)).

Бифункциональные молекулы и комбинированные терапии

[0108] Важным компонентом врожденной иммунной системы являются макрофаги. Макрофаги ингибируют рост опухоли посредством фагоцитоза опухолевых клеток. Опухолевые клетки могут ускользать от надзора макрофагов путем активации сигнала «не ешь меня» – CD47 – на их клеточной поверхности. CD47 экспрессируется повсеместно, но подвергается повышающей регуляции при различных типах опухолей. Взаимодействуя с различными лигандами, CD47 играет роль в регуляции подвижности клеток, адгезии, миграции и активации тромбоцитов. SIRPα является еще одним членом суперсемейства иммуноглобулинов и главным образом экспрессируется на поверхности нейронов и миелоидных клеток, включая макрофаги, гранулоциты, моноциты и дендритные клетки. Ось CD47/SIRPα является известным основным путем уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора.

[0109] Агенты, нацеленные на CD47, могут инициировать опсонизацию антителами и активировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) или антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ), который способствует разрушению опухолевых клеток. Однако из-за повсеместной экспрессии CD47 может приводить к эритротоксичности и другим гематологическим побочным действиям из-за присутствия антигена на клетках крови. Молекулы, нацеленные на SIRP α , либо биспецифичные агенты, нацеленные как на SIRP α , так и на CD47, могут быть сконструированы таким образом, чтобы вызывать эффект АЗКЦ и АЗКФ за счет наличия функциональных Fc-доменов.

[0110] Поскольку SIRP α более ограничен в экспрессии по сравнению с CD47, эти молекулы не должны иметь столько гематологических осложнений по сравнению с молекулами, нацеленными только на CD47. Таким образом, антитела к SIRP α могут быть более безопасными, чем антитела к CD47. Другой вариант представляет собой разработку биспецифичных агентов, нацеленных как на ось CD47/SIRP α , так и на другой опухолевый антиген. Эти агенты могут представлять собой биспецифичные антитела, слитые белки или комбинированные терапии.

[0111] Примеры опухолевых антигенов, в частности, тех, которые могут вызывать опсонизацию опухоли, включают, не ограничиваясь перечисленным, CD19, CD20, EGFR, HER2, CD3, CD16, PD1, PD-L1, LAG3, TIM3, CTLA4, VISTA, CSFR1, A2AR, CD73, CD39, CD40, CEA, HER2, VEGFR, TIGIT, клаудин 18.2, CD24, GPC3, IL13RA2, 4-1BB, CCR8 и CMET.

[0112] Также предложен другой формат биспецифичных антител. В некоторых вариантах реализации каждый из фрагмента к SIRP α и второго фрагмента независимо выбран из Fab-фрагмента, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) или однодоменного антитела. В некоторых вариантах реализации биспецифичное антитело дополнительно содержит Fc-фрагмент.

Полинуклеотиды, кодирующие антитела, и способы получения антител

[0113] Настоящее изобретение также относится к выделенным полинуклеотидам или молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела, их варианты или производные согласно изобретению. Полинуклеотиды согласно настоящему

изобретению могут кодировать целые переменные области тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов. Кроме того, полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать части переменных областей тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов.

[0114] Способы получения антител хорошо известны в данной области техники и описаны в настоящей заявке. В отдельных вариантах реализации как переменные, так и константные области антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению являются полностью человеческими. Полностью человеческие антитела могут быть получены с использованием методик, описанных в данной области техники и в настоящей заявке. Например, полностью человеческие антитела против определенного антигена могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для выработки таких антител в ответ на стимуляцию антигеном, при этом его эндогенные локусы были деактивированы. Примеры методик, которые могут быть использованы для получения таких антител, описаны в патентах США №№ 6,150,584, 6,458,592, 6,420,140, полностью включенных посредством ссылки.

Способы лечения

[0115] Как описано в настоящей заявке, антитела, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут быть использованы в определенных способах лечения и диагностики.

[0116] Настоящее изобретение дополнительно относится к способам терапии на основе антител, включающим введение антител согласно изобретению пациенту, такому как животное, млекопитающее и человек, для лечения одного или более расстройств или состояний, описанных в настоящей заявке. Терапевтические соединения согласно изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным, антитела согласно изобретению (включая их варианты и производные, как описано в настоящей заявке) и нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, кодирующие антитела согласно изобретению (включая их варианты и производные, как описано в настоящей заявке).

[0117] Антитела согласно изобретению также могут применяться для лечения или ингибирования рака. Как указано выше, SIRP α может быть сверхэкспрессирован в опухолевых клетках, в частности, в опухолях желудка, поджелудочной железы, пищевода, яичника и легкого. Было показано, что ингибирование SIRP α эффективно для лечения опухолей.

[0118] Соответственно, в некоторых вариантах реализации предложены способы лечения рака у нуждающегося в этом пациента. Способ в одном из вариантов реализации включает введение указанному пациенту эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одна из раковых клеток (например, стромальных клеток) у пациента сверхэкспрессирует SIRP α .

[0119] Способы клеточной терапии, такие как терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR), также охватываются настоящим изобретением. Можно использовать подходящую клетку, которую приводят в контакт с антителом к SIRP α согласно настоящему изобретению (или, в качестве альтернативы, генетически модифицированную для экспрессии антитела к SIRP α согласно настоящему изобретению). После такого контакта или генетической модификации клетка затем может быть введена больному раком, нуждающемуся в лечении. Больной раком может иметь рак любого типа из описанных в настоящей заявке. Клетка (например, Т-клетка) может представлять собой, например, опухоль-инфильтрирующий Т-лимфоцит, CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку или их комбинацию, не ограничиваясь перечисленным.

[0120] В некоторых вариантах реализации клетка была выделена от самого больного раком. В некоторых вариантах реализации клетка была предоставлена донором или из банка клеток. Когда клетка выделена от больного раком, нежелательные иммунные реакции могут быть сведены к минимуму.

[0121] Неограничивающие примеры раковых заболеваний включают рак мочевого пузыря, рак молочной железы, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак головы и шеи, рак почки, лейкоз, рак печени, рак легкого, лимфому, меланому, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы и рак щитовидной железы. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой один или более из рака желудка, поджелудочной железы, пищевода, яичника и легкого.

[0122] Дополнительные заболевания или состояния, связанные с повышенной выживаемостью клеток, подлежащие лечению, предупреждению, диагностике и/или прогнозированию с помощью антител или их вариантов или производных согласно изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным, прогрессирование и/или метастазы злокачественных новообразований и ассоциированные расстройства, такие как лейкоз (в том числе острые лейкозы (например, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз (в том числе миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный лейкоз и эритролейкоз)) и хронические лейкозы (например, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз), истинная полицитемия, лимфомы (например, болезнь Ходжкина и неходжкинская лимфома), множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей и солидные опухоли, в том числе, не ограничиваясь перечисленными, саркомы и карциномы, такие как фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома ободочной кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак предстательной железы, плоскоклеточная карцинома, базальноклеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома слюнных желез, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечноклеточный рак, гепатома, карцинома желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластома, акустическая невринома, олигодендроглиомы, менингиомы, меланомы, нейробластома и ретинобластома.

[0123] Конкретная дозировка и режим лечения для любого конкретного пациента будут зависеть от множества факторов, включая конкретные используемые антитела, их вариант или производное, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и режим питания пациента, а также время введения, скорость выведения, комбинацию назначенных лекарственных средств и тяжесть конкретного заболевания, подлежащего лечению. Оценка таких факторов медицинскими работниками находится в пределах

обычной квалификации специалиста в данной области техники. Количество также будет зависеть от конкретного пациента, подлежащего лечению, способа введения, типа рецептуры, характеристик используемого соединения, тяжести заболевания и желаемого эффекта. Используемое количество может быть определено с помощью фармакологических и фармакокинетических принципов, хорошо известных в данной области техники.

[0124] Способы введения антител или их вариантов включают, не ограничиваясь перечисленным, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути.

Антигенсвязывающие полипептиды или композиции могут быть введены любым подходящим путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальную выстилку или слизистую оболочку (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т. д.), и могут быть введены вместе с другими биологически активными агентами. Таким образом, фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие полипептиды согласно изобретению, могут быть введены перорально, ректально, парентерально, интрацестернально, интравагинально, внутрибрюшинно, местно (например, с помощью порошков, мазей, капель или трансдермального пластыря), буккально или в виде перорального или назального спрея.

[0125] В контексте настоящей заявки термин «парентеральный» относится к способам введения, включающим внутривенную, внутримышечную, внутрибрюшинную, интрастернальную, подкожную и внутрисуставную инъекцию и инфузию.

[0126] Введение может быть системным или местным. Кроме того, может быть желательным введение антител согласно изобретению в центральную нервную систему любым подходящим путем, включая внутрижелудочковую и интратекальную инъекцию; внутрижелудочковая инъекция может быть упрощена с помощью внутрижелудочкового катетера, например, присоединенного к резервуару, такому как резервуар Оммаи. Также может быть использовано пульмональное введение, например, с помощью ингалятора или небулайзера и рецептуры с распыляющим агентом.

[0127] Может быть желательно вводить антигенсвязывающие полипептиды или композиции согласно изобретению местным образом в область, нуждающуюся в лечении; это может быть достигнуто, например, не ограничиваясь перечисленным, путем местной инфузии во время хирургического вмешательства, местного нанесения, например, в сочетании с перевязкой раны после хирургического вмешательства, путем инъекции, с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата, причем указанный имплантат может быть выполнен из пористого, непористого или гелеобразного материала, включая мембраны, такие как мембраны Sikalastic, или волокна. Предпочтительно при введении белка, включая антитело, согласно изобретению необходимо следить, чтобы использовались материалы, не абсорбирующие белок.

[0128] Количество антител согласно изобретению, которое будет эффективным для лечения, ингибирования и предупреждения воспалительного, иммунного или злокачественного заболевания, расстройства или состояния, может быть определено стандартными клиническими способами. Кроме того, необязательно, в качестве вспомогательных средств для установления оптимальных диапазонов дозировок могут быть использованы *in vitro* анализы. Точная доза, которую следует использовать в препарате, также будет зависеть от способа введения и серьезности заболевания, расстройства или состояния, и ее следует выбирать в соответствии с мнением практикующего врача и спецификой каждого пациента. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных из систем испытаний *in vitro* или на животных моделях.

[0129] В качестве общего предложения, дозировка антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению, вводимая пациенту, обычно составляет от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела пациента, от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг массы тела пациента или от 1 мг/кг до 10 мг/кг массы тела пациента. Как правило, человеческие антитела имеют более длительный период полужизни в организме человека, чем антитела, происходящие из других видов, что связано с иммунным ответом на чужеродные полипептиды. Таким образом, часто возможно использование более низких дозировок человеческих антител и меньшей частоты введения. Кроме того, дозировка и частота введения антител согласно изобретению может быть уменьшена за счет усиления

поглощения и проникновения антител в ткани (например, в мозг) с помощью модификаций, таких как, например, липидирование.

[0130] В дополнительном варианте реализации композиции согласно изобретению вводят в комбинации с цитокинами. Цитокины, которые могут быть введены с композициями согласно изобретению, включают, не ограничиваясь перечисленным, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, анти-CD40, CD40L и TNF- α .

[0131] В дополнительных вариантах реализации композиции согласно изобретению вводят в комбинации с другими терапевтическими или профилактическими схемами, такими как, например, радиационная терапия.

Способы диагностики

[0132] Сверхэкспрессия SIRP α наблюдается в некоторых образцах опухолей, и пациенты, имеющие сверхэкспрессирующие SIRP α клетки, вероятно, будут отвечать на лечение антителами к SIRP α согласно настоящему изобретению. Соответственно, антитела согласно настоящему изобретению также могут применяться в целях диагностики и прогнозирования.

[0133] Образец, который предпочтительно включает клетку, может быть получен от пациента, который может представлять собой больного раком или пациента, ожидающего диагностики. Клетка может представлять собой клетку опухолевой ткани или опухолевого блока, образца крови, образца мочи или любого образца от пациента. После необязательной предварительной обработки образца он может быть инкубирован с антителом согласно настоящему изобретению в условиях, обеспечивающих возможность взаимодействия антитела с белком SIRP α , потенциально присутствующим в образце. Могут быть использованы такие способы, как ELISA, в которых используют антитело к SIRP α для обнаружения присутствия белка SIRP α в образце.

[0134] Определение присутствия белка SIRP α в образце (необязательно с определением количества или концентрации) может применяться для диагностики рака, как свидетельство того, что пациент подходит для лечения антителом, или как свидетельство того, что пациент ответил (или не ответил) на лечение рака. Для способа

прогнозирования обнаружение может быть осуществлено один, два или более раз, на определенных стадиях, после начала лечения рака, чтобы проверить ход лечения.

Композиции

[0135] Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям. Такие композиции содержат эффективное количество антитела и приемлемый носитель. В некоторых вариантах реализации композиция дополнительно включает второй противораковый агент (например, ингибитор иммунных контрольных точек).

[0136] В отдельном варианте реализации термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный федеральным или региональным надзорным органом или указанный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее как подходящий для применения у животных и, более конкретно, у человека. Кроме того, «фармацевтически приемлемый носитель» обычно представляет собой нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательную композицию любого типа.

[0137] Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или наполнителю, с которым вводится терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобные. Вода является предпочтительным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Физиологические растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают 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 тому подобное. Композиция при необходимости может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или буферных агентов, таких как ацетаты, цитраты или фосфаты. Также предусмотрены антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как

этилендиаминтетрауксусная кислота; и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Эти композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, драже, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и тому подобного. Композиция может быть получена в виде суппозитория с традиционными связующими агентами и носителями, такими как триглицериды. Пероральный препарат может включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния фармацевтической степени чистоты и т. д. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в источнике Remington's Pharmaceutical Sciences за авт. E. W. Martin, включенном в настоящую заявку посредством ссылки. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего полипептида, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Препарат должен соответствовать способу введения. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика.

[0138] В одном варианте реализации рецептура композиции разработана в соответствии с рутинными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения людям. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буферном растворе. При необходимости композиция может также включать солюбилизирующий агент и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Обычно ингредиенты поставляются либо по отдельности, либо в виде смеси в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Если композиция подлежит введению путем инфузии, она может быть помещена, например, в инфузионный флакон, содержащий стерильную воду фармацевтической степени чистоты или физиологический раствор. Если композиция подлежит введению путем инъекции, может быть обеспечена ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, так что ингредиенты могут быть смешаны перед введением.

[0139] Соединения согласно изобретению могут быть включены в состав препарата в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такими как соли, полученные с соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислотами и т. д., и соли, образованные с катионами, такими как соли, полученные с натрием, калием, аммонием, кальцием, гидроксидами железа (III), изопропиламином, триэтиламином, 2-этиламиноэтанолом, гистидином, прокаином и т. д.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение мышинных моноклональных антител к SIRPa человека

[0140] Белок SIRPa человека использовали для иммунизации различных линий мышей, и соответствующим образом генерировали гибридомы. Было сделано восемь слияний для получения достаточного количества клонов гибридомы. SIRPa v1/v2-положительные связующие вещества отбирали и субклонировали. Затем проводили *in vitro* связывание и функциональный скрининг с использованием около 30 очищенных антител и выявляли лучшие антитела с самой высокой аффинностью связывания и самой сильной функциональной активностью. Лучшие антитела были гуманизированы.

[0141] Последовательности VH/VL лучших мышинных антител представлены в таблице ниже.

Таблица 1. Последовательность VH/VL лучших мышинных антител

Название	Последовательность (CDR подчеркнуты)	SEQ ID NO:
248G3F6 VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNFD <u>DTYMH</u> WVKQRPDQGLEWIGR <u>IDPADGDTKYNPKFQD</u> KATITVDTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCVR <u>GN</u> <u>YVN</u> WGQGTTLTVSS	1
248G3F6 VL	QIVLIQSPAISASPGERVTLT <u>CRASSVSSSYLY</u> WYQQKPGSSPKLWIY <u>STSNLAS</u> GVPARFSGSGSGTSYSLTISSEAEADAASYFC <u>HQWYSYPRT</u> FG GGTKLEIK	2
300A6A6 VH	QVQLQQSGTELVKPGSSVKISCKASGYTFT <u>SNYIHW</u> IRQQPGNGLEWIGW <u>IYPGDGDTNYNQKFNG</u> KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDYAVYFCAINY <u>GGIWFA</u> YWGQGTTLTVSS	3
300A6A6 VL	DIQMTQSPSSMSASLGDRVITITC <u>QASQDIGNKLI</u> WFQQKPGKSPRLMIHY <u>VTNLP</u> GVPLRFSGSGSGSDYSLTISSEEDMADYYC <u>LQYKQNPLT</u> FGS GTKLEIK	4
102A10F2 VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSIN <u>TYDIGMG</u> WIRQPSGKGLEWL <u>AHIW</u> NDREYYSALQSRTISKDTSNTQVFLKIASVDTADTATYYCVRI <u>DYFGSGQAWFTY</u> WGQGTTLTVSA	5
102A10F2 VL	EIVLTQSPPTMAASPGEKITITC <u>SSSSTISSTYLH</u> WYQQKPGFSPKLLIS <u>GTSN</u> LASGVPPRFSGSGSGTSYSLTIGTLEAEDVATYYC <u>QQGSRIPT</u> FG SGTKLEIK	6

62D2H6 VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK <u>DYYMH</u> WVKQRT EQGLEWIGR <u>IDPEDGETKYAPKFQG</u> KATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCSR SW <u>AYWGQGTTLTVSS</u>	7
62D2H6 VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTCS <u>SASSSVSSSYLY</u> WYQQKPGSSPKLWIY <u>STSNLAS</u> GVPARFSGSGSGTSYSLTISSEAEADAASYFC <u>HWSSYPRT</u> FG GGTKLEIK	8
211F8E11 VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK <u>DTYMH</u> WVKQRP EQGLEWVGR <u>IDPANVTIYDPKFQG</u> KATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCAR VG <u>AYDGYDFDY</u> WGQGTTLTVSS	9
211F8E11 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCR <u>ASEVDNYGNSFMH</u> WYQQKPGQPPKL LIY <u>RASNLES</u> GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYC <u>QONNEDPL</u> <u>TFGAGTKLEIK</u>	10
217D11E5 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT <u>SYVMH</u> WVKQKPGQGLEWIGY <u>INPYNDGTKYNEKFKG</u> KATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAR SY <u>YDYDGSFDY</u> WGQGTTLTVSS	11
217D11E5 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCK <u>ASQDVTTAVAWY</u> QQKSGQSPKLLIY S <u>ASYRYT</u> GDPDFRTGSGSGTDFFTFTISSVQAEDLAVYYC <u>QOHYSTPWT</u> FGG GTKLEIK	12
234B7D5 VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNFED <u>DTYIH</u> WVKQRPDQGLEWIGR <u>IDPADGDTKHNPKFHD</u> KATVTVDTSSNTAYLELSSLTSEDTAVYYCVR GN <u>YVNWGQGTTLTVSS</u>	13
234B7D5 VL	QIVLIQSPAIMSASPGERVTLTCR <u>ASSSVTSSSYLY</u> WYQQKPGSSPKLWIY <u>SASNLAS</u> GVPARFSGSGSGTSYSLTISSEAEADAASYFC <u>HWYSYPRT</u> FG GGTKLEIK	14

Пример 2. Перекрестное связывание SIRPα v1 и v2

[0142] В этом примере измеряли дозозависимый ответ связывания в ELISA мышиного mAb к SIRPα с рекомбинантным белком SIRPα варианта 1 и варианта 2 человека (0,5 мкг/мл в дозе 100 мкл). Рекомбинантный белок SIRPα v1 или v2 человека (Biointron) наносили в концентрации 0,5 мкг/мл в PBS на микротитровальные планшеты на 2 ч при комнатной температуре. После нанесения антигена лунки блокировали PBS/0,05% твином (PBST) с 1% BSA в течение 1 часа при комнатной температуре.

[0143] После промывки лунок PBST в лунки добавляли различные концентрации антител к SIRPα и инкубировали в течение 1 при комнатной температуре. Для обнаружения связывающих антител добавляли HRP-конъюгированные вторичные антитела к мышиному Fc (Jackson Immuno Research) с последующим добавлением флуорогенных субстратов (Roche). Между всеми этапами инкубации лунки планшета трижды промывали PBST. Флуоресценцию измеряли в устройстве для считывания планшетов TECAN Spectrafluor.

[0144] Результаты показаны на **ФИГ. 1**. Оба протестированных антитела, 248G3F6 и 300A6A6, продемонстрировали аффинность на уровне нанограммов к обоим вариантам 1 и 2.

[0145] Анализ кинетики связывания антитела с вариантом 1 проводили с использованием системы Biacore 8K с помощью подхода с захватом человеческих антител. IgG к мышиному Fc иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 в соответствии с инструкцией производителя. Исследуемое антитело вводили и захватывали иммобилизованным IgG к человеческому Fc. По отдельности вводили последовательные концентрации антигена и регистрировали профиль связывания для аналита-антигена в каждой концентрации, соответственно.

[0146] Аналитическую систему регенерировали путем введения 10 мМ глицина-HCl, pH 1,5, в течение 30 секунд. Рабочий буфер представлял собой HBS-EP+ (10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА и 0,05% P20). Температура проведения анализа составляла 25 °C, а время ассоциации и диссоциации составляло 180 и 600 секунд, соответственно. Данные Biacore аппроксимировали с использованием программного обеспечения для оценки Biacore K8 1.0 в соответствии с моделью связывания 1:1 для расчета констант скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d), а также константы равновесия (K_D).

[0147] Результаты показаны на **ФИГ. 2** и обобщены в таблице ниже. Оба протестированных антитела проявили превосходную аффинность связывания.

Образец	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)
248G3F6	1,87E+05	3,74E-04	2,00E-09
300A6A6	1,31E+05	1,48E-04	1,13E-09

Пример 3. Конкуренция с CD47

[0148] В этом примере исследовали способность антител к SIRP α конкурировать с CD47 за связывание с SIRP α .

[0149] Рекомбинантный слитый белок CD47-Fc (Acrobiosystems) наносили в концентрации 1 мкг/мл в PBS на микротитровальные планшеты на 16 часов при 4 °C. После блокирования в течение 1 часа 1% BSA в PBST при комнатной температуре добавляли 1 мкг/мл белка SIRP α -His либо в отсутствие, либо в присутствии различных концентраций антител к SIRP α при комнатной температуре на 1 час. Затем планшеты трижды промывали и инкубировали с HRP-конъюгированным вторичным антителом к His в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки в каждую лунку на

30 минут добавляли раствор TMB, останавливали реакцию 2М H₂SO₄ и измеряли OD (оптическую плотность) при 490 нм.

[0150] Как показано на **ФИГ. 3**, как 248G3F6, так и 300A6A6 сильно и дозозависимо ингибировали связывание CD47 с SIRP α .

Пример 4. Индукция опосредованного макрофагами фагоцитоза

[0151] В этом примере исследовали способность антител к SIRP α индуцировать опосредованный макрофагами фагоцитоз.

[0152] Выделяли МНПК (мононуклеарные клетки периферической крови) из крови человека и дифференцировали моноциты в макрофаги в течение 6 дней. Макрофаги моноцитарного происхождения (MDM) соскабливали и повторно высевали в 24-луночные планшеты и оставляли для осуществления адгезии на 24 часа. Линию клеток опухоли человека Raji, которая эндогенно экспрессировала CD47, трансфицировали PD-L1 человека для сверхэкспрессии PD-L1 человека на поверхности. Эти сверхэкспрессирующие PD-L1 клетки Raji выбирали в качестве клеток-мишеней и метили 1 мкМ CFSE в течение 10 минут, затем добавляли к MDM в соотношении 5:1 опухолевых клеток на фагоцит.

[0153] В культуральную систему добавляли антитела к SIRP-альфа и антитело к PD-L1. После инкубации в течение 3 часов нефагоцитированные клетки-мишени смывали PBS, а оставшиеся фагоциты соскабливали, окрашивали антителом C76 к маркеру макрофагов и анализировали с помощью проточной цитометрии. Фагоцитоз измеряли путем гейтирования по клеткам C76⁺, а затем оценки процента клеток CFSE⁺.

[0154] Результаты фагоцитоза опухолевых клеток, экспрессирующих PD-L1, за счет комбинированной обработки антителом к SIRP α и антителом к PD-L1 показаны на **ФИГ. 4**. Комбинация антитела к PD-L1 с любым из антител к SIRP α демонстрировала самый высокий фагоцитоз (две колонки справа).

Пример 5. Гуманизация мышинных mAb

[0155] Гены переменных областей мышинных антител использовали для создания гуманизированных mAb. На первом этапе этого процесса аимнокислотные последовательности VH и VL mAb сравнивали с доступной базой данных

последовательностей генов Ig человека, чтобы найти наиболее совпадающие последовательности генов зародышевой линии Ig человека.

[0156] Аминокислотные последовательности гуманизированного антитела представлены ниже.

Гуманизированные последовательности

A. 248G3F6

Таблица 2A. Гуманизация 248G3F6 – VH

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
248G3F6 VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNFD <u>DTYMH</u> WVKQRPDQGLEWIGR <u>IDPADGDTKYNPKFQD</u> KATITVDTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCVRG <u>N</u> <u>YVNWGQGTTTVTVSS</u>	1
V1 (привитие CDR)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNFD <u>DTYMH</u> WVRQAPGGGLEWMGR <u>IDPADGDTKYNPKFQD</u> RVMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARG <u>N</u> <u>YVNWGQGTTTVTVSS</u>	23
V2 (с обратными мутациями)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNFD <u>DTYMH</u> WVRQAPGGGLEWMGR IDPADGDTKYNPKFQDRVT <u>MT</u> <u>VD</u> TST <u>NTA</u> YMESSLRSEDVAVYYCVRG <u>N</u> YVNWGQGTTTVTVSS	24
V3 (с обратными мутациями)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNFD <u>DTYMH</u> WVRQAPGGGLEWMGR IDPADGDTKYNPKFQDRVT <u>IT</u> <u>VD</u> TST <u>NTA</u> YMESSLRSEDVAVYYCVRG <u>N</u> YVNWGQGTTTVTVSS	25
V4 (с обратными мутациями)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNFD <u>DTYMH</u> WVRQAPGGGLEWMGR IDPA <u>E</u> GDTKYNPKFQDRVT <u>IT</u> <u>VD</u> TST <u>NTA</u> YMESSLRSEDVAVYYCVRG <u>N</u> YVNWGQGTTTVTVSS	26
V5 (с обратными мутациями)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNFD <u>DTYMH</u> WVRQAPGGGLEWMGR IDPAD <u>AD</u> TKYNPKFQDRVT <u>IT</u> <u>VD</u> TST <u>NTA</u> YMESSLRSEDVAVYYCVRG <u>N</u> YVNWGQGTTTVTVSS	27

Таблица 2B. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-H1	DTYMH	15
CDR-H2	RIDPADGDTKYNPKFQD	16
CDR-H3	GNVYN	17
CDR-H2 (v4)	RIDPA <u>E</u> GDTKYNPKFQD	21
CDR-H2 (v5)	RIDPAD <u>AD</u> TKYNPKFQD	22

Таблица 2C. Гуманизация 248G3F6 – VL

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
248G3F6 VL	QIVLIQSPAISASPGERVTLTC <u>RASSSVSSSYLY</u> WYQQKPGSSPKLWIY <u>STSNLAS</u> GVPARFSGSGSTSYSLTISSMEAEADAASYFC <u>HQWYSYPRT</u> FG GGTKLEIK	2
V1 (привитие CDR)	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSC <u>RASSSVSSSYLY</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>STSNLAS</u> GIPDRFSGSGSTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>HQWYSYPRT</u> FG GGTKVEIK	28

V2 (с обратными мутациями)	EIVLTQSPGTL S LSLSPGERATL S CRASSSVSSSYLYWYQ Q KPGQAPRLLIY STSNLASGIPDRFSGSGSGTD Y TLTISRLEPED A AVY F CHQWYSYPRTFG GGTKVEIK	29
----------------------------	--	----

Таблица 2D. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-L1	RASSSVSSSYLY	18
CDR-L2	STSNLAS	19
CDR-L3	HQWYSYPRT	20

Таблица 2E. Гуманизированные антитела

	VL	VL v1	VL v2
VH	HSP210-02-Chi		
VH v1		HSP210-02-hz11	HSP210-02-hz12
VH v2		HSP210-02-hz21	HSP210-02-hz22
VH v3		HSP210-02-hz31	HSP210-02-hz32
VH v4		HSP210-02-hz41	HSP210-02-hz42
VH v5		HSP210-02-hz51	<u>HSP210-02-hz52</u>

B. 300A6A6

Таблица 3A. Гуманизация 300A6A6 – VH

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
300A6A6 VH	QVQLQQSGTELVKPGSSVKISCKASGYTFT S NYIHWIRQQPGNGLEWIGW IYPGDGDTN Y NQKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDYAVYFCAIN Y GGIWFAYWGQGLTVTVSS	3
V1 (привитие CDR)	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGYTFT S NYIHWVRQAPGGGLEWMGW IYPGDGDTN Y NQKFNGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED T AVYYCARN Y GGIWFAYWGQGLTVTVSS	39
V2 (с обратными мутациями)	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGYTFTSNYIHWVRQAPGGGLEWMGW IYPGDGDTN Y NQKFNGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED T AVYYCA I NY GGIWFAYWGQGLTVTVSS	40
V3 (с обратными мутациями)	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGYTFTSNYIHWVRQAPGGGLEWMGW IYPGDGDTN Y NQKFNGRVT L TADKSTSTAYMELSSLRSED T AVYYCA I NY GGIWFAYWGQGLTVTVSS	41
V4 (с обратными мутациями)	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGYTFTSNYIHWVRQAPGGGLEWMGW IYPGE G DTN Y NQKFNGRVT L TADKSTSTAYMELSSLRSED T AVYYCA I NY GGIWFAYWGQGLTVTVSS	42
V5 (с обратными мутациями)	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGYTFTSNYIHWVRQAPGGGLEWMGW IYPGD A DTN Y NQKFNGRVT L TADKSTSTAYMELSSLRSED T AVYYCA I NY GGIWFAYWGQGLTVTVSS	43
V6 (с обратными мутациями)	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGYTFTSNYIHWVRQAPGGGLEWMGW IYPGDGDTN Y NQKF Q GRVT L TADKSTSTAYMELSSLRSED T AVYYCA I NY GGIWFAYWGQGLTVTVSS	44

Таблица 3B. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
-----	--------------------	------------

CDR-H1	SNYIH	30
CDR-H2	WIYPGDGDTNYNQKFNG	31
CDR-H3	NYGGIWFAY	32
CDR-H2 (v4)	WIYPG <u>E</u> GDTNYNQKFNG	36
CDR-H2 (v5)	WIYPGD <u>A</u> DTNYNQKFNG	37
CDR-H2 (v6)	WIYPGDGDTNYNQKF <u>Q</u> G	38

Таблица 3С. Гуманизация 300А6А6 – VL

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
300A6A6 VL	DIQMTQSPSSMSASLGDRVTITCQASQDIGNKLIWFQKPGKSPRLMIHY VTNLPGGVPLRFSGSRSGSDYSLTISSEEDMADYYCLQYKQNPLTFGS GTKLEIK	4
V1 (привитие CDR)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDIGNKLIWYQKPGKAPKLLIYY VTNLPGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYKQNPLTFGQ GTKLEIK	45
V2 (с обратными мутациями)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDIGNKLIWFQKPGKAPKLLIHY VTNLPGGVPSRFSGSRSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQYKQNPLTFGQ GTKLEIK	46

Таблица 3D. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-L1	QASQDIGNKLI	33
CDR-L2	YVTNLPG	34
CDR-L3	LQYKQNPLT	35

Таблица 3Е. Гуманизированные антитела

	VL	VL v1	VL v2
VH	HSP210-03-Chi		
VH v1		HSP210-03-hz11	HSP210-03-hz12
VH v2		HSP210-03-hz21	HSP210-03-hz22
VH v3		HSP210-03-hz31	HSP210-03-hz32
VH v4		HSP210-03-hz41	HSP210-03-hz42
VH v5		<u>HSP210-03-hz51</u>	HSP210-03-hz52
VH v6		HSP210-03-hz61	HSP210-03-hz62

C. 102A10F2

Таблица 4А. Гуманизация 102A10F2 – VH

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
102A10F2 VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLNTYDIGMGWIRQPSGKGLEWLAH IWWNDREYYNSALQSRVTISKDTSTQVFLKIASVDTADTATYYCVRIDYFG SGQAWFTYWGQGTLVTVSA	5
V1 (привитие CDR)	QLQLQESGPGILVKPSETLSLTCTVSGFSLNTYDIGMGWIRQPPGKGLEWIGH IWWNDREYYNSALQSRVTISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARIDYFG SGQAWFTYWGQGTLVTVSS	55

V2 (с обратными мутациями)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTFSGFSLNTYDIGMGWIRQPPGKGLEWIGH IWWNDREYYNSALQSRVTISKDTSKTQVSLKLSSVTAADTAVYYCVRIDYFG SGQAWFTYWGQGTLLTVSS	56
V3 (с обратными мутациями)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTFSGFSLNTYDIGMGWIRQPPGKGLEWIAH IWWNDREYYNSALQSRVTISKDTSKTQVSLKLSSVTAADTAVYYCVRIDYFG SGQAWFTYWGQGTLLTVSS	57
V4 (с обратными мутациями)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTFSGFSLSTYDIGMGWIRQPPGKGLEWIAH IWWNDREYYNSALQSRVTISKDTSKTQVSLKLSSVTAADTAVYYCVRIDYFG SGQAWFTYWGQGTLLTVSS	58
V5 (с обратными мутациями)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTFSGFSLNTYDIGMGWIRQPPGKGLEWIAH IWWNDREYYNSALQSRVTISKDTSKTQVSLKLSSVTAADTAVYYCVRIDYFG SGQAWFTYWGQGTLLTVSS	59
V6 (с обратными мутациями)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTFSGFSLNTYDIGMGWIRQPPGKGLEWIAH IWWNDREYYNPALQSRVTISKDTSKTQVSLKLSSVTAADTAVYYCVRIDYFG SGQAWFTYWGQGTLLTVSS	60

Таблица 4В. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-H1	TYDIGMG	47
CDR-H2	HIWWNDREYYNSALQS	48
CDR-H3	IDYFGSGQAWFTY	49
CDR-H2 (v5)	HIWWNDREYYSSALQS	53
CDR-H2 (v6)	HIWWNDREYYNPALQS	54

Таблица 4С. Гуманизация 102A10F2 – VL

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
102A10F2 VL	EIVLTQSPPTMAASPGEKITITCSSSSTISSTYLHWYQQKPGFSPKLLIS GTSNLAGVPPRFSGSGSGTSYSLTIGTLEAEDVATYYCQOGSRIPFTFG SGTKLEIK	6
V1 (привитис CDR)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSSSSTISSTYLHWYQQKPGQAPRLLIY GTSNLAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOGSRIPFTFG QGTKLEIK	61
V2 (с обратными мутациями)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSSSSTISSTYLHWYQQKPGQAPRLLIIS GTSNLAGIPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDYAVYYCQOGSRIPFTFG QGTKLEIK	62

Таблица 4D. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-L1	SSSSTISSTYLH	50
CDR-L2	GTSNLAG	51
CDR-L3	QOGSRIPFT	52

Таблица 3Е. Гуманизированные антитела

	VL	VL v1	VL v2
VH	HSP210-01-Chi		
VH v1		HSP210-01-hz11	HSP210-01-hz12
VH v2		HSP210-01-hz21	HSP210-01-hz22
VH v3		HSP210-01-hz31	HSP210-01-hz32

VH v4		HSP210-01-hz41	HSP210-01-hz42
VH v5		HSP210-01-hz51	HSP210-01-hz52
VH v6		HSP210-01-hz61	HSP210-01-hz62

D. 62D2H6

Таблица 5A. Гуманизация 62D2H6 – VH

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
62D2H6 VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIDYIMHWVKQRTEQGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQGGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDNAVYYCSRWAYWGQGTTLTVSS	7
V1 (привитие CDR)	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYIMHWVQAPGKGLEWMGRIDPEDGETKYAPKFQGGKRVITADTSTDYAMELSSLRSEDNAVYYCATSWAYWGQGTTVTVSS	69
V2 (с обратными мутациями)	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDYIMHWVQAPGKGLEWMGRIDPEDGETKYAPKFQGGKRVITADTSTNTAYAMELSSLRSEDNAVYYCSRWAYWGQGTTVTVSS	70
V3 (химерное 2)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYIMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPEDGETKYAPKFQGGKMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDNAVYYCARSWAYWGQGTTVTVSS	71
V4 (с обратными мутациями)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYIMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPEDGETKYAPKFQGGKMTADTSTNTAYAMELSSLRSEDNAVYYCSRWAYWGQGTTVTVSS	72

Таблица 5B. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-H1	DYYMH	63
CDR-H2	RIDPEDGETKYAPKFQGG	64
CDR-H3	SWAY	65

Таблица 5C. Гуманизация 62D2H6 – VL

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
62D2H6 VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTCSASSSVSSSYLYWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEADAASYFCHQWSSYPRTFGGGTKLEIK	8
V1 (привитие CDR)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASSSVSSSYLYWYQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCHQWSSYPRTFGGGTKVEIK	73
V2 (с обратными мутациями)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASSSVSSSYLYWYQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSELEPEDAAVYFCHQWSSYPRTFGGGTKVEIK	74
V3 (химерное 2)	EIVMTQSPPTLSLSPGERVTLSLSCASSSVSSSYLYWYQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCHQWSSYPRTFGGGTKVEIK	75
V4 (с обратными мутациями)	EIVMTQSPPTLSLSPGERVTLSLSCASSSVSSSYLYWYQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISLQPEDAAVYFCHQWSSYPRTFGGGTKVEIK	76

Таблица 5D. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-L1	SASSSVSSSYLY	66
CDR-L2	STSNLAS	67
CDR-L3	HQWSSYPRT	68

Таблица 5E. Гуманизированные антитела

	VL	VL v1	VL v2	VL v3	VL v4
VH	Химерное				
VH v1		hz11			
VH v2			hz22		hz24
VH v3				hz33	
VH v4			hz42		hz44

E. 211F8E11**Таблица 6A. Гуманизация 211F8E11 – VH**

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
211F8E11 VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRPEQGLEWVGR <u>IDPANVNTIYDPKFQG</u> KATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCARV <u>G</u> <u>AYDGYDFDY</u> WGQGTTLTVSS	9
V1 (привитие CDR)	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDTYMHVWVQAPGKGLEWMGR <u>IDPANVNTIYDPKFQG</u> RVITADTSTDYAMELSSLRSEDVAVYYCATV <u>G</u> <u>AYDGYDFDY</u> WGQGTTLTVSS	83
V2 (с обратными мутациями)	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDTYMHVWVQAPGKGLEWMGR IDPANVNTIYDPKFQGRVTITADTSTNTAYAMELSSLRSEDVAVYYCARVG AYDGYDFDYWGQGTTLTVSS	84
V3 (химерное 2)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNIKDTYMHVVRQAPGQGLEWMGR IDPANVNTIYDPKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARVG AYDGYDFDYWGQGTTLTVSS	85
V4 (с обратными мутациями)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNIKDTYMHVVRQAPGQGLEWMGR IDPANVNTIYDPKFQGRVTMTADTSTNTAYAMELSSLRSEDVAVYYCARVG AYDGYDFDYWGQGTTLTVSS	86

Таблица 6B. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-H1	DTYMH	77
CDR-H2	RIDPANVNTIYDPKFQG	78
CDR-H3	VGAYDGYDFDY	79

Таблица 6C. Гуманизация 211F8E11 – VL

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
----------	--------------------	------------

211F8E11 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLI YRASNLESIGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQNNEDPLTFGA GTKLEIK	10
V1 (привитие CDR)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLI YRASNLESIGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQNNEDPLTFGQ GTKLEIK	87
V2 (с обратными мутациями)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLI YRASNLESIGVPDRFSGSGSRTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQNNEDPLTFGQ GTKLEIK	88
V3 (химерное 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVDNYGNSFMHWYQQKPGKVPKLLI YRASNLESIGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQNNEDPLTFGQ GTKLEIK	89
V4 (с обратными мутациями)	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVDNYGNSFMHWYQQKPGKVPKLLI YRASNLESIGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVATYYCQQNNEDPLTFGQ GTKLEIK	90

Таблица 6D. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-L1	RASESVDNYGNSFMH	80
CDR-L2	RASNLES	81
CDR-L3	QQNNEDPLT	82

Таблица 6E. Гуманизированные антитела

	VL	VL v1	VL v2	VL v3	VL v4
VH	Химерное				
VH v1		hz11			
VH v2			hz22		hz24
VH v3				hz33	
VH v4			hz42		hz44

F. 217D11E5

Таблица 7A. Гуманизация 217D11E5 – VH

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
217D11E5 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGY INPYNDGTTYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARSY YDYDGSFDYWGGTTTLTVSS	11
V1 (привитие CDR)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWMGY INPYNDGTTYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSY YDYDGSFDYWGGTTTVTVSS	97
V2 (с обратными мутациями)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWMGY INPYNDGTTYNEKFKGRVTITSDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSY YDYDGSFDYWGGTTTVTVSS	98
V3 (химерное 2)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQGLEWMGY INPYNDGTTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARSY YDYDGSFDYWGGTTTVTVSS	99

V4 (с обратными мутациями)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWVRQAPGGLEWMGY INPYNDGTYNEKFKGRVTMTSDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSY YDYDGSFDYWGQGTITVTVSS	100
----------------------------	--	-----

Таблица 7B. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-H1	SYVMH	91
CDR-H2	YINPYNDGTYNEKFKG	92
CDR-H3	SYDYDGSFDY	93

Таблица 7C. Гуманизация 217D11E5 – VL

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
217D11E5 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVTTAVAWYQQKSGQSPKLLIYSAS YRYTGDPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKL EIK	12
V1 (привитие CDR)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVTTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS YRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDVATYYCQQHYSTPWTFGGGTKV EIK	101
V2 (химерное 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVTTAVAWYQQKPGKVPKLLIYSAS YRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQHYSTPWTFGGGTKV EIK	102

Таблица 7D. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-L1	KASQDVTTAVA	94
CDR-L2	SASYRYT	95
CDR-L3	QQHYSTPWT	96

Таблица 7E. Гуманизированные антитела

	VL	VL v1	VL v2
VH	Химерное		
VH v1		hz11	
VH v2		hz21	hz22
VH v3			
VH v4		hz41	hz42

G. 234B7D5

Таблица 8A. Гуманизация 234B7D5 – VH

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
234B7D5 VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNFE DTYIH WVKQRPDQGLEWIGRID PADGDTKHNPKFHD KATVTVDTSSNTAYLELSSLTSEDVAVYYCVRGNYVNW GQGTTLTVSS	13

V1 (привитие CDR)	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNFEDTYIHVWVQAPGKGLEWMGRID <u>PADGDTKHNPKEFHD</u> RVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT <u>GNVYNW</u> GQGTTVTVSS	109
V2 (с обратными мутациями)	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNFEDTYIHVWVQAPGKGLEWMGRID PADGDTKHNPKEFHDRVITITVDTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCVRGNYVNW GQGTTVTVSS	110
V3 (химерное 2)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNFEDTYIHVWRQAPGQGLEWMGRID PADGDTKHNPKEFHDRVMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGNYVNW GQGTTVTVSS	111
V4 (с обратными мутациями)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNFEDTYIHVWRQAPGQGLEWMGRID PADGDTKHNPKEFHDRVMTVDTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCVRGNYVNW GQGTTVTVSS	112

Таблица 8B. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-H1	DTYIH	103
CDR-H2	RIDPADGDTKHNPKEFHD	104
CDR-H3	GNVYN	105

Таблица 7C. Гуманизация 234B7D5 – VL

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
234B7D5 VL	QIVLIQSPAIMASASPGERVTLTCSRASSVTSSYLYWYQQKPGSSPKLWIYSA <u>SNLAS</u> GVPAFSGSGSGTSLTISSEAEADAASYFCHQWYSYPRTFGGGTK LEIK	14
V1 (привитие CDR)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSTSSYLYWYQQKPGQAPRLLIYSA <u>SNLAS</u> GI PARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCHQWYSYPRTFGGGTK VEIK	113
V2 (с обратными мутациями)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSTSSYLYWYQQKPGQAPRLLIYSA SNLASGI PARFSGSGSGTDYTLTISSELEPEDAAVYFCHQWYSYPRTFGGGTK VEIK	114
V3 (химерное 2)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASSTSSYLYWYQQKPGQAPRLLIYSA SNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQWYSYPRTFGGGTK VEIK	115
V4 (с обратными мутациями)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASSTSSYLYWYQQKPGQAPRLLIYSA SNLASGIPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDAAVYFCHQWYSYPRTFGGGTK VEIK	116
V5 (химерное 3)	EIVMTQSPPTLSLSPGERVTLSRASSTSSYLYWYQQKPGQAPRLLIYSA SNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCHQWYSYPRTFGGGTK VEIK	117
V6 (с обратными мутациями)	EIVMTQSPPTLSLSPGERVTLSRASSTSSYLYWYQQKPGQAPRLLIYSA SNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISLQPEDAAVYFCHQWYSYPRTFGGGTK VEIK	118

Таблица 8D. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
-----	--------------------	------------

CDR-L1	RASSSVTSSYL	106
CDR-L2	SASNLAS	107
CDR-L3	HQWYSYPRT	108

Таблица 8Е. Гуманизированные антитела

	VL	VL v1	VL v2	VL v3	VL v4	VL v5	VL v6
VH	Химерное						
VH v1		hz11					
VH v2			hz22		hz24		hz26
VH v3				hz33			
VH v4			hz42		hz44		hz46

Пример 6. Тестирование гуманизированных антител

[0157] В данном примере тестировали некоторые из гуманизированных антител на способность блокировать взаимодействия между SIRPα и CD47.

[0158] Рекомбинантный слитый белок CD47-Fc (Acrobiosystems) наносили в концентрации 1 мкг/мл в PBS на микротитровальные планшеты на 16 часов при 4 °C. После блокирования в течение 1 часа 1% BSA в PBST при комнатной температуре добавляли 1 мкг/мл белка SIRPα-His либо в отсутствие, либо в присутствии различных концентраций антител к SIRPα при комнатной температуре на 1 час. Затем планшеты трижды промывали и инкубировали с HRP-конъюгированным вторичным антителом к His в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки в каждую лунку на 30 минут добавляли раствор TMB, останавливали реакцию 2M H₂SO₄ и измеряли OD при 490 нм.

[0159] Все антитела, перечисленные в **Таблицах 2Е** (248G3F6), **3Е** (300A6A6) и **4Е** (102A10F2), были протестированы и продемонстрировали высокое значение IC₅₀ (**Таблица 9**).

Таблица 9. Активность гуманизированных антител в отношении блокирования взаимодействия SIRPα с CD47

	Антитело	IC ₅₀ (нМ)
248G3F6	02-chi	0,14
	02-hz22	0,092
	02-hz32	0,11
	02-hz42	0,12
	02-hz52	0,11
300A6A6	03-chi	0,14
	03-hz22	0,16
	03-hz32	0,145

102A10F2	03-hz42	0,13
	03-hz52	0,13
	01-hz22	0,21
	01-hz32	0,16
	01-hz52	0,23
	01-hz61	0,21
	01-hz62	0,16

Пример 7. Повышение опосредованного макрофагами фагоцитоза опухолевых клеток

[0160] В данном примере тестировали некоторые из гуманизированных антител на их способность увеличивать опосредованный макрофагами фагоцитоз опухолевых клеток.

[0161] Выделяли МНПК из крови человека и дифференцировали моноциты в макрофаги, используя стандартный протокол. Макрофаги моноцитарного происхождения (MDM) соскабливали и повторно высевали в 24-луночные планшеты и оставляли для осуществления адгезии на 24 часа. Линию клеток опухоли человека Raji, которая эндогенно экспрессировала CD47, выбирали в качестве клеток-мишеней и метили 1 мкМ CFSE в течение 10 минут, затем добавляли к MDM в соотношении 5:1 опухолевых клеток на фагоцит и добавляли различные концентрации антител к SIRP α в указанных концентрациях. После 3 ч инкубации нефагоцитированные клетки-мишени смывали PBS, а оставшиеся фагоциты соскабливали, окрашивали антителом C76 и анализировали с помощью проточной цитометрии. Фагоцитоз измеряли путем гейтирования по клеткам C76⁺, а затем оценки процента клеток CFSE⁺.

[0162] Результаты представлены на **ФИГ. 5**. Из протестированных антител 02-hz52 (248G3F6) и 03-hz51 (300A6A6) проявляли наибольшую активность, и все остальные также проявляли превосходную активность.

Пример 8. Аффинность связывания с SIRP α v1 и v2

[0163] В данном примере гуманизированные антитела 02-hz52 (248G3F6) и 03-hz51 (300A6A6) тестировали на их аффинность связывания с SIRP α v1 и v2.

[0164] Анализ кинетики связывания антитела с антигеном проводили с использованием системы Biacore 8K с помощью подхода с захватом человеческих антител. IgG к мышиному Fc иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 в соответствии с инструкцией производителя. Исследуемое антитело вводили и захватывали

иммобилизованным IgG к человеческому Fc. Затем по отдельности вводили последовательные концентрации белка SIRP α v1 или SIRP α v2 человека, и регистрировали профиль связывания для аналита-антигена в каждой концентрации, соответственно. Аналитическую систему регенерировали путем введения 10 mM глицина-HCl, pH 1,5, в течение 30 секунд. Рабочий буфер представлял собой HBS-EP+ (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,05% P20). Температура проведения анализа составляла 25 °C, а время ассоциации и диссоциации составляло 180 и 600 секунд, соответственно. Данные Biacore аппроксимировали с использованием программного обеспечения для оценки Biacore K8 1.0 в соответствии с моделью связывания 1:1 для расчета констант скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d), а также константы равновесия (KD).

[0165] Результаты тестов показаны в **Таблице 10А-В**.

Таблица 10А. Аффинность связывания с SIRP α v1

Образец	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)
02-hz52	7,04E+05	2,98E-04	4,23E-10
03-hz51	8,05E+05	8,04E-04	9,99E-10

Таблица 10В. Аффинность связывания с SIRP α v2

Образец	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)
02-hz52	3,33E+05	2,47E-03	7,40E-09
03-hz51	3,31E+05	1,00E-03	3,03E-09

Пример 9. Исследования пригодности к производству

[0166] Антитела 02-hz52 (248G3F6) и 03-hz51 (300A6A6), слитые с человеческими константными областями тяжелой цепи IgG4 и константными областями легкой каппа-цепи, тестировали на их пригодность к производству. Оба антитела не содержат свободных цистеинов. Результаты тестирования показали, что оба антитела могут быть очищены для достижения клинической степени чистоты, имеют подходящие T_m , соотношения кислотного/основного пиков, гидрофобность и pI. Результаты представлены в **Таблице 11**.

[0167] Таблица 10А. Аффинность связывания с SIRP α v1

Образец	Агрегаты	SEC (% мономера)	Выход (мг/л)	pI	Кислотный пик	Основной пик	Основной пик	T_m pH 7,5 (°C)	НПС (NH ₄) ₂ SO ₄ (М)
---------	----------	------------------	--------------	----	---------------	--------------	--------------	-------------------	---

02-hz52	Не обнаружены	99,2	>10	6,9	35,5	57,2	7,2	65/71	1,02
03-hz51	Не обнаружены	97,91	>10	7,9	34,5	62,3	3,2	65/74	0,96

Пример 10. Исследование *in vivo*

[0168] В данном примере исследовали эффективность гуманизированного антитела 03-hz51 (300A6A6) у мышей, отдельно или в комбинации с ритуксимабом.

[0169] Клетки Raji-Luc, ресуспендированные в PBS, инокулировали в хвостовую вену гуманизированных мышей B-NDG-hSIRPα при концентрации 1×10^5 клеток/0,2 мл и в объеме 0,2 мл/животное. Для измерения значения сигнала визуализации опухоли на третий день инокуляции использовали небольшое устройство для визуализации организмов животных. Когда средняя интенсивность сигнала визуализации достигала $1,35 \times 10^6$ ф/с, животных делили на группы в соответствии со значением сигнала визуализации опухоли и массой тела животного и равномерно распределяли в 4 экспериментах. В каждой экспериментальной группе было по 6 мышей.

[0170] Ритуксимаб демонстрировал значительное ингибирующее действие на лимфому Raji-Luc на уровне дозы 10 мг/кг, без клинически неблагоприятных симптомов. 03-hz51 в комбинации с ритуксимабом (10 мг/кг + 0,1 мг/кг) продемонстрировало значительное ингибирующее действие на лимфому Raji-Luc. Данные показывают, что 03-hz51 синергически взаимодействовало с ритуксимабом, вызывая полное ингибирование роста опухоли на модели лимфомы Raji.

* * *

[0171] Объем настоящего изобретения не должен быть ограничен отдельными описанными вариантами реализации, которые играют роль отдельных иллюстраций конкретных аспектов изобретения, и любые композиции или способы, которые являются функционально эквивалентными, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники будет понятно, что способы и композиции согласно настоящему изобретению могут быть подвергнуты различным модификациям и вариациям без отклонения от сущности или объема изобретения. Таким образом, подразумевается, что настоящее изобретение охватывает его модификации и вариации при условии, что они входят в объем прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

[0172] Все публикации и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в настоящую заявку посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретным и индивидуальным образом включена посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α) человека дикого типа, где указанные антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где:

- (a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, 21 или 22, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;
- (b) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 36, 37 или 38, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;
- (c) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, 53 или 54, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52;

- (d) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63,
CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64,
CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65,
CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66,
CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 и
CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68;
- (e) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77,
CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78,
CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79,
CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80,
CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81 и
CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82;
- (f) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91,
CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92,
CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93,
CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94,
CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95 и
CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96;
или
- (g) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103,
CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104,
CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105,
CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106,
CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107
и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:
108.

2. Антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α) человека дикого типа, где указанные антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, 21 или 22, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

3. Антитело или его фрагмент по п. 2, отличающиеся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 23-27, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 23-27.

4. Антитело или его фрагмент по п. 2 или п. 3, отличающиеся тем, что указанная переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 28-29, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 28-29.

5. Антитело или его фрагмент по п. 2, отличающиеся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 27, и указанная вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

6. Антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α) человека дикого типа, где указанные антитело или его фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, 36, 37 или 38, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35.

7. Антитело или его фрагмент по п. 6, отличающиеся тем, что указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и 39-44, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и 39-44.

8. Антитело или его фрагмент по п. 6 или п. 7, отличающиеся тем, что указанная вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 45-46, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 45-46.

9. Антитело или его фрагмент по п. 6, отличающиеся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и указанная переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45.

10. Антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α) человека дикого типа, где указанные антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарности участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарности участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, 53 или 54, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

11. Антитело или его фрагмент по п. 10, отличающиеся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 55-60, или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 55-60.

12. Антитело или его фрагмент по п. 10 или п. 11, отличающиеся тем, что указанная переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 61-62, или пептид, по меньшей

мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и 61-62.

13. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-12, способные связываться с вариантом 1 и вариантом 2 SIRP α .

14. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-13, которые являются гуманизированными.

15. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-24, которые дополнительно обладают специфичностью связывания со вторым белком-мишенью.

16. Композиция, содержащая антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-15 и фармацевтически приемлемый носитель.

17. Композиция по п. 16, дополнительно содержащая второе антитело, обладающее специфичностью к опухолевому антигену.

18. Композиция по п. 17, отличающаяся тем, что указанное второе антитело представляет собой опсонизирующее опухоль антитело.

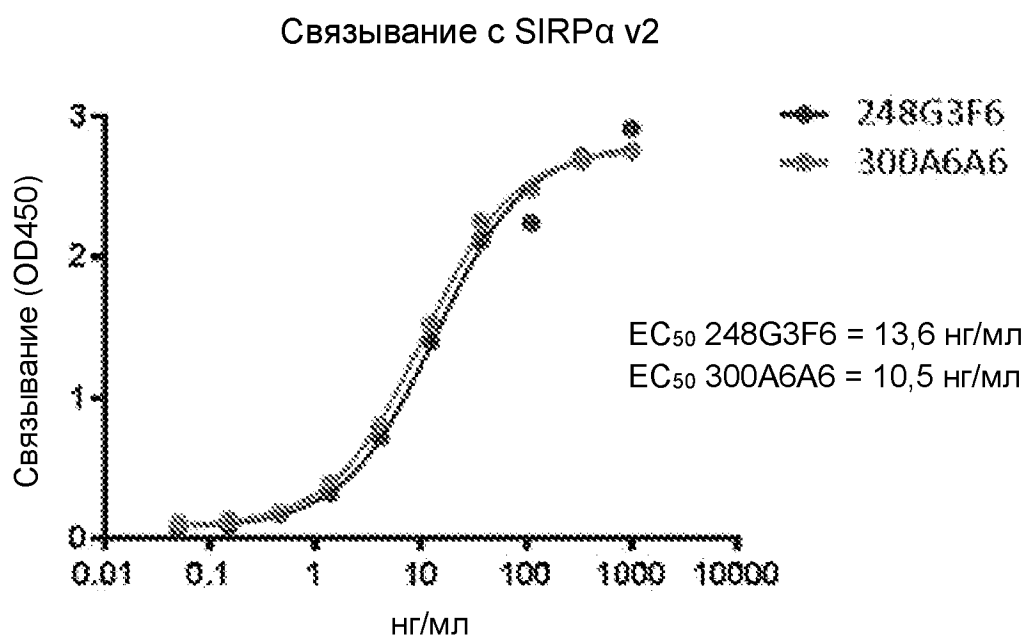
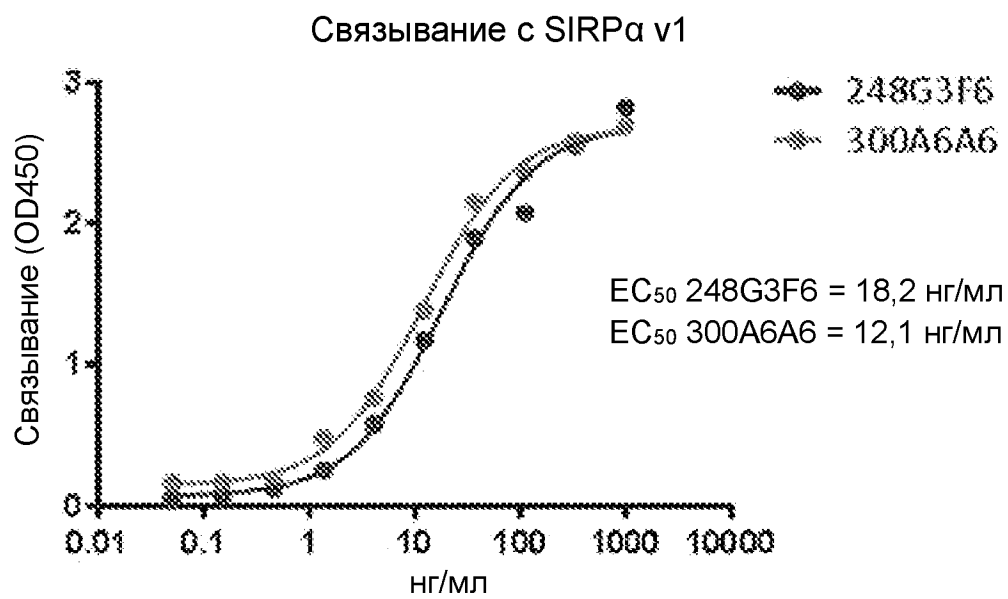
19. Способ лечения рака у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-15.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака печени, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, лейкоза, лимфомы, рака поджелудочной железы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака молочной

железы, рака уретры, рака головы и шеи, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака пищевода, рака яичника, рака почки, меланомы, рака предстательной железы и рака щитовидной железы.

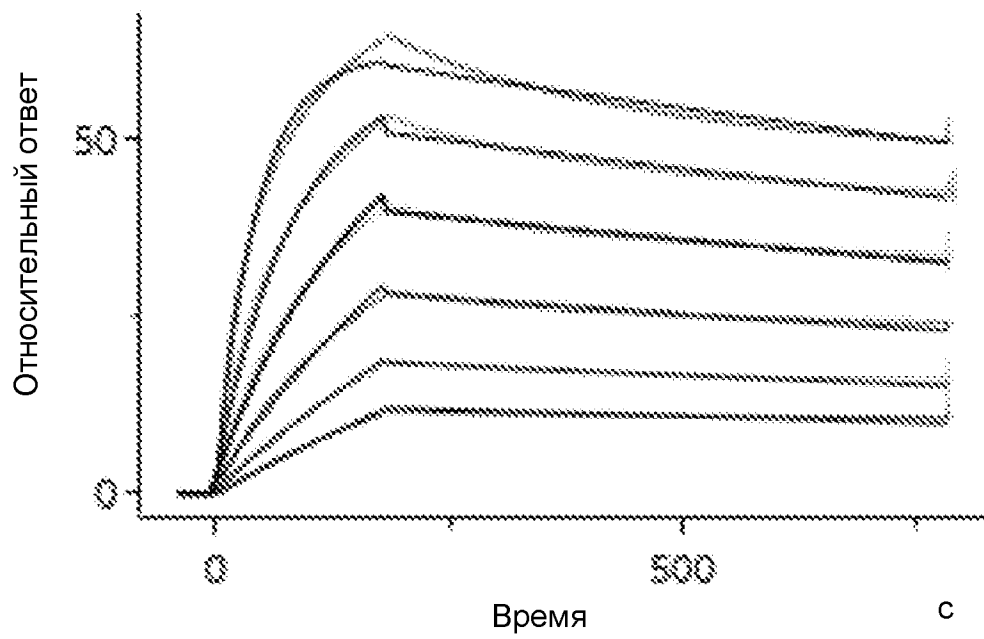
21. Способ по п. 19, дополнительно включающий введение указанному пациенту второго антитела, нацеленного на белок, запускающий опсонизацию опухоли.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что указанный белок выбран из группы, состоящей из CD19, CD20, EGFR, HER2, CD3, CD16, PD1, PD-L1, LAG3, TIM3, CTLA4, VISTA, CSFR1, A2AR, CD73, CD39, CD40, CEA, HER2, VEGFR, TIGIT, клаудина 18.2, CD24, GPC3, P13RA2, 4-1BB, CCR8 и CMET.

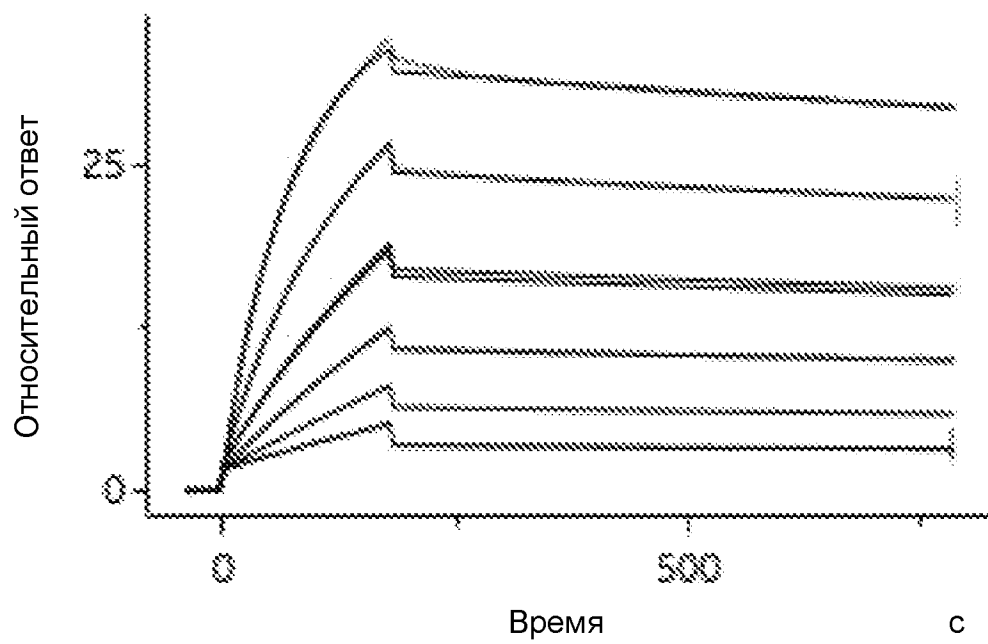


ФИГ. 1

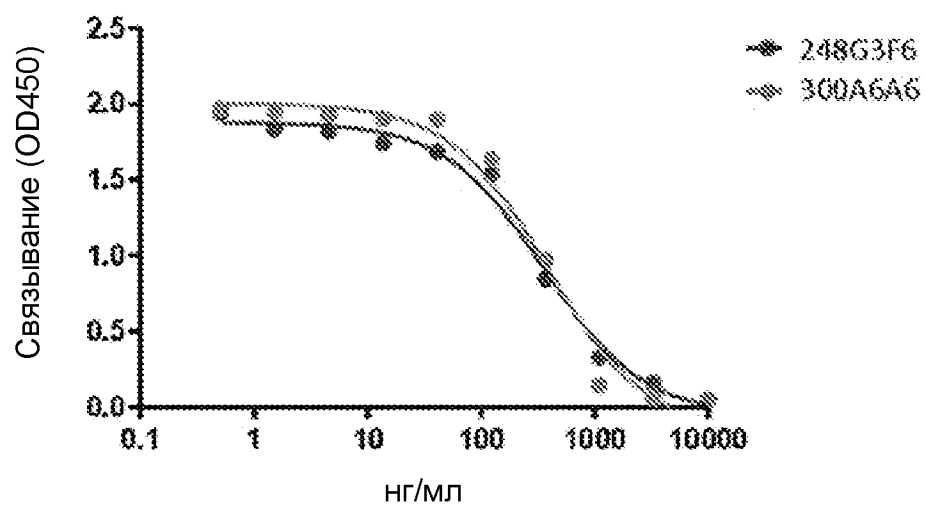
248G3F6



300A6A6



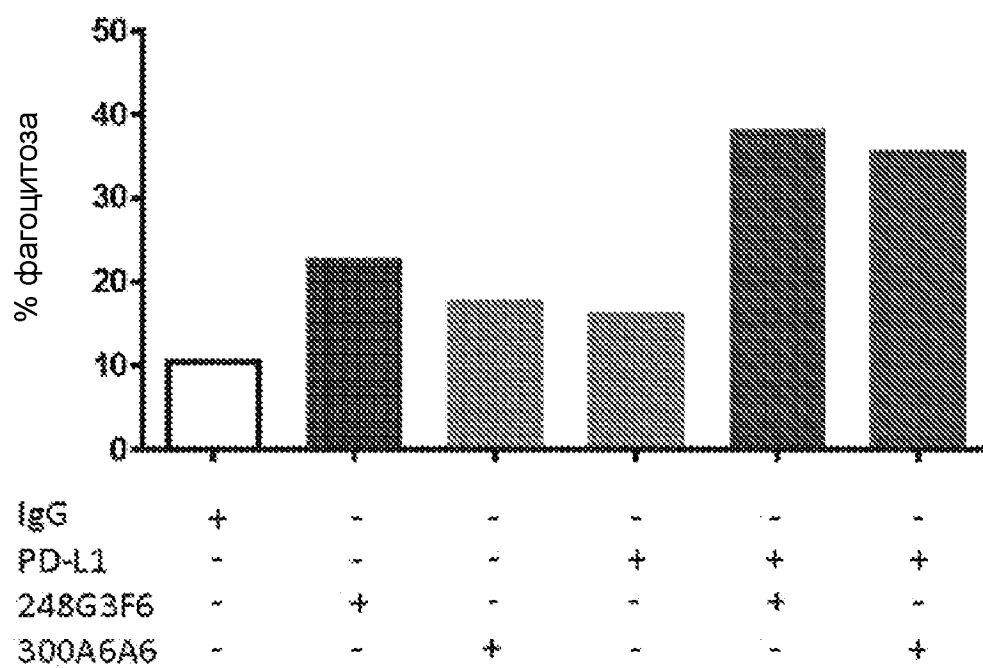
ФИГ. 2



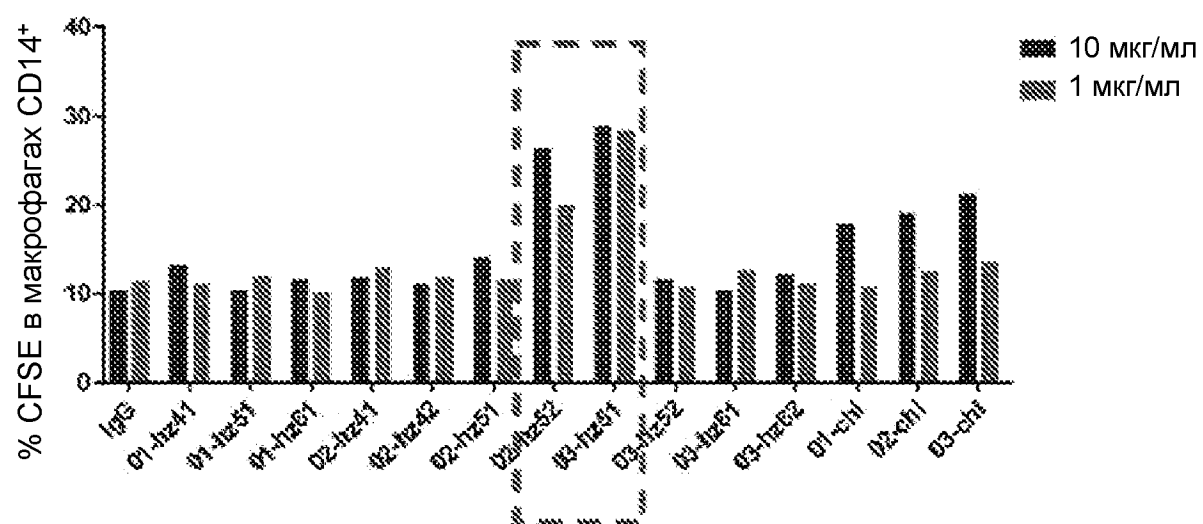
EC₅₀ 248G3F6 = 355,8 нг/мл

EC₅₀ 300A6A6 = 383,1 нг/мл

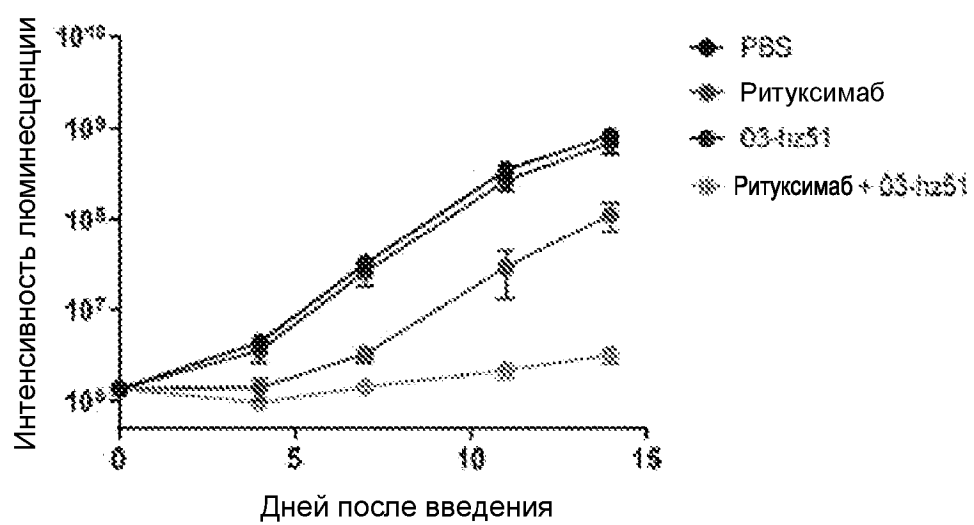
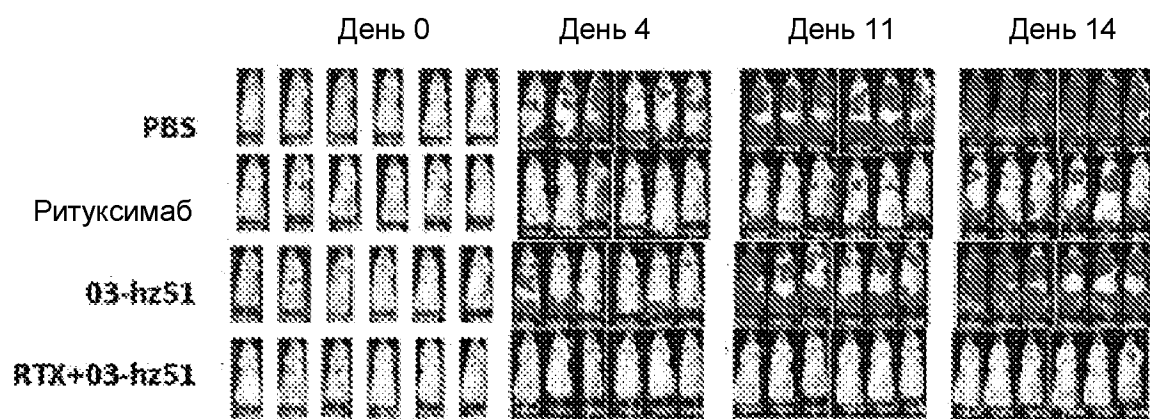
ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6