

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044391**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.08.23

(21) Номер заявки
201891882

(22) Дата подачи заявки
2017.04.14

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К SIRPa И ВАРИАНТЫ ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/322,707; 17305182.2**

(32) **2016.04.14; 2017.02.17**

(33) **US; EP**

(43) **2019.07.31**

(86) **PCT/EP2017/059071**

(87) **WO 2017/178653 2017.10.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОСЕ ИММЮНОТЕРАПЬЮТИКС
(FR)**

(72) Изобретатель:
**Пуарье Николя, Мари Каролина,
Ванхове Бернард, Готье Ванесса,
Тепень Виржини, Пенгам Сабрина
(FR)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) D. HATHERLEY ET AL.: "The Structure of the Macrophage Signal Regulatory Protein (SIRP) Inhibitory Receptor Reveals a Binding Face Reminiscent of That Used by T Cell Receptors", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 282, no. 19, 16 March 2007 (2007-03-16), pages 14567-14575, XP055081473, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M611511200, figure 2

WO-A2-2015138600

LIU ET AL.: "Functional Elements on SIRP@ a IgV Domain Mediate Cell Surface Binding to CD47", JOURNAL OF MOLECULAR BIO, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 365, no. 3, 23 December 2006 (2006-12-23), pages 680-693, XP005733360, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2006.09.079, figure 1

Y. LIU ET AL.: "Signal Regulatory Protein (SIRPalpha), a Cellular Ligand for CD47, Regulates Neutrophil Transmigration", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 12, 15 March 2002 (2002-03-15), pages 10028-10036, XP055030073, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M109720200, the whole document

LEE ET AL.: "Novel structural determinants on SIRP alpha that mediate binding to CD47", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 7741-7750, XP55081468, figure 2

US-A1-2010215640

US-A1-2012039896

US-A1-2014141002

(57) Изобретение относится к области иммунотерапии. Предложено антитело к сигнальному регуляторному белку-альфа (SIRPa) человека или его антигенсвязывающий фрагмент, характеризующиеся последовательностями гипервариабельных участков, представленными в перечне последовательностей. Изобретение также относится к применению указанного антитела для предотвращения и лечения заболеваний, включая рак, к фармацевтической композиции, содержащей антитело, комбинированному терапевтическому продукту, молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, вектору и выделенной клетке-хозяину для получения антитела. Также предложены способ определения *in vitro* или *ex vivo* SIRPa-положительных клеток у субъекта по биологическому образцу, ранее взятому у указанного субъекта, *in vitro* или *ex vivo* способ предсказания ответа на лечение у субъекта, страдающего раком. Антитела к SIRPa согласно изобретению способны специфически уменьшать взаимодействие SIRPa с CD47, не оказывая влияния на взаимодействие SIRP γ с CD47.

B1**044391****044391
B1**

Изобретение относится к области иммунотерапии. Изобретение относится к новым антителам к SIRPa, способным специфически уменьшать взаимодействие SIRPa с CD47, не оказывая влияния на взаимодействие SIRPg с CD47.

Нацеленное воздействие на контрольные точки иммунитета в случае адаптивного иммунитета показало значительную терапевтическую эффективность в борьбе с многочисленными видами рака, но у ограниченной части пациентов. Контрольная точка иммунитета на миелоидных клетках (макрофагах, дендритных клетках, супрессорных клетках миелоидного происхождения (MDSC), полиморфноядерных клетках (PMN)) остается недостаточно исследованной, в то время как эти клетки представляют наиболее распространенный тип иммунных клеток во многих солидных опухолях и часто связаны с неблагоприятным исходом.

Сигнальный регуляторный белок-альфа или SIRPa (также называемый SIRPa, CD172a или SHPS-1) экспрессируется на моноцитах, большинстве субпопуляций тканевых макрофагов, гранулоцитах, подгруппах дендритных клеток в лимфоидных тканях, некоторых клетках-предшественниках костного мозга, а также до различных уровней на нейронах, при этом особенно высокий уровень экспрессии наблюдается в богатых синапсами областях мозга, таких как зернистый слой мозжечка и гиппокамп. SIRPa является прототипическим членом семейства парных рецепторов SIRP близкородственных белков SIRP. Ген, кодирующий SIRPa человека, представляет собой полиморфный ген, несколько вариантов которого описаны у человека. Наиболее распространенными вариантами белка являются SIRPa v1 и v2 (номера доступа NP_542970 (P78324) и CAA71403). Полиморфизмы в SIRP человека приводят к изменениям в экспонированных на поверхности аминокислотах, но это не оказывает влияния на связывание с CD47.

Взаимодействие SIRPa, экспрессируемого миелоидными клетками, с повсеместно распространенным рецептором CD47 является важной контрольной точкой иммунитета при врожденном иммунном ответе, участвующей в регуляции миелоидных функций. Взаимодействие SIRPa с CD47 широко описано и обеспечивает подавляющий сигнал, который ингибирует фагоцитоз клеток хозяина. CD47 широко экспрессируется на более низких уровнях большинством здоровых клеток, но он также сверхэкспрессируется в некоторых раковых клетках. Таким образом, CD47 функционирует как сигнал "не ешь меня". Оба CD47 и SIRPa также вовлечены во многие другие взаимодействия. Одной из наиболее хорошо охарактеризованных физиологических функций взаимодействия CD47-SIRPa является участие в поддержании гомеостаза гемопоэтических клеток, в частности, эритроцитов и тромбоцитов. Поскольку CD47 выполняет функцию сигнала "не ешь меня" и, соответственно, является важной детерминантой фагоцитоза клеток хозяина макрофагами, в последние годы интенсивно изучался потенциальный вклад взаимодействия CD47-SIRPa в устранение раковых клеток. Было показано, что распространенность рецепторов CD47 в опухолях обратно пропорциональна общей выживаемости пациентов и представляет собой неблагоприятный прогностический фактор для нескольких типов рака.

В настоящее время путь SIRPa/CD47 является объектом различных фармацевтических разработок, направленных на усиление фагоцитоза макрофагами. Фактически, как и инфицированные клетки, раковые клетки несут aberrantную нагрузку, такую как чужеродные белки или патологические уровни нормальных белков, кроме того, эти клетки часто нарушают врожденные механизмы иммунного контроля за счет одновременной сверхэкспрессии иммунных регуляторных молекул. Становится очевидным, что один такой механизм включает CD47, аутологичный белок, экспрессируемый нормальными клетками. CD47 взаимодействует с SIRPa и приводит к передаче сигнала "не ешь меня" фагоцитарным макрофагам, которые после этого не трогают клетки-мишени. Сверхэкспрессия CD47 раковыми клетками делает их устойчивыми к макрофагам, даже в тех случаях, когда раковые клетки покрыты терапевтическими антителами, и коррелирует с неблагоприятными клиническими исходами при многочисленных видах солидного рака и гемобластозов. В экспериментальных моделях, в частности, ксенотрансплантатных моделях опухолей человека у иммунодефицитных мышей, блокирование пути CD47/SIRPa с агентами, нацеленными на CD47, очень эффективно стимулировало удаление опухоли макрофагами, а также уменьшало распространение раковых клеток и образование метастазов. Было описано, что блокирование пути CD47/SIRPa агентами, нацеленными на CD47, путем усиления антителозависимого фагоцитоза макрофагами, оказывает синергическое действие с истощающими терапевтическими противораковыми антителами, такими как трастузумаб (Trastuzumab) (антитело к Her2), цетуксимаб (Cetuximab) (антитело к EGFR), ритуксимаб (Rituximab) (антитело к CD20) и алемтузумаб (Alemtuzumab) (антитело к CD52).

Тем не менее, недавно было показано, что агенты, нацеленные на CD47 (анти-CD47 или SIRPa-Fc) вызывают гематологическую токсичность (анемию или тромбоцитопению), связанную с физиологической ролью CD47.

Помимо этого CD47 также связывается с другим членом семейства SIRP, SIRP-гамма (также называемым SIRPg, SIRPγ, CD172g или SIRP-бета 2), который присутствует на поверхности Т-клеток человека, но не на миелоидных клетках человека. SIRPg возник в результате удвоения гена SIRPb у приматов восточного полушария почти 35 миллионов лет назад и ограниченно экспрессируется на Т-лимфоцитах, в отличие от SIRPa, который экспрессируется на миелоидных клетках. SIRPg отсутствует у мышей. Было показано, что взаимодействие SIRPg-CD47 опосредует межклеточную адгезию, усиливает пролиферацию, зависящую от суперантигена и опосредуемую Т-клетками, и костимулирует активацию Т-клеток (Piccio et al., Blood, 105:6, 2005).

Вследствие высокого сходства последовательностей SIRPa и SIRPg, в частности, в области, которая взаимодействует с CD47, антитела к SIRPa, раскрытые в предшествующем уровне техники, также связываются с SIRPg и имеют нежелательные эффекты у человека, такие как ингибирование пролиферации Т-клеток и снижение иммунного ответа. Такие побочные эффекты антител к CD47 или неселективных антител к SIRPa непредсказуемы, поскольку испытания известных антител проводили в моделях на мышах, которые не имеют гена SIRPg, и в связи с этим упомянутые побочные эффекты отсутствовали.

В данной области техники по-прежнему имеется значительная потребность в новых и усовершенствованных агентах, в частности, антителах, для безопасной иммунотерапии, в частности, против рака, нацеленных на клетки врожденного иммунитета и не оказывающих вредного влияния на иммунные ответы Т-клеток. В частности, существует потребность в ингибировании взаимодействия SIRPa-CD47 без отрицательного влияния на взаимодействие SIRPg-CD47. Авторы настоящего изобретения достигли значительного прогресса с помощью изобретения, раскрытого в настоящем документе.

Задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы удовлетворить эту потребность путем обеспечения новых агентов, в частности, антител, которые позволяют решить, полностью или частично, указанные выше проблемы.

В настоящей заявке авторы изобретения предлагают новые антитела к SIRPa, в частности, гуманизированные антитела, которые оказывают антагонистическое действие на взаимодействие SIRPa-CD47, но не связываются специфически с SIRPg и, соответственно, не оказывают отрицательного влияния на взаимодействие SIRPg-CD47.

Антитела согласно настоящему изобретению обладают, в частности, следующими преимуществами:

- они не вызывают гематологической токсичности вследствие ограниченной экспрессии SIRPa (не связываются с эритроцитами человека (красными клетками крови) и тромбоцитами);

- они уменьшают рост опухоли и модифицируют микроокружение опухоли при применении в виде монотерапии;

- они проявляют синергический эффект с ингибиторами контрольных точек и костимулирующими агентами;

- они индуцируют долговременные и устойчивые ответы противоопухолевых Т-лимфоцитов памяти;

- они обеспечивают условия для иммунных ответов Т-клеток человека, являясь селективными антагонистами взаимодействия SIRPa-CD47, не нарушая при этом взаимодействие CD47/SIRPg. Вопреки ожиданиям, авторы настоящего изобретения получили такие селективные антитела, несмотря на высокую идентичность последовательностей SIRPa и SIRPg.

Эти новые антитела, отобранные на основании этих характеристик, особенно перспективны для многочисленных вариантов терапевтического применения, в частности, для лечения рака, включая разновидности воспалительного рака и разновидности рака с инфильтрированными миелоидными клетками (в частности, с инфильтрированными MDSC и/или ассоциированными с опухолью макрофагами (TAM)).

Антитела к SIRPa (С эпитопами)

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, который специфически связывается с по меньшей мере одним пептидом, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSRDLTKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) и SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE), в пределах SIRPa.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используются в настоящем документе в значении, соответствующем обычному пониманию специалиста в соответствующей области техники.

Для удобства приведены значения некоторых терминов и выражений, используемых в описании, примерах и формуле изобретения.

В настоящем документе термин "антитело" включает поликлональные антитела, моноклональные антитела или рекомбинантные антитела.

В настоящем документе термин "моноклональное антитело" предназначен для обозначения препарата молекул антител, т.е. антител, которые имеют общую аминокислотную последовательность тяжелой цепи и общую аминокислотную последовательность легкой цепи, в отличие от препаратов "поликлональных" антител, которые содержат смесь антител с различной аминокислотной последовательностью. Моноклональные антитела могут быть получены с помощью нескольких известных технологий, таких как фаговый, бактериальный, дрожжевой или рибосомный дисплей, а также с помощью классических способов, примером которых являются антитела, полученные из гибридомы. Соответственно, термин "моноклональный" используется для обозначения всех антител, полученных из одного клона нуклеиновой кислоты.

Антитела согласно настоящему изобретению включают рекомбинантные антитела. В настоящем документе термин "рекомбинантное антитело" относится к антителам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных средств, таким как антитела, которые экспрессируются с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-

хозяина; антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител; антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулина человека; или антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью любого другого способа, в котором конкретные последовательности генов иммуноглобулинов (такие как последовательности генов иммуноглобулинов человека) соединены с другими последовательностями ДНК. Рекомбинантные антитела включают, например, химерные и гуманизированные антитела.

В настоящем документе термин "химерное антитело" относится к антителу, в котором последовательность вариабельного домена, происходящего из зародышевой линии какого-либо вида млекопитающих, такого как мышь, была привита на последовательность константного домена, происходящего из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как человек.

В настоящем документе термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, в котором последовательности гипервариабельных участков (CDR), происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека.

В настоящем документе термин "антигенсвязывающий фрагмент антитела" обозначает часть антитела, т.е. молекулу, соответствующую части структуры антитела согласно настоящему изобретению, которая проявляет антигенсвязывающую способность в отношении SIRPa, возможно, в нативной форме; такой фрагмент проявляет антигенсвязывающую специфичность в отношении указанного антигена, идентичную или по существу идентичную антигенсвязывающей специфичности соответствующего четырехцепочечного антитела. Предпочтительно антигенсвязывающие фрагменты имеют аффинность связывания, близкую к таковой для соответствующих 4-цепочечных антител. Однако антигенсвязывающий фрагмент, который имеет антигенсвязывающую аффинность, пониженную по сравнению с соответствующими 4-цепочечными антителами, также включен в объем настоящего изобретения. Антигенсвязывающая способность может быть определена путем измерения аффинности антитела и целевого фрагмента. Такие антигенсвязывающие фрагменты также могут быть обозначены как "функциональные фрагменты" антител.

Антигенсвязывающие фрагменты антител представляют собой фрагменты, которые содержат их гипервариабельные домены, обозначенные CDR (участки, определяющие комплементарность), или их части, включающие сайт распознавания для антигена, т.е. внеклеточный домен SIRPa, определяя тем самым специфичность распознавания антигена.

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

Специалист в данной области техники может определить положение различных областей/доменов антител в соответствии со стандартными определениями, установленными для этого, включая ссылочную систему нумерации, см., например систему нумерации Кабат (KABAT), или путем применения алгоритма IMGT "жемчужное ожерелье". В связи с этим следует отметить, что для определения последовательностей согласно настоящему изобретению, определение границ областей/доменов может варьироваться между различными эталонными системами. Соответственно, области/домены, определенные в настоящем изобретении, включают последовательности, демонстрирующие вариабельность длины или положения рассматриваемых последовательностей в полноразмерной последовательности вариабельных доменов антител на приблизительно $\pm 10\%$.

На основании структуры четырехцепочечных иммуноглобулинов антигенсвязывающие фрагменты, соответственно, можно определить путем сравнения с последовательностями антител в доступных базах данных и известных в предшествующем уровне техники, и, в частности, путем сравнения положения функциональных доменов в таких последовательностях, при этом следует обратить внимание, что положения каркасных и константных доменов хорошо определены для различных классов антител, особенно для IgG, в частности, для IgG млекопитающих. Такое сравнение также включает данные, относящиеся к трехмерным структурам антител.

Для иллюстрации конкретных вариантов реализации настоящего изобретения антигенсвязывающие фрагменты антитела, которые содержат вариабельные домены, содержащие CDR указанного антитела, включают Fv, dsFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂. Фрагменты Fv состоят из доменов VL и VH антитела, удерживаемых вместе гидрофобными взаимодействиями; во фрагментах dsFv гетеродимер VH:VL стабилизирован посредством дисульфидной связи; во фрагментах scFv домены VL и VH соединены между собой посредством гибкого пептидного линкера, образуя одноцепочечный белок. Фрагменты Fab представляют собой мономерные фрагменты, которые могут быть получены путем расщепления антитела папаином; они содержат полную L-цепь и фрагмент VH-CH1 H-цепи, связанные между собой посредством дисульфидной связи. Фрагмент F(ab')₂ может быть получен путем расщепления антитела пепсином ниже дисульфидной связи в шарнирной области; он содержит два фрагмента Fab' и дополнительно часть шарнирной области молекулы иммуноглобулина. Фрагменты Fab' могут быть получены из фрагментов F(ab')₂ путем разрезания дисульфидной связи в шарнирной области. Фрагменты F(ab')₂ являются двухвалентными, т.е. они содержат два антигенсвязывающих сайта, сходно с нативной молекулой иммуногло-

булина; с другой стороны, фрагменты Fv (димер VHVL, составляющий вариабельную часть Fab), dsFv, scFv, Fab и Fab' являются одновалентными, т.е. они содержат один антигенсвязывающий сайт. Указанные основные антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению можно комбинировать для получения поливалентных антигенсвязывающих фрагментов, таких как диатела, триатела или тетратела. Указанные поливалентные антигенсвязывающие фрагменты также являются частью настоящего изобретения.

В настоящем документе термин "биспецифические" антитела относится к антителам, которые распознают два разных антигена, благодаря наличию по меньшей мере одной области (например, происходящей из вариабельной области первого антитела), которая является специфической в отношении первого антигена, и по меньшей мере второй области (например, происходящей из вариабельной области второго антитела), которая является специфической в отношении второго антигена. Биспецифическое антитело специфически связывается с двумя антигенами-мишенями и, соответственно, является одним типом полиспецифического антитела. Полиспецифические антитела, которые распознают два или более различных антигенов, могут быть получены методами рекомбинантной ДНК или включают, но не ограничиваются ими, антитела, полученные химическим путем с помощью любого удобного способа. Биспецифические антитела включают все антитела или конъюгаты антител или полимерные формы антител, которые способны распознавать два разных антигена. Биспецифические антитела включают антитела, которые были восстановлены и подвергнуты изменению структуры с сохранением их двухвалентных характеристик, и антитела, которые были химически соединены так, что они могут иметь несколько сайтов распознавания антигенов для каждого антигена, такие как BiME (биспецифические антитела, усиливающие функцию макрофагов), BiTE (биспецифические антитела, которые активируют Т-клетки), DART (перенацеливаемое антитело с двойной аффинностью); DNL (док-и-замок), DVD-Ig (иммуноглобулины с двойным вариабельным доменом), HAS (сывороточный альбумин человека), kih (выступы-во-впадины).

Соответственно, биспецифические антитела согласно настоящему изобретению направлены против SIRPa и второго антигена.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который является биспецифическим.

Несколько исследований, направленных на разработку терапевтических антител, привели к конструированию областей Fc для оптимизации свойств антител, позволяющих создавать молекулы, которые лучше приспособлены для фармакологической активности, требуемой от них. Область Fc антитела опосредует его период полувыведения из сыворотки крови и эффекторные функции, такие как комплемент-зависимая цитотоксичность (КЗЦ), антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ) и антителозависимый фагоцитоз клеток (АЗФ). Было показано, что несколько мутаций, расположенных на границе между доменами CH2 и CH3, такие как T250Q/M428L и M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F, увеличивают аффинность связывания с FcRn и период полувыведения IgG1 в условиях *in vivo*. Однако не всегда существует прямая взаимосвязь между увеличенным связыванием FcRn и улучшенным периодом полувыведения. Один из подходов к улучшению эффективности терапевтического антитела заключается в увеличении его устойчивости в сыворотке крови, что обеспечивает более высокий уровень циркуляции, менее частое введение и уменьшение доз. Модифицированные области Fc могут быть желательными для снижения или увеличения эффекторной функции антитела. Для антител, которые нацелены на молекулы на поверхности клетки, особенно молекулы на иммунных клетках, требуется устранение эффекторных функций. Напротив, для антител, предназначенных для применения в онкологии, увеличение эффекторных функций может улучшить терапевтическую активность. Четыре изоформа IgG человека связывают активирующие рецепторы Fcγ (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa), ингибирующий рецептор FcγRIIb и первый компонент системы комплемента (C1q) с разной аффинностью, что приводит к очень разным эффекторным функциям. Связывание IgG с FcγR или C1q зависит от остатков, расположенных в шарнирной области и домене CH2. Две области домена CH2 являются критическими для связывания с FcγR и C1q и имеют уникальные последовательности в IgG2 и IgG4.

В настоящем документе термин "модифицированное антитело" соответствует молекуле, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное моноклональное антитело или его функциональный фрагмент связаны с функционально отличающейся молекулой. Модифицированное антитело согласно настоящему изобретению может представлять собой гибридный химерный белок или конъюгат, полученный в результате любой подходящей формы присоединения, включая ковалентное присоединение, прививку, химическое связывание с химической или биологической группой или с молекулой, такой как полимер ПЭГ или другая защитная группа или молекула, подходящая для защиты от расщепления протеазами в условиях *in vivo*, для улучшения стабильности и/или периода полувыведения антитела или функционального фрагмента. При применении сходных методик, особенно с помощью химической связи или прививки, может быть получено модифицированное антитело, соединенное с биологически активной молекулой, причем указанная активная молекула, например, выбрана из токсинов, в частности, экзотоксина A *Pseudomonas*, A-цепи растительного токсина рицина или сапоринового токсина.

на, особенно терапевтически активного ингредиента, вектора (включая, в частности, белковый вектор), подходящего для нацеливания антитела или функционального фрагмента на конкретные клетки или ткани в организме человека, или оно может быть связано с меткой или линкером, особенно при применении фрагментов антитела, пегилирование антитела или его функциональных фрагментов представляет особенно интересный вариант реализации, поскольку оно улучшает условия доставки активного вещества хозяину, особенно для терапевтического применения, пегилирование может быть сайтспецифичным, чтобы предотвратить нежелательное взаимодействие с сайтами распознавания антител или функциональных фрагментов, и может быть выполнено с использованием высокомолекулярного ПЭГ. пегилирование может быть достигнуто посредством свободных остатков цистеина, присутствующих в последовательности антитела или функционального фрагмента, или путем добавления свободных остатков цистеина в аминокислотной последовательности антитела или функционального фрагмента.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который модифицирован.

Макромолекулы согласно настоящему изобретению включают антитела и их фрагменты, а также включают искусственные белки, пептиды и любые химические соединения, обладающие способностью связывать антигены, которая имитирует таковую антител, которые также называются в настоящем документе антигенсвязывающие миметики антитела. Подходящие белки включают аффитины и антикарины. Аффитины представляют собой искусственные белки, обладающие способностью селективно связываться с антигенами. Они структурно происходят из ДНК-связывающего белка Sac7d, обнаруженного в *Sulfolobus acidocaldarius*, микроорганизме, принадлежащему к домену Архей. Библиотека аффитинов может быть создана путем рандомизации аминокислот на поверхности связывания Sac7d, например, путем создания вариантов, соответствующих случайным заменам 11 остатков связывающей контактной поверхности Sac7d, и полученная библиотека белков может быть подвергнута раундам рибосомного дисплея, при этом аффинность может быть направлена на различные мишени, такие как пептиды, белки, вирусы и бактерии. Аффитины представляют собой миметики антител и разрабатываются в качестве инструментов в биотехнологии. Их также применяли в качестве специфических ингибиторов различных ферментов (Krehenbrink et al, J. mol. Biol., 383:5, 2008). Специалист в данной области техники может легко разработать антикарины с требуемыми связывающими свойствами с использованием способов, известных в данной области техники, в частности, как описано в заявке на патент WO2008068637 и вышеупомянутой публикации, в частности, путем создания библиотек фагового дисплея и/или рибосомного дисплея и их скрининга с использованием антигена, раскрытого в настоящем документе. Антикарины являются искусственными белками, которые способны связываться с антигенами, как с белками, так и с небольшими молекулами. Они представляют собой миметики антител, происходящие из липокалинов человека, которые представляют собой семейство природных связывающих белков. Антикарины примерно в восемь раз меньше по размеру, содержат приблизительно 180 аминокислот и имеют массу приблизительно 20 кДа (Skerra, Febs J., 275:11, 2008). Были созданы библиотеки фагового дисплея антикалинов, которые позволяют проводить скрининг и отбор, в частности, антикалинов со специфическими свойствами связывания. Специалист в данной области техники может легко разработать аффитины с требуемыми свойствами связывания с использованием способов, известных в данной области техники, в частности, как описано в патенте EP1270725 B1, патенте US8536307 B2 (Schlehuber and Skerra, Biophys. Chem., 96:2-3, 2002) и вышеупомянутой публикации, в частности, путем создания библиотек фагового дисплея и/или рибосомного дисплея и их скрининга с использованием антигена, раскрытого в настоящем документе. Как антикарины, так и аффитины могут быть получены в ряде систем для экспрессии, включая бактериальные системы экспрессии. Соответственно, настоящее изобретение относится к аффитинам, антикаринам и другим сходным миметикам антител, обладающим признаками антител, описанных в настоящем документе, в частности, в отношении связывания с SIRPa, ингибирования взаимодействия SIRPa с CD47, отсутствия способности связываться с SIRPg, отсутствия способности связываться с Т-клетками, отсутствия способности ингибировать пролиферацию Т-клеток, отсутствия способности ингибировать взаимодействие SIRPg с CD47, все из которых включены в объем настоящего изобретения в качестве макромолекул согласно настоящему изобретению.

Все варианты реализации, раскрытые в настоящем документе в отношении антител или их фрагментов, перенесены, с соответствующими изменениями, на макромолекулы согласно настоящему изобретению, в частности, на антигенсвязывающие миметики антител.

В настоящем документе термин "эпитоп" означает часть антигена, с которой связывается антитело. Эпитопы белковых антигенов можно разделить на две категории: конформационный эпитоп и линейный эпитоп. Конформационный эпитоп соответствует прерывистым участкам аминокислотной последовательности антигена. Линейный эпитоп соответствует непрерывной последовательности аминокислот из антигена.

Согласно настоящему изобретению пептиды, которые присутствуют в SIRPa, и те, которые связаны антителами к SIRPa, являются частью эпитопа, который специфично распознается такими антителами.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, который специфично

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который специфически связывается с пептидами, содержащими последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 13 (ARELIYN), SEQ ID NO: 12 (HTVSFTCESHGF-SPRDITLKW), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) и SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE), в пределах SIRPa.

Пептиды, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13, соответствуют линейным эпитопам.

Указанные линейные эпитопы были идентифицированы авторами настоящего изобретения с помощью олигопептидного сканирования на основе массивов (иногда называемого сканированием перекрывающихся пептидов или пепскан-анализом). В этой методике применяют библиотеку олигопептидных последовательностей из перекрывающихся и неперекрывающихся сегментов белка-мишени и тестируют их способность связывать антитело, представляющее интерес. Прерывистые эпитопы могут быть картированы с очень высокой надежностью и точностью (Gaseitsiwe et al., 2010 - Clin Vaccine Immunol. Jan; 17(1): 168-175) путем комбинирования последовательностей несмежных пептидов из разных частей белка-мишени и обеспечения конформационной жесткости такого комбинированного пептида (например, с использованием каркасов CLIPS) (Timmerman et al., 2007, J Mol Recognit, Sep-Oct;20(5):283-99). Все из испытываемых антител согласно настоящему изобретению, включая HEFLB, специфически связываются с указанными эпитопами.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который специфически связывается с конформационным эпитопом, содержащим по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR), SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN) и SEQ ID NO: 72 (SPRDITLKW), в пределах SIRPa.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который специфически связывается с конформационным эпитопом, содержащим или состоящим из пептидов, содержащих последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR), SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN) и SEQ ID NO: 72 (SPRDITLKW), в пределах SIRPa.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который специфически связывается с конформационным эпитопом, содержащим по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR) и SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN).

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который специфически связывается с конформационным эпитопом, содержащим или состоящим из пептидов, содержащих последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR) и SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN), в пределах SIRPa.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который специфически связывается с конформационным эпитопом, содержащим по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73 (YNQK) и "SIR", в пределах SIRPa.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который специфически связывается с конформационным эпитопом, содержащим или состоящим из пептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73 (YNQK), и пептида, имеющего аминокислотную последовательность SIR, в пределах SIRPa.

Пептиды, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, и SIRP, соответствуют конформационным эпитопам. Указанные конформационные эпитопы были определены авторами настоящего изобретения с использованием процедур защиты от протеолиза (ферментативное расщепление: расщепление химотрипсином, трипсином комплекса антитело-антиген, иммобилизованного на носителе для аффинной хроматографии) с последующим исследованием методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF/TOF) для детектирования и определения последовательности таких пептидов, представляющих интерес, как хорошо известно специалисту в данной области техники (Van de Water et al., Clinical Immunology and Immunopathology, 1997, vol. 85). В качестве антигена применяли SIRPa человека (номера доступа NP_542970), и одно из используемых антител согласно настоящему изобретению представляло собой вариант HEFLB.

Антитело к SIRPa или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела согласно настоящему изобретению специфически связывается с указанными конформационными эпитопами, содержащими или состоящими из указанных пептидов в их конформационной группировке в пределах нативного SIRPa.

Пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73 (YNQK), соответствует пептиду, состоящему из аминокислот в положении 80-83 в аминокислотной последовательности SIRPa человека, характеризующаяся своим номером доступа NP_542970.

Пептид, имеющий аминокислотную последовательность SIR, пептид SIR, соответствует пептиду, состоящему из аминокислот в положении 105-107 в аминокислотной последовательности SIRPa человека, которая указана под номером доступа NP_542970.

В настоящем документе термин "SIRPa" относится к белку SIRPa из вида млекопитающих, предпочтительно к SIRPa человека (например, номера доступа NP_542970 (P78324) и CAA71403).

В настоящем документе термин "антитело к SIRPa" относится к антителу, которое специфически связывается с SIRPa, в частности, с SIRP человека.

Специфическое связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению и эпитопа (или области, содержащей эпитоп) подразумевает, что антитела проявляют детектируемую аффинность в отношении эпитопа (области, содержащей эпитоп) на конкретном белке или антигене (в настоящем документе SIRPa). "Детектируемая аффинность" включает связывание с аффинностью приблизительно 10^{-9} М (K_D) или сильнее. Предпочтительно связывание считается специфичным, если аффинность связывания составляет от 10^{-9} М до 10^{-12} М, необязательно от 10^{-9} М до 10^{-10} М, в частности, 10^{-10} М. Специфичность взаимодействия или связывания связывающего домена с мишенью может быть легко исследована, помимо всего прочего, путем сравнения взаимодействия указанного связывающего домена с белком-мишенью или антигеном с взаимодействием указанного связывающего домена с белками или антигенами, отличными от белка-мишени.

Аффинность может быть определена различными способами, хорошо известными специалисту в данной области техники. Подходящие способы включают, но не ограничиваются ими, исследование с помощью системы Biotec, с помощью системы BLItz™ и график Скэтчарда.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который имеет значение K_D ниже 10^{-9} М, предпочтительно ниже 10^{-10} М в отношении SIRPa, более предпочтительно ниже 1×10^{-11} М, в частности, согласно данным исследования с помощью системы Biotec.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который уменьшает взаимодействие SIRPa с CD47.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который частично или полностью, в частности, полностью, ингибирует связывание CD47 с SIRPa, в частности, связывание CD47 человека с SIRPa человека.

Такое антитело согласно настоящему изобретению специфически связывается с SIRPa и является антагонистом взаимодействия SIRPa с CD47.

В частности, антагонистическое антитело к SIRPa согласно настоящему изобретению способно снижать или ингибировать связывание CD47 с SIRPa по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, предпочтительно на 80%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 100%, по сравнению с молекулой для отрицательного контроля, в количественном исследовании связывания.

В частности, антагонистическое антитело к SIRPa согласно настоящему изобретению способно снижать или ингибировать связывание CD47 с SIRPa на 50-100%, предпочтительно на 60-90%, более предпочтительно на 70-80%, по сравнению с молекулой для отрицательного контроля, в количественном исследовании связывания.

Способы определения специфичности и аффинности антител путем конкурентного ингибирования известны в данной области техники (см., например, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1998); Colligan et al., *Current Protocols in Immunology*, Green Publishing Assoc, NY (1992; 1993); Muller, *Meth. Enzym.*, 92:589-601 (1983)) и описаны в примерах ниже.

Подходящие способы включают, но не ограничиваются ими, исследование с помощью системы Biotec, с помощью системы BLItz™, проточную цитометрию и твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa, определенному выше, которое имеет значение IC_{50} ниже 500 нг/мл, в частности, ниже 400 нг/мл, 300 нг/мл, более конкретно ниже 200 нг/мл, определенное в количественном исследовании конкурентного связывания CD47 и антитела к SIRPa с SIRPa методом ИФА.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa, определенному выше, которое имеет значение IC_{50} ниже 500 нг/мл, в частности, ниже 400 нг/мл, 300 нг/мл, более конкретно ниже 200 нг/мл, ниже 150 нг/мл и даже более конкретно ниже 100 нг/мл, определенное на моноцитах человека в количественном исследовании конкурентного связывания CD47 и антитела к SIRPa методом цитометрии.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который не связывается специфически с SIRPg, предпочтительно с SIRPg человека.

Такое антитело согласно настоящему изобретению не влияет на или не предотвращает взаимодействие SIRPg с CD47.

В настоящем документе термин "SIRPg" относится к сигнальному регуляторному белку гамма (также называемому SIRP гамма, CD172g или SIRP-бета 2) из вида млекопитающих, предпочтительно к SIRPg человека.

Эталонная последовательность белка SIRPg человека, использованная в примерах настоящей заявки, соответствует последовательности, ассоциированной с номером доступа Q9P1W8.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который имеет значение KD превосходящее 10^{-9} М, предпочтительно превосходящее 10^{-8} М, более предпочтительно превосходящее 10^{-7} М в отношении SIRPg, в частности, определенное с помощью системы BLItz™.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который не оказывает значительного ингибиторного или антагонистического действия на связывание CD47 с SIRP-g, который не конкурирует в значительной степени с CD47 за связывание с SIRPg.

Такой антагонистический эффект может быть определен с использованием способов, определенных в примерах настоящей заявки.

Согласно настоящему изобретению подразумевается, что антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий миметик антитела) не оказывает антагонистического действия на связывание CD47 с SIRPg, если указанное антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий миметик антитела) не индуцирует увеличение, или индуцирует увеличение менее 1 log, значения K_D CD47 в количественном исследовании конкурентного связывания SIRPg с помощью системы BLItz™.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который не связывается специфически с Т-клетками, в частности, с CD3⁺ Т-клетками.

В частности, антитело к SIRPa или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела согласно настоящему изобретению не связывается с Т-клетками из вида млекопитающих, в частности, с Т-клетками человека.

В частности, считается, что антитело к SIRPa (или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела) не связывается специфически с Т-клетками человека, если в популяции Т-клеток человека, выделенных из мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) от здорового донора, менее чем 10%, предпочтительно менее чем 5%, более предпочтительно менее чем 2%, наиболее предпочтительно менее чем 1% популяции Т-клеток человека распознаются указанным антителом к SIRPa (или его антигенсвязывающим фрагментом, или антигенсвязывающим миметиком антитела).

Этот эффект может быть измерен с помощью способов, описанных в примерах настоящей заявки.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который не ингибирует в значительной степени пролиферацию Т-клеток, в частности, CD3⁺ Т-клеток, предпочтительно клеток из видов млекопитающих и более предпочтительно Т-клеток человека.

В частности, считается, что антитело к SIRPa не ингибирует в значительной степени пролиферацию Т-клеток, если пролиферация Т-клеток снижена менее чем на 30%, предпочтительно менее чем на 20%, более предпочтительно менее чем на 10%, наиболее предпочтительно менее чем на 5% по сравнению с отрицательным контролем.

Пролиферация Т-клеток может быть определена различными способами. Например, пролиферация Т-клеток может быть измерена путем встраивания H³-тимидина, как описано в примерах настоящей заявки.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который не оказывает значительного ингибиторного, антагонистического действия на связывание белков сурфактанта с SIRPa, и который не конкурирует в значительной степени с белками сурфактанта за связывание с SIRPa.

В настоящем документе "белки сурфактанта" представляют собой коллагенсодержащие лектины С-типа (зависимые от кальция), которые вносят значительный вклад в поддержание гомеостаза сурфактанта и иммунитета легких (для обзора см. Kishore et al., Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors, Mol Immunol, 43(9), 1293-315, 2006).

В настоящем документе термин "белок сурфактанта" относится к белку сурфактанта из вида млекопитающих, предпочтительно к белку сурфактанта человека.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который не ингибирует связывание белка сурфактанта человека D (SP-D) с SIRPa.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который не ингибирует связывание белка сурфактанта человека A (SP-A) с SIRPa.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который не оказывает антагонистического действия на взаимодействие белков сурфактанта с SIRPa.

Конкуренция между SIRPa и белками сурфактанта может быть определена с помощью количественного исследования конкурентного связывания с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области техники. Подходящие способы включают, но не ограничиваются ими, исследование с помощью системы Biscoe, с помощью системы BLItz™ и количественное исследование методом ИФА.

Согласно настоящему изобретению считается, что антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела) не оказывает антагонистического действия на связывание белка сурфактанта с SIRPa, если указанное антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела) не индуцирует увеличение, или индуцирует увеличение менее 1 log, значения K_D белка сурфактанта в количественном исследовании конкурентного связывания SIRPa с помощью системы BLItz™.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который слабо связывается или не связывается специфически с SIRPb.

В настоящем документе термин "SIRPb" относится к белку SIRPb (также называемому SIRPβ, сигнальный регуляторный белок бета-1, SIRP-бета-1, член сходного с CD172-антигеном семейства B или CD172b) из вида млекопитающих, предпочтительно SIRPb человека.

Эталонная последовательность белка SIRPb человека, использованная в примерах настоящей заявки, соответствует последовательности, ассоциированной с номером доступа Q5TFQ8-1.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который имеет значение K_D превосходящее 10^{-9} М, предпочтительно превосходящее 10^{-8} М в отношении SIRPb, в частности, определенное с помощью системы BLItz™.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, которое содержит:

а) тяжелую цепь, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и/или

б) легкую цепь, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем указанные CDR определены следующим образом:

HCDR1, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14 (SYWVH),

HCDR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15 (NIDPSDSDTHYNQKFKD) или SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG),

HCDR3, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17 (GGTGTMAWFAY), SEQ ID NO: 18 (GGTGTLAWFAY), SEQ ID NO: 19 (GGTGTMAYFAY) или SEQ ID NO: 20 (GGTGTLAYFAY),

LCDR1, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

LCDR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), и

LCDR3, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23 (FQGTHVPYT).

18D5/вариант A/вариант B.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, которое содержит:

а) тяжелую цепь, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и/или

б) легкую цепь, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем указанные CDR определены следующим образом:

HCDR1, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14 (SYWVH),

HCDR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15 (NIDPSDSDTHYNQKFKD),

HCDR3, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17 (GGTGTMAWFAY),

LCDR1, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

LCDR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), и

LCDR3, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23 (FQGTHVPYT).

Вариант С.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, которое содержит:

а) тяжелую цепь, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и/или

б) легкую цепь, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем указанные CDR определены следующим образом:

HCDR1, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14 (SYWVH),

HCDR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG),

HCDR3, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17 (GGTGTMAWFAY),

LCDR1, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

LCDR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), и

LCDR3, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23 (FQGTHVPYT).

Вариант Е.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, которое содержит:

а) тяжелую цепь, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и/или

б) легкую цепь, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем указанные CDR определены следующим образом:

HCDR1, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14 (SYWVH),

HCDR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG),

HCDR3, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18 (GGTGTMAWFAY),

LCDR1, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

LCDR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), и

LCDR3, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23 (FQGTHVPYT).

Вариант F.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, которое содержит:

а) тяжелую цепь, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и/или

б) легкую цепь, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем указанные CDR определены следующим образом:

HCDR1, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14 (SYWVH),

HCDR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG),

HCDR3, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19 (GGTGTMAWFAY),

LCDR1, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в

SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

LCDR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), и

LCDR3, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23 (FQGTHVPYT).

Вариант EF.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, которое содержит:

а) тяжелую цепь, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и/или

б) легкую цепь, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем указанные CDR определены следующим образом:

HCDR1, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14 (SYWVH),

HCDR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSPTHYSPSFQG),

HCDR3, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20 (GGTGTLAYFAY),

LCDR1, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

LCDR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), и

LCDR3, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23 (FQGTHVPYT).

Антитела к SIRPa согласно настоящему изобретению могут содержать вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность HCDR1 и/или HCDR2, и/или HCDR3 из антител человека согласно настоящему изобретению; и/или вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность LCDR1 и/или LCDR2, и/или LCDR3 из антител человека согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело содержит вариант аминокислотной последовательности одного или более CDR из предложенных антител человека, причем указанный вариант содержит одну или более вставок аминокислот в или рядом с остатком CDR и/или делеций в или рядом с остатком CDR, и/или замен остатка (ов) CDR (при этом замена (замены) является предпочтительным типом изменения аминокислоты для получения указанных вариантов).

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, которое содержит

вариabельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, и/или

вариabельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 33.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, которое содержит

вариabельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, и

вариabельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 33.

Последовательности конкретных вариabельных доменов приведены в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Примеры вариабельных доменов тяжелой цепи и вариабельных доменов легкой цепи антител в соответствии с изобретением

Вариабельный домен тяжелой цепи антитела дикого типа (химерное антитело и мышинное антитело 18D5)	QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYWVHWVKQRPIQGLEWIGNIDPSDSDTHYNQKFKDKASLTVDKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSA	SEQ ID NO: 24
Вариабельный домен тяжелой цепи гуманизированного варианта (HA)	YWVHWVRQMPGKGLEWIGNIDPSDSDTHYNQKFKDHVTLSDVKSSISTAYLQLSSLKASDTAMYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSS	25
Вариабельный домен тяжелой цепи гуманизированного варианта (HB)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYWVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPSDSDTHYNQKFKDHVTLSDVKSSISTAYLQLSSLKASDTAMYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 26
Вариабельный домен тяжелой цепи гуманизированного варианта (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYWVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSDVKSSISTAYLQLSSLKASDTAMYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 27
Вариабельный домен тяжелой цепи гуманизированного варианта (HE)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYWVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSDVKSSISTAYLQLSSLKASDTAMYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 28
Вариабельный домен тяжелой цепи гуманизированного варианта (HF)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYWVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSDVKSSISTAYLQLSSLKASDTAMYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 29
Вариабельный домен тяжелой цепи гуманизированного варианта (HEF)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYWVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSDVKSSISTAYLQLSSLKASDTAMYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 30
Легкая цепь антитела дикого типа (химерное антитело и мышинное антитело 18D5)	DVVMQTPTSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCFQGTHTVPTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO: 31
Вариабельный домен легкой цепи	DVVMQTQSPLSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWYQQRPGQSPRLIYRVSNRFSG	SEQ ID NO: 32

гуманизированного варианта (LA)	VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYFC FQGTHVPYTFGGGKVEIK	
Вариабельный домен легкой цепи гуманизированного варианта (LB)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHS YGNTYLYWFQQRPGQSPRLLIYRVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYC FQGTHVPYTFGGGKVEIK	SEQ ID NO: 33

Последовательности вариабельных доменов антител, приведенных в качестве примера в настоящем изобретении, могут быть установлены из комбинаций последовательностей, представленных в табл. 2.

Таблица 2

Вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи специфических антител согласно изобретению

Антитело	Вариабельный домен тяжелой цепи	Вариабельный домен легкой цепи
18D5 (химерное антитело и мышинное антитело)	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 31
HALA	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 32
HALB	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 33
HBLA	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 32
HBLB	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 33
HCLA	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 32
HCLB	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 33
HELA	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 32
HELB	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 33
HFLA	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 32
HFLB	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 33
HEFLA	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 32
HEFLB	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 33

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, которое содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 33.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, которое содержит

вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 33, и

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30,

предпочтительно вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30,

более предпочтительно вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30,

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, которое содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31, или

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности,

ности, представленной в SEQ ID NO: 32, или

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 33, или

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 32, или

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 33, или

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 27, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 32, или

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 27, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 33, или

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 28, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 32, или

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 28, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 33, или

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 32, или

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 33, или

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 30, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 32, или

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 30, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 33.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела не содержит замену аминокислоты W в положении 33 (W33) в вариабельном домене тяжелой цепи, причем указанное положение идентифицировано по отношению к последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30, и/или не содержит замену аминокислоты Y в положении 39 (Y39), R в положении 55 (R55) и/или F в положении 60 (F60) в вариабельном домене легкой цепи, причем указанные положения идентифицированы по отношению к последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 33, в частности, не содержит замену в положении W33 в вариабельном домене тяжелой цепи и не содержит замену в положении Y39, R55 и F60 в вариабельном домене легкой цепи.

Согласно настоящему изобретению антитела могут быть получены с любыми константными доменами тяжелой цепи и легкой цепи.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело к SIRPa человека согласно настоящему изобретению представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, в частности, в котором константный домен легкой цепи антитела происходит из константного домена легкой цепи человека, более конкретно, в котором константный домен легкой цепи состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 35, и в котором константный домен тяжелой цепи антитела

происходит из константного домена тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (дикого типа или мутированного варианта), в частности, из константного домена тяжелой цепи IgG4 человека, более конкретно, в котором константный домен тяжелой цепи антитела состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 34.

Как известно специалисту в данной области техники, выбор изоформ IgG константной области тяжелой цепи сосредоточен на том, являются ли необходимыми конкретные функции, и требуется ли подходящий период полувыведения в условиях *in vivo*. Например, антитела, сконструированные для селективной эрадикации раковых клеток, как правило, требуют активного изоформа, который позволяет активировать систему комплемента и опосредуемое эффекторными клетками уничтожение клеток посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности. Оба изоформа IgG1 и IgG3 человека (имеющих более короткий период полувыведения) удовлетворяют этим критериям, в частности, изоформ IgG1 человека (дикого типа и варианты). В частности, в зависимости от изоформа IgG константного домена тяжелой цепи (в частности, дикого типа и вариантов изоформа IgG1 человека), антитело к SIRPa человека согласно настоящему изобретению может быть цитотоксическим по отношению к клеткам, экспрессирующим SIRPa, посредством механизма КЗЦ, АЗКЦ и/или АЗФ (Salfeld, *nature biotechnology*, vol. 25, № 12, 2007; Irani et al. *Molecular Immunology*, vol. 67, issue 2, part A, 2015). Фактически, кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина (Fc) взаимодействует с рядом вспомогательных молекул, чтобы опосредовать косвенные эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый фагоцитоз клеток (АЗФ) и комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ).

Таблица 3

Примеры константного домена тяжелой цепи и константного домена легкой цепи, подходящие для антител в соответствии с изобретением

Константный домен тяжелой цепи (IgG4m-S228P) SEQ ID NO: 34	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGKTYTCNV HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVSVLTVHLQDNLNGKEYCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Константный домен легкой цепи (CL каппа) SEQ ID NO: 35	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa, определенному выше, которое содержит

тяжелую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 56, и

легкую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 57, и

тяжелую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36, и

легкую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 43, и

тяжелую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37, и

легкую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 44, и

тяжелую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37, и

легкую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45, и

тяжелую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 38, и

легкую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 44, и

тяжелую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представлен-

Таблица 4

Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи
конкретных антител в соответствии с изобретением

Тяжелая антитела типа антитело 18D5)	цепь дикого (мышинное	QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTS YWVHWVKQRPIQGLEWIGNIDPSDSDTHYN QKFKDKASLTVDKSSSTAYMQLSSLTFEDSA VYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGLVTVSA AKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKG YFPESVTVTWNSGSLSSSVHTFPALLQSGLY TMSSSVTPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTV DKKLEPSGPISTINPCPPCKECHKCPA PNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMSLTPKVTCVV VDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHR EDYNSTIRVVSTLPIQHWDMSGKEFKCKV NNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAE QLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHT EENYKDTAPVLDSGYSFIYSKLNMKTSKW EKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK	SEQ ID NO: 56
Тяжелая антитела типа антитело 18D5)	цепь дикого (химерное	QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTS YWVHWVKQRPIQGLEWIGNIDPSDSDTHYN QKFKDKASLTVDKSSSTAYMQLSSLTFEDSA VYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGLVTVSA ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV	SEQ ID NO: 36

	HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	
Тяжелая цепь гуманизированного варианта (HA)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYTFTS YWVHWVRQMPGKGLEWIGNIDPSDSDTHY NQKFKDHVTLSDVKSISTAYLQLSSLKASDT AMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	SEQ ID NO: 37
Тяжелая цепь гуманизированного варианта (HB)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTS YWVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPSDSDTH YNQKFKDHVTLSDVKSISTAYLQLSSLKASD TAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTY TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGV	SEQ ID NO: 38

	EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK	
Тяжелая цепь гуманизированного варианта (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTS YWVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPSDS YSPSFQGHVTLSDKSISTAYLQLSSLKASDT AMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	SEQ ID NO: 39
Тяжелая цепь гуманизированного варианта (HE)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTS YWVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPSDS YSPSFQGHVTLSDKSISTAYLQLSSLKASDT AMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGLTVTS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEV	SEQ ID NO: 40

	HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	
Тяжелая цепь гуманизированного варианта (HF)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTS YWVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPSDS ⁴¹ TH YSPSFQGHVTLSDKSISTAYLQLSSLKASDT AMYYCVRGGTGTMAFYWGQGT ⁴¹ LVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	SEQ ID NO: 41
Тяжелая цепь гуманизированного варианта (HEF)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTS YWVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPSDS ⁴² TH YSPSFQGHVTLSDKSISTAYLQLSSLKASDT AMYYCVRGGTGTLAYFYWGQGT ⁴² LVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEV	SEQ ID NO: 42

	HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	
Легкая цепь антитела дикого типа (мышинное антитело 18D5)	DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVH SYGNTYLYWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYF CFQGTHVPYTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFP PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNR NEC	SEQ ID NO: 57
Легкая цепь антитела дикого типа (химерное антитело 18D5)	DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVH SYGNTYLYWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYF CFQGTHVPYTFGSGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 43
Вариабельный домен легкой цепи гуманизированного варианта A (LA)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHS YGNTYLYWYQQRPGQSPRLLIYRVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC FQGTHVPYTFGGGKVEIKRTVAAPS VFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 44
Вариабельный домен легкой цепи гуманизированного варианта (LB)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHS YGNTYLYWFQQRPGQSPRLLIYRVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC FQGTHVPYTFGGGKVEIKRTVAAPS VFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 45

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который способен индуцировать дифференцировку моноцитарных супрессорных клеток миелоидного происхождения (Mo-MDSC) в несупрессорные клетки.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным

выше, который характеризуется тем, что указанные несупрессорные клетки секретируют провоспалительные цитокины, такие как ИЛ-6, ИЛ-12 и ФНО, и не секретируют или секретируют с низкими уровнями противовоспалительные цитокины, такие как ИЛ-10 и ФНО- β .

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который характеризуется тем, что указанные несупрессорные клетки экспрессируют iNOS.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который характеризуется тем, что указанные несупрессорные клетки не экспрессируют маркеры ГКГС класса II и экспрессируют маркеры CD80-CD86.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, который характеризуется тем, что указанные несупрессорные клетки экспрессируют по меньшей мере один маркер природных клеток-киллеров (NK-клеток).

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способен ингибировать поляризацию макрофагов по фенотипу M2 и/или способствует поляризации провоспалительных макрофагов по фенотипу M1.

Антитела согласно настоящему изобретению могут модифицировать поляризацию макрофагов, чтобы индуцировать провоспалительную среду, т.е. они могут ингибировать противовоспалительный сигнал, обеспечиваемый макрофагами M2-типа, и/или могут способствовать провоспалительному сигналу, обеспечиваемому макрофагами M1-типа. Этот подход позволяет восстановить воспалительную среду, благоприятную для действия эффекторных Т-клеток, в частности, для устранения раковых клеток.

Антитела к SIRPa

Варианты реализации, упомянутые для антител, определенных выше, повторяются, с необходимыми изменениями, для антител, упомянутых в других аспектах настоящего изобретения.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, который специфически связывается с конформационным эпитопом, содержащим по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR), SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN) и SEQ ID NO: 72 (SPRDITLKW), в пределах SIRPa.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, который специфически связывается с конформационным эпитопом, содержащим или состоящим из пептидов, содержащих последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR), SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN) и SEQ ID NO: 72 (SPRDITLKW), в пределах SIRPa.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, который специфически связывается с конформационным эпитопом, содержащим по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR) и SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, который специфически связывается с конформационным эпитопом, содержащим или состоящим из пептидов, содержащих последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR) и SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN), в пределах SIRPa.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, который специфически связывается с конформационным эпитопом, содержащим по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 73 (YNQK) и SIR.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, который специфически связывается с конформационным эпитопом, содержащим или состоящим из пептидов, содержащих последовательность SEQ ID NO: 73 (YNQK) и SIR, в пределах SIRPa.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, которое содержит:

- а) тяжелую цепь, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и/или
- б) легкую цепь, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем указанные CDR определены следующим образом:

HCDR1, содержащий или состоящий из пептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14 (SYWVH),

HCDR2, содержащий или состоящий из пептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15 (NroPSDSDTHYNQKFKD) или SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG),

HCDR3, содержащий или состоящий из пептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 (GGTGTMAWFAY), SEQ ID NO: 18 (GGTGTLAWFAY), SEQ ID NO: 19 (GGTGTMAFYAY) или SEQ ID NO: 20 (GGTGTLAYFAY),

LCDR1, содержащий или состоящий из пептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21 (RSSQLVHSYGNTYLY),

LCDR2, содержащий или состоящий из пептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), и

LCDR3, содержащий или состоящий из пептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23 (FQGTHVPYT).

Настоящее изобретение также относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRPg, в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa, и который не связывается специфически с SIRPg, и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRPg.

Варианты применения

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, или

антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

для применения в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение указанному субъекту эффективного количества

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, определенных выше, или

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRPg.

Настоящее изобретение также относится к применению

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, определенных выше, или

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

в изготовлении лекарственного средства.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к

антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, или

антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

для применения в лечении любого состояния, которое может быть улучшено или предотвращено с помощью дифференцировки моноцитарных супрессорных клеток миелоидного происхождения (MoMDSC) в несупрессорные клетки.

В настоящем документе "состояние, которое может быть улучшено или предотвращено с помощью дифференцировки моноцитарных супрессорных клеток миелоидного происхождения (Mo-MDSC) в не-супрессорные клетки" соответствует раку, включая разновидности воспалительного рака и разновидности рака с инфильтрированными миелоидными клетками (в частности, с инфильтрированными MDSC и/или TAM), инфекционное заболевание, травму, аутоиммунное заболевание (такое как ревматоидный артрит, сахарный диабет 1 типа, волчанка, псориаз), вакцинацию, хронические воспалительные заболевания (такие как воспалительные заболевания кишечника, включая болезнь Крона и язвенный колит), септический шок, хроническое инфекционное заболевание (такое как заболевание, вызванное *Pseudomonas* или ЦМВ), фиброз, атеросклероз или дисфункции трансплантата.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения любого состояния, которое может быть улучшено или предотвращено с помощью дифференцировки моноцитарных супрессорных клеток миелоидного происхождения (Mo-MDSC) в несупрессорные клетки у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение указанному субъекту эффективного количества

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, определенных выше, или

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRPg.

Настоящее изобретение также относится к применению

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, определенных выше, или

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

в изготовлении лекарственного средства для лечения любого состояния, которое может быть улучшено или предотвращено путем дифференцировки моноцитарных супрессорных клеток миелоидного происхождения (Mo-MDSC) в несупрессорные клетки.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к

антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенных выше, или

антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

для применения в лечении любого состояния, которое может быть улучшено или предотвращено путем модификации поляризации макрофагов в провоспалительные макрофаги.

Фактически, SIRPa действует как ингибитор контрольной точки и участвует в поляризации макрофагов. В частности, блокирование SIRPa индуцирует провоспалительную функцию макрофагов, связанную с макрофагами типа 1 (провоспалительными макрофагами типа M1 = M (ИФН- γ)), и ингибирует супрессорную активность макрофагов в опухоли, поскольку провоспалительный профиль макрофагов получен за счет макрофагов типа 2 (высокая фагоцитарная активность макрофагов типа M2 = M (ИЛ-4)). Соответственно, антагонист SIRPa способен ингибировать поляризацию макрофагов по фенотипу M2 и/или способствует провоспалительной функции макрофагов типа M1 и может применяться в терапии.

Как определено в настоящем документе, "состояние, которое может быть улучшено или предотвращено путем модификации поляризации макрофагов с предпочтительным образованием провоспалительных макрофагов", соответствует, например, солидному раку, гемобластозу, инфекционному заболеванию, травме, аутоиммунному заболеванию, вакцинации, повреждению головного мозга, повреждению нервов, полицитемии, гемохроматозу или хроническому воспалительному заболеванию.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения любого состояния, которое может быть улучшено или предотвращено путем модификации поляризации макрофагов в провоспалительные макрофаги у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение указанному субъекту эффективного количества

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, определенных выше, или

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRPg.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение также относится к применению

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, определенных выше, или

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRPg.

в изготовлении лекарственного средства для лечения любого состояния, которое может быть улучшено или предотвращено путем модификации поляризации макрофагов в провоспалительные макрофаги.

Модификация поляризации макрофагов с преимущественным образованием провоспалительных клеток может быть полезной при ряде патологий или ситуаций. Как описано выше, такая модификация особенно полезна применительно к разным видам рака, для восстановления противоопухолевой активности макрофагов и/или для предотвращения проопухолевой активности макрофагов типа M2. Нефизиологические иммунные ответы вследствие избыточной поляризации макрофагов типа M2 также возникают при инфекционных заболеваниях, фиброзе, вакцинации, травме и хронических воспалительных заболеваниях.

Соответственно, согласно конкретному варианту реализации антитело к SIRPa можно применять для лечения индивидуума, который имеет рак, выбранный из группы, состоящей из разновидностей рака легкого, мезотелиом, разновидностей рака яичников, разновидностей рака печени, разновидностей рака мочевого пузыря, разновидностей рака головного мозга, разновидностей рака молочной железы, разновидностей рака толстой кишки, сарком, разновидностей рака поджелудочной железы, разновидностей рака головы и шеи, разновидностей рака почек, тимом, глиом, меланом и гематологических видов рака, таких как лимфомы (ходжкинская лимфома и неходжкинская лимфома), лейкозов, таких как Т- и В-клеточный острый или хронический лимфобластный лейкоз (ОЛЛ или ХЛЛ) или острый или хронический миелобластный лейкоз (ОМЛ или ХМЛ) и миелом. Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к

антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, или

антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

для применения в лечении патологии, выбранной из группы, состоящей из рака (в частности, разновидностей воспалительного рака и разновидностей рака с инфильтрированными миелоидными клетками, в частности, с инфильтрированными MDSC и/или TAM), инфекционного заболевания, хронического воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, неврологического заболевания, повреждения мозга, повреждения нервов, полицитемии, гемохроматоза, травмы, септического шока, хронического инфекционного заболевания (например, заболевания, вызванного *Pseudomonas* или ЦМВ), фиброза, атеросклероза, ожирения, сахарного диабета типа II и дисфункции трансплантата.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к способу лечения патологии, выбранной из группы, состоящей из рака (в частности, разновидностей воспалительного рака и разновидностей рака с инфильтрированными миелоидными клетками, в частности, с инфильтрированными MDSC и/или TAM), инфекционного заболевания, хронического воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, неврологического заболевания, повреждения головного мозга, повреждения нервов, полицитемии, гемохроматоза, травмы, септического шока, хронического инфекционного заболевания (например, заболевания, вызванного *Pseudomonas* или ЦМВ), фиброза, атеросклероза, ожирения,

сахарного диабета типа II и дисфункции трансплантата у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение указанному субъекту эффективного количества

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, определенных выше, или

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRP β , и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRP β ,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRP β , и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRP β .

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к применению

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, определенных выше, или

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRP β , и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRP β ,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRP β , и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRP β ,

в изготовлении лекарственного средства для лечения патологии, выбранной из группы, включающей рак (в частности, разновидности воспалительного рака и разновидности рака с инфильтрированными миелоидными клетками, в частности, с инфильтрированными MDSC и/или TAM), инфекционное заболевание, хроническое воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание, неврологическое заболевание, повреждение головного мозга, повреждение нервов, полицитемию, гемохроматоз, травму,

септический шок, хроническое инфекционное заболевание (например, заболевание, вызванное *Pseudomonas* или ЦМВ), фиброз, атеросклероз, ожирение, сахарный диабет II типа и дисфункцию трансплантата.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa человека или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, для вариантов применения, определенных выше, причем указанное антитело к SIRP человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела согласно настоящему изобретению вводят пациенту с симптомами SIRPa-положительной опухоли.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к

антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, или

антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRP β , и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRP β ,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRP β , и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRP β ,

для применения в вакцинации.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к способу вакцинации субъекта, включающему введение указанному субъекту эффективного количества

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, определенных выше, или

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRP β , и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRP β ,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRP β , и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRP β .

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к применению

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, определенных выше, или

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRP β , и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRP β ,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRP_g, и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRP_g,

для изготовления вакцины.

Супрессорные миелоидные клетки ограничивают эффективность вакцинации, особенно у маленьких детей. Следовательно, агенты, направленные против SIRPa/g, будут ограничивать благоприятный результат, который обеспечивается агентами, направленными против SIRPa, при развитии ответа на вакцину, предотвращая ответ Т-лимфоцитов на вакцинацию.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту различными путями, например, внутривенно (в/в), подкожно (п/к) или внутримышечно (в/м).

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить по отдельности или в комбинации с другим терапевтическим агентом, например, вторым моноклональным антителом человека или его антигенсвязывающим фрагментом. В другом примере антитело вводят вместе с другим агентом, например, иммуносупрессорным агентом, стимулирующим эритропоэз агентом (ESA), в комбинации с терапевтическими клеточными композициями и т.п.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, для применения, определенного выше, причем указанное антитело к SIRPa или антигенсвязывающий фрагмент комбинируют со вторым терапевтическим агентом.

В частности, антитела к SIRPa согласно настоящему изобретению можно комбинировать с некоторыми другими потенциальными стратегиями для преодоления механизмов уклонения опухоли от иммунного надзора, используя агенты, находящиеся на этапе клинических исследований или уже выпущенные на рынок (см. табл. 1 из Antonia et al. *Immuno-oncology combinations: a review of clinical experience and future prospects*. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 20, 6258-6268, 2014):

1) обращение ингибирования адаптивного иммунитета (блокирование путей контрольной точки Т-клеток), например, с использованием молекулы, направленной против CTLA4, против PD1 или против PD-L1;

2) переключение адаптивного иммунитета (усиление передачи сигналов с участием костимулирующего рецептора Т-клеток с использованием молекул агонистов, в частности, антител), например, путем нацеливания на CD137 (4-1BB) с использованием молекул агонистов, включая агонистические антитела к CD137 (анти-4-1BB) или лиганды CD137 (4-1BB);

3) улучшение функции врожденных иммунных клеток;

4) активация иммунной системы (усиление эффекторной функции иммунных клеток), например, посредством стратегий на основе вакцин.

Введение второго терапевтического агента может быть одновременным с введением антитела к SIRPa или может быть неодновременным. В зависимости от природы второго агента совместное введение может быть достигнуто с помощью комбинированного лекарственного препарата (продукта), также известного как "комбо". "Комбо" представляет собой комбинацию с фиксированной дозой, которая включает два или более активных фармацевтических ингредиентов, комбинированных в единую стандартную лекарственную форму, которая производится и распределяется в фиксированных дозах. Тем не менее, схема дозирования и/или путь введения также могут различаться.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанный второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из химиотерапевтических агентов, радиотерапевтических агентов, иммунотерапевтических агентов, агентов для клеточной терапии (таких как CAR-Т-клетки), антибиотиков и пробиотиков.

В частности, иммунотерапевтические агенты, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, выбраны из группы, состоящей из терапевтических вакцин (ДНК-, РНК- или пептидных вакцин), блокаторов или активаторов контрольной точки иммунитета, в частности, адаптивных иммунных клеток (Т-лимфоцитов или В-лимфоцитов) или иммуноконъюгатов, таких как конъюгаты антитело-лекарственный препарат.

В настоящем документе термин "иммунотерапевтические агенты" относится, в частности, к агентам, которые могут обеспечить превращение противоопухолевых вакцин, проявляющих интересные биологические феномены, в эффективные терапевтические агенты, включая: факторы роста Т-клеток для увеличения количества и репертуара наивных Т-клеток, факторы роста для увеличения количества дендритных клеток (ДК), агонисты для активации ДК и других антигенпрезентирующих клеток (АПК), адьюванты, обеспечивающие и дополняющие противораковые вакцины, агонисты для активации и стимуляции Т-клеток, ингибиторы блокады контрольных точек Т-клеток, факторы роста Т-клеток для усиления размножения и выживания иммунных Т-клеток, агенты для ингибирования, блокирования или нейтрализации раковых клеток и иммуносупрессорных цитокинов, происходящих из иммунных клеток.

В данной области техники известно множество блокаторов или активаторов контрольной точки иммунитета. Применительно к настоящему изобретению примеры блокаторов контрольной точки имму-

нитета или активаторов адаптивных иммунных клеток (В- или Т-лимфоцитов), которые пригодны для применения, включают агонисты, направленные против PDL1, PD1, CTLA4, CD137, CD2, CD28, CD40, HVEM, BTLA, CD160, TIGIT, TIM-1/3, LAG-3, 2B4, OX40 и CD40, CD40-L, агонисты TLR, агонисты, направленные против ICOS, ICOS-L и агонисты, направленные против рецепторов В-клеток, в частности, агонисты, направленные против PDL1, против PD1 и против CD137.

Указанный иммунотерапевтический агент также может представлять собой антитело, нацеленное на опухолевый антиген, в частности, выбранное из группы, состоящей из антитела к Her2, антитела к EGFR, антитела к CD20, антитела к CD19 и антитела к CD52.

Антитело может быть обеспечено в эффективной дозе от приблизительно 1 нг/кг массы тела до приблизительно 30 мг/кг массы тела или более. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения доза может находиться в диапазоне от 1 мкг/кг до приблизительно 20 мг/кг, необязательно от 10 мкг/кг до 10 мг/кг или от 100 мкг/кг до 5 мг/кг.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" или "эффективное количество" определяется как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения желательного действия. Подразумевается, что термин "эффективная доза" включает количество, достаточное для излечения или по меньшей мере частичного купирования заболевания и его осложнений у пациента, уже страдающего этим заболеванием. Количества или дозы, эффективные для указанного варианта применения, будут зависеть от состояния, подлежащего лечению, доставленной конструкции антитела, терапевтической ситуации и задач, степени тяжести заболевания, предшествующей терапии, истории болезни пациента и ответа на терапевтический агент, пути введения, размера (массы тела, площади тела или размера органа) и/или состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента, а также общего состояния собственной иммунной системы пациента. Надлежащую дозу можно корректировать так, чтобы ее можно было ввести пациенту один раз или с помощью нескольких введений, а также для того чтобы получить оптимальное терапевтическое действие.

Дозирование для указанных целей можно повторять по мере необходимости, например, ежедневно, два раза в неделю, еженедельно, два раза в месяц, ежемесячно или по мере необходимости во время рецидивов.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение также относится к антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, определенным выше, или

антителу к SIRPa или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

для применения в диагностическом тесте, в частности, в персонализированной медицине, более конкретно во вспомогательном диагностическом тесте.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к способу диагностики, в частности, в персонализированной медицине, более конкретно во вспомогательном диагностическом тесте, с применением

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, определенных выше, или

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к применению антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, определенных выше, или

антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и/или который не связывается специфически с Т-клетками, и/или не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и/или не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

в частности, который ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRPg, и который не связывается специфически с Т-клетками, и который не ингибирует пролиферацию Т-клеток, и который не ингибирует связывание CD47 с SIRPg,

в изготовлении лекарственного средства для диагностического теста, в частности, в персонализированной медицине, более конкретно во вспомогательном диагностическом тесте.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение также относится к способу диагностики в условиях *in vitro* или в условиях *ex vivo*, в частности, к способу диагностики, пригодному для применения в персонализированной медицине, более конкретно во вспомогательной диагностике, причем указанное антитело к SIRPa или его антигенсвязывающий фрагмент или его антигенсвязывающий миметик согласно настоящему изобретению применяют для детектирования SIRPa⁺ клеток в образце, ранее взятом у субъекта, и необязательно для количественного определения экспрессии SIRPa.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение также относится к применению антитела к SIRPa или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства, пригодного для применения в диагностическом тесте, в частности, для применения в персонализированной медицине, или во вспомогательном диагностическом тесте.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение также относится к по меньшей мере одному антителу к SIRPa человека или его антигенсвязывающему фрагменту, или антигенсвязывающему миметику антитела согласно настоящему изобретению в качестве средства для определения экспрессии и/или уровня экспрессии SIRPa в биологическом образце, ранее взятом у индивидуума.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение также относится к способу в условиях *in vitro* или в условиях *ex vivo* для определения у субъекта SIRPa-положительных клеток в биологическом образце, ранее взятом у указанного субъекта, включающему:

i) определение в условиях *in vitro* экспрессии и/или уровня экспрессии SIRPa в биологическом образце, ранее взятом у указанного субъекта, с применением антитела к SIRPa человека или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела согласно настоящему изобретению.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение также относится к применению, в частности, в условиях *in vitro* или в условиях *ex vivo*, по меньшей мере одного антитела к SIRPa человека или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела согласно настоящему изобретению в способе, в котором SIRPa используют в качестве биомаркера, который является прогностическим для ответа на лечение у субъекта, в частности, у субъекта, страдающего раком.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение также относится к способу, в условиях *in vitro* или в условиях *ex vivo*, предсказания ответа у субъекта, страдающего раком, на лечение, в частности, с применением антитела к SIRPa человека или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела согласно настоящему изобретению, включающему

определение уровня экспрессии SIRPa в образце опухоли, полученном ранее у субъекта, в частности, при лечении с применением антитела к SIRPa человека или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела согласно настоящему изобретению, и

сравнение уровня экспрессии SIRPa со значением, представляющим уровень экспрессии SIRPa в популяции субъектов без ответа на лечение,

причем более высокий уровень экспрессии SIRPa в образце опухоли субъекта является характерным для субъекта, который будет отвечать на лечение.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение также относится к способу определения в условиях *in vitro* или в условиях *ex vivo* присутствия SIRPa⁺ клеток в образце, ранее взятом у субъекта, который включает определение присутствия SIRPa в качестве биомаркера, который является прогностическим для ответа субъекта на лечение, в частности, ответа субъекта, у которого диагностирован рак, причем указанный способ включает:

определение уровня экспрессии SIRPa в образце опухоли, взятом ранее у субъекта, в частности, при лечении с применением антитела к SIRPa человека или его антигенсвязывающего фрагмента, или антигенсвязывающего миметика антитела, как определено в любом из пп.1-13, и

сравнение уровня экспрессии SIRPa со значением, представляющим уровень экспрессии SIRPa в популяции субъектов без ответа на лечение,

причем более высокий уровень экспрессии SIRPa в образце опухоли субъекта указывает на пациента, который будет отвечать на лечение.

Композиции

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, определенные выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящем документе термин "фармацевтическая композиция" включает композицию, подходящую для введения субъекту или пациенту, такому как млекопитающее, особенно человеку. В целом, "фармацевтическая композиция" является стерильной и обычно не содержит загрязняющих веществ, которые способны вызывать нежелательный ответ у субъекта (например, соединение (соединения) в фармацевтической композиции имеют фармацевтическую степень чистоты). Фармацевтические композиции могут быть предназначены для введения субъектам или пациентам, нуждающимся в этом, посредством ряда различных путей введения, включая пероральный, буккальный, ректальный, парентеральный, внутривенный, внутримышечный, интратрахеальный и т.п.

В настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает вспомогательное вещество, разбавитель, носитель и адъювант, которые можно применять для получения фармацевтической композиции, которые обычно являются безопасными, нетоксичными и не являются ни биологически, ни иным образом нежелательными, и включают вспомогательное вещество, разбавитель, носитель и адъювант, которые приемлемы для применения в ветеринарии, а также для фармацевтического применения у человека. В настоящем документе "фармацевтически приемлемый носитель" включает как один, так и более одного такого вспомогательного вещества, разбавителя, носителя и адъюванта.

В частности, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которая содержит в качестве активного ингредиента антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, определенные выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

Комбинированный продукт

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к терапевтическому средству, в частности, к комбинированному продукту, которое содержит в качестве активных ингредиентов: антитело к SIRPa или его антигенсвязывающий фрагмент, или антигенсвязывающий миметик антитела, определенные выше, и второй терапевтический агент, причем указанные активные ингредиенты приготовлены для монотерапии, последовательной или комбинированной терапии, в частности, для комбинированного или последовательного применения.

В частности, настоящее изобретение относится к комбинированному продукту, содержащему антитело к SIRPa или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий миметик антитела, определенные выше, и второй терапевтический агент для одновременного, раздельного или последовательного применения лекарственного средства.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к комбинированному продукту, определенному выше, в котором второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из химиотерапевтических агентов, радиотерапевтических агентов, агентов для клеточной терапии, иммунотерапевтических агентов, антибиотиков и пробиотиков.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к комбинированному продукту, определенному выше, в котором указанный иммунотерапевтический агент выбран из группы, состоящей из терапевтических вакцин, блокаторов или активаторов контрольной точки иммунитета, в частности, адаптивных иммунных клеток (Т- и В-лимфоцитов) и конъюгатов антитело-лекарственный препарат.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к комбинированному продукту, определенному выше, в котором указанный блокатор или активатор контрольной точки иммунитета адаптивных иммунных клеток (Т- и В-лимфоцитов) выбран из группы, состоящей из агонистов, направленных против PDL1, PD1, CTLA4, CD137, CD2, CD28, CD40, HVEM, BTLA, CD160, TIGIT, TIM-1/3, LAG-3, 2B4, OX40 и CD40, CD40-L, агонистов TLR, агонистов, направленных против ICOS, ICOS-L и агонистов, направленных против рецепторов В-клеток, в частности, выбранных из группы, состоящей из агонистов, направленных против PDL1, против PD1 и против CD137.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанный иммунотерапевтический агент представляет собой антитело, нацеленное на опухолевый антиген, в частности, выбранное из группы, состоящей из антитела к Her2, антитела к EGFR, антитела к CD20, антитела к CD19, антитела к CD52.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к комбинированному продукту, определенному выше, для одновременного, раздельного или последовательного применения в лечении любого состояния, которое может быть улучшено или предотвращено путем дифференцировки моноцитарных супрессорных клеток миелоидного происхождения (Mo-MDSC) в несупрессорные клетки.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к способу лечения любого состояния, которое может быть улучшено или предотвращено путем дифференцировки моноцитарных супрессорных клеток миелоидного происхождения (Mo-MDSC) в несупрессорные клетки у субъекта, нуждающегося в этом, включающему одновременное, раздельное или последовательное введение указанному субъекту эффективного количества комбинированного продукта, определенного выше.

Согласно одному варианту реализации изобретение относится к применению комбинированного продукта, определенного выше, в изготовлении лекарственного средства для лечения любого состояния, которое может быть улучшено или предотвращено путем дифференцировки моноцитарных супрессорных клеток миелоидного происхождения (Mo-MDSC) в несупрессорные клетки.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к комбинированному продукту, определенному выше, для одновременного, раздельного или последовательного применения в лечении любого состояния, которое может быть улучшено или предотвращено путем модификации поляризации макрофагов в провоспалительные макрофаги.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к способу лечения любого состояния, которое может быть улучшено или предотвращено путем модификации поляризации макрофагов в провоспалительные макрофаги у субъекта, нуждающегося в этом, включающему одновременное, раздельное или последовательное введение указанному субъекту эффективного количества комбинированного продукта, определенного выше.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к применению комбинированного продукта, определенного выше, в изготовлении лекарственного средства для лечения любого состояния, которое может быть улучшено или предотвращено путем модификации поляризации макрофагов в провоспалительные макрофаги.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к комбинированному продукту, определенному выше, для одновременного, раздельного или последовательного применения в лечении патологии, выбранной из группы, состоящей из рака, инфекционного заболевания, хронического воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, неврологического заболевания, повреждения головного мозга, повреждения нервов, полицитемии, гемохроматоза, травмы, септического шока, хронического инфекционного заболевания (например, заболевания, вызванного *Pseudomonas* или ЦМВ), фиброза, атеросклероза, ожирения, сахарного диабета типа II и дисфункции трансплантата, или для применения в вакцинации.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к способу лечения патологии, выбранной из группы, состоящей из рака, инфекционного заболевания, хронического воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, неврологического заболевания, повреждения мозга, повреждения нервов, полицитемии, гемохроматоза, травмы, септического шока, хронического инфекционного заболевания (например, заболевания, вызванного *Pseudomonas* или ЦМВ), фиброза, атеросклероза, ожирения, сахарного диабета типа II и дисфункции трансплантата у субъекта, нуждающегося в этом, включающему одновременное, раздельное или последовательное введение указанному субъекту эффективного количества комбинированного продукта, определенного выше.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к применению комбинированного продукта, определенного выше, в изготовлении лекарственного средства для лечения патологии, выбранной из группы, состоящей из рака, инфекционного заболевания, хронического воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, неврологического заболевания, повреждения головного мозга, повреждения нервов, полицитемии, гемохроматоза, травмы, септического шока, хронического инфекционного заболевания (например, заболевания, вызванного *Pseudomonas* или ЦМВ), фиброза, атеросклероза, ожирения, сахарного диабета тип II и дисфункции трансплантата, или к применению в вакцинации.

Нуклеиновые кислоты

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, определенный выше.

В настоящем документе молекула нуклеиновой кислоты может быть двухцепочечной и одноцепочечной, линейной и кольцевой. Молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно входит в состав вектора, который предпочтительно содержится в клетке-хозяине.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, определенные выше, причем указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит или состоит из по меньшей мере одной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 69.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, определенные выше, причем указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит

последовательность, кодирующую вариабельный домен тяжелой цепи указанного антитела, предпочтительно содержащую

SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60,

SEQ ID NO: 61 или SEQ ID NO: 62 и

SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 66, и/или

последовательность, кодирующую вариабельный домен легкой цепи указанного антитела, предпочтительно содержащую

SEQ ID NO: 67,

SEQ ID NO: 68, и

SEQ ID NO: 69.

Таблица 5

Последовательности, кодирующие CDR переменных доменов тяжелой цепи и CDR переменных доменов легкой цепи антител в соответствии с изобретением

Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие HCDR1 (соответствующие аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14)	AGCTATTGGGTGCAC	SEQ ID NO: 58
	TCTTATTGGGTGCAC	SEQ ID NO: 59
	TCCTATTGGGTGCAC	SEQ ID NO: 59
		SEQ ID NO: 59

		60
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HCDR2 (соответствующая аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15)	AACATCGACCCCAGCGACTC TGATACCCATTACAATCAGA AGTTTAAGGAC	SEQ ID NO: 61
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HCDR2 (соответствующая аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16)	AACATCGACCCCAGCGACTC TGATACACACTACTCCCCTA GCTTTCAGGGC	SEQ ID NO: 62
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HCDR3 (соответствующая аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17)	GGAGGAACCGGAACAATGG CTTGGTTTGCTTAC	SEQ ID NO: 63
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HCDR3 (соответствующая аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18)	GGAGGAACCGGCACACTGG CTTGGTTCGCTTAC	SEQ ID NO: 64
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HCDR3 (соответствующая аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19)	GGAGGAACCGGAACAATGG CTTACTTCGCTTAT	SEQ ID NO: 65
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HCDR3 (соответствующая аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20)	GGAGGAACCGGCACACTGG CTTACTTCGCTTAT	SEQ ID NO: 66
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая LCDR1 (соответствующая аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21)	AGGTCCAGCCAGTCCCTGGT GCACAGCTATGGCAACACAT ACCTGTAT	SEQ ID NO: 67
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая LCDR2 (соответствующая аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22)	AGGGTGTCTAATCGGTTCTC C	SEQ ID NO: 68
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая LCDR3 (соответствующая аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23)	TTTCAGGGCACCCATGTGCC ATACACA	SEQ ID NO: 69

В частности, настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 55.

Таблица 6

Последовательности, кодирующие переменные домены тяжелой цепи и
переменные домены легкой цепи антител в соответствии с изобретением

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая переменный домен тяжелой цепи антитела дикого типа (химерное антитело и мышинное антитело 18D5)	CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCAGGAGCTGA GCTGGTGAGGCCTGGCTCCAGCGTGAAGC TGTCTGCAAGGCTAGCGGCTACACCTTCA CAAGCTATTGGGTGCACTGGGTGAAGCAG CGGCCAATCCAGGGCCTGGAGTGGATCGG CAACATCGACCCAGCGACTCTGATACCC ATTACAATCAGAAGTTTAAGGACAAGGCC TCTCTGACCGTGGATAAGTCTTCCAGCACA GCTTATATGCAGCTGTCTTCCCTGACATTC GAGGATTCCGCCGTGTACTATTGCGTGAG GGGAGGAACCGGAACAATGGCTTGGTTTG CTTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACA GTGTCTGCT	SEQ ID NO: 46
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая переменный домен тяжелой цепи гуманизированного варианта (НA)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCTGA GGTGAAGAAGCCAGGCGAGTCTCTGAGGA TCTCCTGCAAGGCTAGCGGCTACACCTTCA CATCTTATTGGGTGCACTGGGTGCGGCAG ATGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGG CAACATCGACCCTAGCGACTCTGATACCC ACTACAATCAGAAGTTTAAGGACCATGTG ACCCTGTCTGTGGATAAGTCCATCAGCAC AGCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGG CCTCCGATACAGCTATGTACTATTGCGTGA GGGGAGGAACCGGAACAATGGCTTGGTTC	SEQ ID NO: 47

	GCTTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC AGTGTCTTCC	
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи гуманизированного варианта (НВ)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCTGA GGTGAAGAAGCCAGGCGAGTCTCTGAGGA TCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACTCCTTCA CCAGCTATTGGGTGCACTGGGTGCGGCAG ATGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGG CAACATCGACCCTAGCGACTCTGATACAC ACTACAATCAGAAGTTTAAGGACCATGTG ACCCTGAGCGTGGATAAGTCCATCAGCAC AGCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGG CCTCTGATACCGCTATGTACTATTGCGTGA GGGGAGGAACCGGAACAATGGCTTGGTTC GCTTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC AGTGTCTTCC	SEQ ID NO: 48
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи гуманизированного варианта (НС)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA GGTGAAGAAGCCAGGCGAGAGCCTGAGG ATCTCTTGCAAGGCTAGCGGCTACTCTTTC ACCTCCTATTGGGTGCACTGGGTGCGGCA GATGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGG GCAACATCGACCCCAGCGACTCTGATACA CACTACTCCCCTAGCTTTCAGGGCCATGTG ACCCTGTCCGTGGACAAGTCTATCTCCACA GCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGGC CAGCGATACCGCTATGTACTATTGCGTGA GGGGAGGAACCGGAACAATGGCTTGGTTC GCTTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC AGTGTCTTCC	SEQ ID NO: 49
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA GGTGAAGAAGCCAGGCGAGAGCCTGAGG ATCTCTTGCAAGGCTAGCGGCTACTCTTTC ACCTCCTATTGGGTGCACTGGGTGCGGCA GATGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGG GCAACATCGACCCCAGCGACTCTGATACA	SEQ ID NO: 50

гуманизированного варианта (HE)	CACTACTCCCCTAGCTTTCAGGGCCATGTG ACCCTGTCCGTGGACAAGTCTATCTCCACA GCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGGC CAGCGATAACCGCTATGTACTATTGCGTGA GGGGAGGAACCGGCACACTGGCTTGGTTC GCTTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC AGTGTCTTCC	
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи гуманизированного варианта (HF)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA GGTGAAGAAGCCAGGCGAGAGCCTGAGG ATCTCTTGCAAGGCTAGCGGCTACTCTTTC ACCTCCTATTGGGTGCACTGGGTGCGGCA GATGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGG GCAACATCGACCCCAGCGACTCTGATACA CACTACTCCCCTAGCTTTCAGGGCCATGTG ACCCTGTCCGTGGACAAGTCTATCTCCACA GCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGGC CAGCGATAACCGCTATGTACTATTGCGTGA GGGGAGGAACCGGAACAATGGCTTACTTC GCTTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC AGTGTCTTCC	SEQ ID NO: 51
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи гуманизированного варианта (HEF)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA GGTGAAGAAGCCAGGCGAGAGCCTGAGG ATCTCTTGCAAGGCTAGCGGCTACTCTTTC ACCTCCTATTGGGTGCACTGGGTGCGGCA GATGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGG GCAACATCGACCCCAGCGACTCTGATACA CACTACTCCCCTAGCTTTCAGGGCCATGTG ACCCTGTCCGTGGACAAGTCTATCTCCACA GCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGGC CAGCGATAACCGCTATGTACTATTGCGTGA GGGGAGGAACCGGCACACTGGCTTACTTC GCTTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC AGTGTCTTCC	SEQ ID NO: 52
Последовательность	GACGTGGTCATGACCCAGACACCACTGAG	SEQ ID NO:

нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельный домен легкой цепи антитела дикого типа (химерное антитело и мышинное антитело 18D5)	CCTGCCCCGTGTCCCTGGGCGATCAGGCCTC TATCTCCTGCAGGTCCAGCCAGTCCCTGGT GCACAGCTATGGCAACACATACCTGTATT GGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCC AAGCTGCTGATCTACAGGGTGTCTAATCG GTTCTCCGGCGTGCCTGACAGGTTCTCCGG CTCTGGCTCCGGCACCGATTTCACACTGAA GATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGACCTGG GCGTGTATTTCTGTTTTTCAGGGCACCCATG TGCCATACACATTTGGCTCTGGCACCAAGC TGGAGATCAAG	53
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельный домен легкой цепи гуманизированного варианта А (LA)	GACGTGGTCATGACACAGAGCCCACTGTC TCTGCCTGTGACCCTGGGACAGCCAGCCTC TATCTCCTGCAGGTCCAGCCAGTCCCTGGT GCACAGCTATGGCAACACATACCTGTATT GGTACCAGCAGAGGCCCGGACAGAGCCCA AGGCTGCTGATCTACAGGGTGTCTAATCG GTTCTCCGGCGTGCCTGACAGGTTTAGCGG CTCTGGCTCCGGCACCGATTTCACACTGAA GATCTCTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGG GCGTGTATTTCTGTTTTTCAGGGCACCCATG TGCCATACACATTTGGCGGCGGCACCAAG GTGGAGATCAAG	SEQ ID NO: 54
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельный домен легкой цепи гуманизированного варианта (LB)	GACGTGGTCATGACACAGAGCCCACTGTC TCTGCCTGTGACCCTGGGACAGCCAGCCTC TATCTCCTGCAGGTCCAGCCAGTCCCTGGT GCACAGCTACGGCAACACATACCTGTATT GGTTCCAGCAGAGGCCCGGACAGAGCCCA AGGCTGCTGATCTATAGGGTGTCTAATCG GTTCTCCGGCGTGCCTGACAGGTTTAGCGG ATCTGGATCCGGAACCGACTTCACCCCTGA AGATCTCTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTG GGCGTGTACTATTGTTTCCAGGGCACCCAT GTGCCATACACATTTGGCGGCGGCACCAA GGTGGAGATCAAG	SEQ ID NO: 55
	GGTGGAGATCAAG	

Векторы

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, определенную выше.

В настоящем документе термин "вектор" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, применяемую в качестве носителя для переноса генетического материала в клетку. Термин "вектор" включает плазмиды, вирусы, космиды и искусственные хромосомы. Обычно сконструированные векторы содержат точку начала репликации, сайт множественного клонирования и селективный маркер. Вектор как таковой обычно представляет собой нуклеотидную последовательность, обычно последовательность ДНК, которая содержит вставку (трансген) и большую последовательность, которая служит в качестве "остова" вектора. Современные векторы могут включать дополнительные конструктивные особенности,

помимо трансгенной вставки и остова: промотор, генетический маркер, ген резистентности к антибиотикам, репортерный ген, последовательность нацеливания, метку для очистки белка. Векторы, называемые векторами экспрессии (конструкции для экспрессии), специально предназначены для экспрессии трансгена в клетке-мишени и обычно имеют управляющие последовательности.

Клетки-хозяева

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к выделенной клетке-хозяину, содержащей вектор, определенный выше.

В настоящем документе подразумевается, что термин "клетка-хозяин" включает любую отдельную клетку или клеточную культуру, которая может быть или была реципиентом векторов, молекул экзогенных нуклеиновых кислот и полинуклеотидов, кодирующих конструкцию антитела согласно настоящему изобретению; и/или реципиентом конструкции антитела как таковой. Введение соответствующего материала в клетку можно осуществлять посредством трансформации, трансфекции и тому подобного. Термин "клетка-хозяин" также предназначен для включения потомства или потенциального потомства одной клетки. Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические или эукариотические клетки, а также включают, но не ограничиваются ими, бактерии, дрожжевые клетки, клетки грибов, растительные клетки и клетки животных, такие как клетки насекомых и клетки млекопитающих, например, мыши, крысы, кролика, макаки или человека.

Наборы

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к набору, содержащему: антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, определенный выше, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, вектор, содержащий указанную молекулу нуклеиновой кислоты, и/или клетку, содержащую указанный вектор.

В целях удобства антитело согласно настоящему изобретению может быть обеспечено в наборе, т.е. в упакованной комбинации реагентов.

Применительно к настоящему изобретению термин "набор" означает два или более компонентов (один из которых соответствует антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, молекуле нуклеиновой кислоты, вектору или клетке согласно настоящему изобретению), совместно упакованных в контейнер, введенных реципиенту или представленных в иной форме. Соответственно, набор можно описать как набор продуктов и/или инструментов, которые достаточны для достижения определенной цели, который может быть выпущен на рынок как единое целое.

Набор может содержать один или более реципиентов (таких как флаконы, ампулы, контейнеры, шприцы, бутылки, мешки) любой подходящей формы, размера и материала, содержащих конструкцию антитела согласно настоящему изобретению в соответствующей дозе для введения. Набор может дополнительно содержать указания для применения (например, в виде информационного листка или руководства по применению), средства для введения конструкции антитела согласно настоящему изобретению, такие как шприц, насос, инфузор или т.п., средства для восстановления конструкции антитела согласно настоящему изобретению и/или средства для разбавления конструкции антитела согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к набору, определенному выше, для единичной стандартной лекарственной формы. Набор согласно настоящему изобретению также может содержать первый реципиент, содержащий высушенную/лиофилизированную конструкцию антитела, и второй реципиент, содержащий водный состав. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены наборы, содержащие однокамерные и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидким содержимым и шприцы с лиофилизатом).

Антигены

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к полипептиду, в частности, к антигену, содержащему или состоящему из последовательности эпитопа SIRPa человека, состоящей из SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E).

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к полипептиду, в частности, к антигену, содержащему или состоящему из последовательности эпитопа SIRPa человека, состоящей из SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), причем указанный полипептид содержит до 300 аминокислот.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид согласно настоящему изобретению содержит от 50 до 300, предпочтительно от 100 до 250 аминокислот.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид согласно настоящему изобретению содержит до 50, 100, 150, 200, 250 или 300 аминокислот.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к полипептиду, в частности, к антигену, содержащему или состоящему из последовательности эпитопа SIRPa человека, состоящей из SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), и по меньшей мере одной последовательности эпитопа SIRPa человека, состоящей из SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDLTKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) или SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE).

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к полипептиду, в частности, к антигену, содержащему или состоящему из последовательностей эпитопа SIRPa человека, состоящих из SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDLTKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) и SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE).

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к полипептиду, в частности, к антигену, содержащему или состоящему из по меньшей мере одного пептида, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72, причем указанный полипептид состоит из последовательности, содержащей до 300 аминокислот.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к полипептиду, в частности, к антигену, содержащему или состоящему из пептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73 (YNQK), и/или пептида, имеющего аминокислотную последовательность SIR в пределах SIRPa, причем указанный полипептид состоит из последовательности, содержащей до 300 аминокислот.

Способ производства антитела

Согласно одному аспекту настоящее изобретение также относится к способу получения антитела, в частности, антитела согласно настоящему изобретению, включающему иммунизацию животного, не являющегося человеком, в частности, млекопитающего, не являющегося человеком, против по меньшей мере одного антигена, определенного выше, и, в частности, сбор полученной сыворотки от указанного иммунизированного животного, отличного от человека, для получения антител, направленных против указанного антигена.

В частности, настоящее изобретение также относится к способу получения антитела, включающему иммунизацию животного, отличного от человека, против антигена, содержащего или состоящего из последовательности эпитопа SIRPa человека, состоящей из SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), и, в частности, сбор полученной сыворотки у указанного иммунизированного животного, отличного от человека, для получения антител, направленных против указанного антигена.

В частности, настоящее изобретение также относится к способу получения антитела, включающему иммунизацию животного, отличного от человека, против антигена, содержащего или состоящего из последовательности эпитопа SIRPa человека, состоящей из SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), и по меньшей мере одной последовательности эпитопа SIRPa человека, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDLTKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) или SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE), и, в частности, сбор полученной сыворотки у указанного иммунизированного животного, отличного от человека, чтобы получить антитела, направленные против указанного антигена.

В частности, настоящее изобретение также относится к способу получения антитела, включающему иммунизацию животного, отличного от человека, против антигена, содержащего или состоящего из последовательностей эпитопа SIRPa человека, состоящих из SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDLTKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) и SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE), и, в частности, сбор полученной сыворотки у указанного иммунизированного животного, отличного от человека, чтобы получить антитела, направленные против указанного антигена.

Способ отбора антитела

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу отбора антитела согласно настоящему изобретению, антигенсвязывающего фрагмента или миметика указанного антитела, включающему или состоящему из по меньшей мере одного из следующих этапов:

- a) испытание (например, в соответствии со способом, описанным в примерах 1-3) способности антитела, антигенсвязывающего фрагмента или миметика указанного антитела связываться с SIRPa, в частности, с антигеном, определенным выше;
- b) испытание (например, в соответствии со способом, описанным в примерах 7 и 8), способности антитела, антигенсвязывающего фрагмента или миметика указанного антитела связываться с SIRPb;
- c) испытание (например, в соответствии со способом, описанным в примерах 9 и 10) способности антитела, антигенсвязывающего фрагмента или миметика указанного антитела связываться с SIRPg;
- d) испытание (например, в соответствии со способом, описанным в примерах 4 и 5), способности антитела, антигенсвязывающего фрагмента или миметика указанного антитела ингибировать связывание CD47 человека с SIRPa человека;
- e) испытание (например, в соответствии со способом, описанным в примере 12) способности антитела, антигенсвязывающего фрагмента или миметика указанного антитела связываться с Т-клетками;
- f) испытание (например, в соответствии со способом, описанным в примере 13) способности антитела, антигенсвязывающего фрагмента или миметика указанного антитела ингибировать пролиферацию Т-клеток;
- g) испытание (например, в соответствии со способом, описанным в примере 11) способности антитела, антигенсвязывающего фрагмента или миметика указанного антитела ингибировать связывание CD47 человека с SIRPg человека;

и необязательно включающего следующий этап:

отбор антитела, антигенсвязывающего фрагмента или миметика указанного антитела, который специфически связывается с SIRPa, в частности, с антигеном, определенным выше, и который значительно ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRP γ человека, и/или который не связывается специфически с Т-клетками человека, и/или который не ингибирует в значительной степени пролиферацию Т-клеток человека, и/или который не ингибирует в значительной степени связывание CD47 человека с SIRP γ человека; более конкретно, который специфически связывается с SIRPa, в частности, с антигеном, определенным выше, и который значительно ингибирует связывание CD47 с SIRPa и который не связывается специфически с SIRP γ человека и который не связывается специфически с Т-клетками человека, и который не ингибирует в значительной степени пролиферацию Т-клеток человека, и не ингибирует в значительной степени связывание CD47 человека с SIRP γ человека.

Способ отбора антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно может быть выполнен как дополнение к способу получения антитела согласно настоящему изобретению.

Следующие чертежи и примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание способов реализации и применения настоящего изобретения и не предназначены для ограничения объема изобретения, заявленного авторами настоящего изобретения, также предусмотрено, что приведенные ниже эксперименты не представляют собой все эксперименты или единственные выполненные эксперименты. Несмотря на то что настоящее изобретение было описано со ссылкой на конкретные варианты реализации, специалисты в данной области техники поймут, что могут быть выполнены различные изменения, и эквиваленты могут быть заменены, не отступая от точной сущности и объема настоящего изобретения. Помимо этого многие модификации могут быть сделаны для адаптации конкретной ситуации, материала, рассматриваемой композиции, способа, этапа или этапов способа для достижения задач, сущности и объема настоящего изобретения. Подразумевается, что все такие модификации включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

Условные обозначения к чертежам

Фиг. 1. Результаты исследований связывания антител к SIRPa методом ИФА (в качестве покрытия применяли SIRPa-His человека и детектировали каппа-цепь человека).

Оценка методом ИФА на иммобилизованном SIRPa-His химерного антитела (♦), HALA (□), HFLA (*), HFLB (+), HEFLA (▲), HEFLB (■), SIRP29 (Δ), Kwar23 (o) на фиг. А; HCLA (●), HCLB (x), HELA (◇), HELB (-) на фиг. В; HALB (-), HBLA (□), HBLB (■) на фиг. С. Обнаружение выполняли с помощью антитела осли к белку человека, и сигнал регистрировали колориметрическим методом при длине волны 450 нм с использованием субстрата ТМВ. ЭД₅₀ представляет собой концентрацию указанного антитела, необходимую для достижения 50% сигнала в данном исследовании. Связывание клона m18D5 (■) (n=4), коммерческого клона SE5A5 (▲) (n=7), клона 6G10 (▽) (n=3) и клона 12D7 (□) (n=4) на фиг. D.

Фиг. 2. Исследование аффинности антител к SIRP на рекомбинантном белке SIRP человека с помощью системы Biacore.

Рекомбинантный белок SIRPa-His иммобилизовали на чипе CM5 в концентрации 5 мкг/мл (500 ед.откл.) и добавляли указанные антитела в различных концентрациях. Значения измеряли после периода ассоциации (ka) в течение 3 мин с последующим периодом диссоциации (kd) в течение 10 мин для определения константы аффинности (KD).

Фиг. 3. Исследование связывания антител к SIRPa на моноцитах человека (гомозиготных по варианту SIRPa 1 (v1/v1)).

(А, В) Оценка на моноцитах человека v1/v1 (ранее окрашенных ингибиторным антителом, связывающимся с рецептором Fc человека) химерного антитела (♦), HALA (□), HFLA (*), HFLB (+), HEFLA (▲), HEFLB (■), SIRP29 (Δ), Kwar23 (o) с помощью цитофлуорометрии. Обнаружение проводили с помощью меченого фикоэритрином (ФЭ) мышиного антитела к Fc человека на цитометре CantoII, значения соответствуют проценту окрашенных моноцитов. ЭД₅₀ представляет собой концентрацию указанного антитела, необходимую для достижения 50% сигнала в данном исследовании. На фиг. А приведены значения процентного содержания окрашенных моноцитов v1/v1. На фиг. В приведены средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) моноцитов v1/v1.

(С, D) Исследование связывания антител к SIRPa на моноцитах человека методом проточной цитометрии (FACS): испытывали различные антитела к SIRPa: m18D5 (■) (n=1), SE7C2 (▲) (n=2), 12D7 (□) (n=2), 6G10 (♦) (n=4): На фиг. С представлены средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) различных антител в зависимости от дозы. На фиг. D представлены значения процентного содержания окрашенных моноцитов в зависимости от дозы антитела. Статистический анализ проводили по мере возможности.

(Е, F, G) Связывание вариантов SIRPa антителами к SIRPa человека в популяции. Способность различных антител к SIRPa человека связывать варианты SIRPa измеряли у 32 добровольцев методом FACS с помощью ФЭ-конъюгированного антитела к IgG мыши. Все клоны испытывали в концентрации 10 мкг/мл: m18D5 (■), 12D7 (▼), 6G10 (♦) и коммерческие антитела SE5A5 (□), SE7C2 (Δ). На фиг. Е представлены результаты для добровольцев, гомозиготных по варианту 1 (n=16). На фиг. F представлены ре-

зультаты для добровольцев, гомозиготных по варианту 2 ($n=8$). На фиг. G представлены результаты для добровольцев, гетерозиготных по варианту V1/V2 ($n=8$).

Фиг. 4. Конкуренция антител к SIRPa с CD47 на SIRPa.

(А) Оценка методом ИФА химерного антитела (◆), HFLA (*), HFLB (+), HEFLA (▲), HEFLB (■), SIRP29 (Δ), Kwar23 (o) в различных концентрациях, инкубированных с фиксированной концентрацией биотинилированного CD47-Fc (6 мкг/мл), на иммобилизованном SIRPa-His. Обнаружение выполняли с помощью пероксидазы-стрептавидина для детектирования молекулы CD47, и сигнал регистрировали колориметрическим методом при длине волны 450 нм с использованием субстрата ТМБ. Результаты второго эксперимента приведены со значениями ИК₅₀. ИК₅₀ представляет собой концентрацию указанного антитела, необходимую для ингибирования 50% сигнала в данном исследовании.

(В) Исследование антагонистического действия антител к SIRPa на взаимодействие SIRPa-CD47 методом ИФА: испытывали зависимость ответа различных антител к SIRPa от дозы: клон m18D5 (■) ($n=1$), коммерческое антитело SE5A5 (▲) ($n=2$) и m12D7 (□) ($n=2$). На фигуре представлен процент CD47-положительных взаимодействий SIRPa-CD47, измеренный методом ИФА при исследовании дозозависимого ответа антител к SIRPa человека.

Фиг. 5. Конкуренция антител к SIRPa с CD47 на моноцитах человека.

(А, В) Оценка химерного антитела (◆), HFLA (*), HFLB (+), HEFLA (▲), HEFLB (■) в различных концентрациях, инкубированных с фиксированной концентрацией биотинилированного CD47-Fc (10 мкг/мл), на моноцитах человека (v1/v1) с помощью цитометрии. Молекулу CD47 детектировали с использованием фикоэритрина-стрептавидина, и сигнал регистрировали с помощью цитометра CantoII. ИК₅₀ представляет собой концентрацию указанного антитела, необходимую для ингибирования 50% сигнала в данном исследовании. На фиг. А приведен процент положительных клеток. На фиг. В представлены средние значения интенсивности флуоресценции.

(С) Исследование антагонистического действия антител к SIRPa на взаимодействие SIRPa-CD47 методом FACS: испытывали зависимость ответа различных антител к SIRPa от дозы: клон m18D5 (■) ($n=1$), коммерческое антитело SE7C2 (▲) ($n=2$) и m12D7 (□) ($n=2$). На фиг. С представлен процент CD47-положительных клеток, измеренный методом FACS, после конкуренции с антителами к SIRPa человека.

Фиг. 6. (А) Исследование с помощью системы BLItz™ аффинности антитела SIRP в отношении рекомбинантного белка SIRPa после предварительной инкубации в присутствии лиганда SP-D или в его отсутствие. Рекомбинантный белок SIRPa-His иммобилизовали на биосенсоре NINTA в концентрации 10 мкг/мл, после этого вносили лиганд SP-D в концентрации 100 мкг/мл (насыщающая концентрация). Затем добавляли антитело к SIRPa в концентрации 20 мкг/мл, и значения аффинности были установлены после периода ассоциации в течение 120 с (ka) с последующим периодом диссоциации в течение 120 с (kd) для определения константы аффинности (KD). (В) Исследование аффинности антитела SIRP в отношении рекомбинантного белка SIRPa человека, предварительно инкубированного с мышиным антителом 18D5, с помощью системы BLItz™. Рекомбинантный белок SIRPa-His иммобилизовали на биосенсоре NINTA в концентрации 10 мкг/мл и добавляли антитело к SIRPa в концентрации 20 мкг/мл (насыщающая концентрация). Затем добавляли лиганд SP-D в концентрации 100 мкг/мл, и значения аффинности были установлены после периода ассоциации в течение 120 с (ka) с последующим периодом диссоциации в течение 120 с (kd) для определения константы аффинности (KD).

Фиг. 7. (А) Исследование аффинности антител к SIRP в отношении рекомбинантного белка SIRPb человека с помощью системы BLItz™.

Рекомбинантный белок SIRPb-His иммобилизовали на биосенсоре NINTA, и указанные антитела добавляли в концентрации 20 мкг/мл. Значения были установлены после периода ассоциации в течение 120 с (ka) с последующим периодом диссоциации в течение 120 с (kd) для определения константы аффинности (KD). (В) Анализ связывания антител к SIRP (в качестве покрытия использовали SIRPb-His человека и детектировали каппа-цепь человека). Связывание HEFLB (■), SIRP29 (Δ), Kwar23 (o), B4B6 (◆) и контрольного IgG4 (■) с иммобилизованным SIRPb-His оценивали методом ИФА. Обнаружение выполняли с использованием антитела осли к белку человека, за исключением B4B6, который выявляли с помощью мышиного антитела, и сигнал детектировали колориметрическим методом при длине волны 450 нм с использованием субстрата ТМБ.

Фиг. 8. (А) Исследование аффинности антител к SIRP в отношении рекомбинантного белка SIRPg человека с помощью системы BLItz™.

Рекомбинантный белок SIRPg-His иммобилизовали на биосенсоре NINTA и указанные антитела добавляли в концентрации 10 мкг/мл. Значения были установлены после периода ассоциации в течение 120 с (ka) с последующим периодом диссоциации в течение 120 с (kd) для определения константы аффинности (KD). (В) Связывание антител к SIRP на SIRPg (в качестве покрытия использовали SIRPg-His человека и детектировали каппа-цепь человека) количественно исследовали методом ИФА. Связывание HEFLB (■), SIRP29 (Δ), Kwar23 (o), LSB2-20 (●) и контрольного IgG4 (■) на иммобилизованном SIRPg-His оценивали методом ИФА. Обнаружение выполняли с использованием антитела осли к белку человека, и сигнал детектировали колориметрическим методом при длине волны 450 нм с использованием субстрата ТМБ.

Фиг. 9. Исследование аффинности CD47 в отношении рекомбинантного белка SIRP_g человека, предварительно инкубированного с антителами к SIRP, с помощью системы BLItz™. Рекомбинантный белок SIRP_g-His иммобилизовали на биосенсоре NINTA в концентрации 10 мкг/мл, и указанные антитела добавляли в концентрации 20 мкг/мл (насыщающая концентрация). Затем добавляли CD47Fc в концентрации 100 мкг/мл, и значения аффинности были установлены после периода ассоциации в течение 120 с (ka) с последующим периодом диссоциации в течение 120 с (kd) для определения константы аффинности (KD).

Фиг. 10. Геометрические средние значения интенсивности флуоресценции, измеренные методом проточной цитометрии на (А) периферических CD3⁺ Т-клетках человека, (В) эритроцитах или (С) тромбоцитах после окрашивания различными моноклональными антителами и выявления с использованием вторичного флуоресцентномеченого антитела к IgG.

Фиг. 11. Процент положительных периферических CD3⁺ Т-клеток человека после окрашивания различными моноклональными антителами. В таблице указано значение процента положительных клеток в экспериментах с двумя повторами.

Фиг. 12. Т-клетки человека, выделенные из мононуклеарных клеток периферической крови здоровых добровольцев, стимулировали с использованием (А) (С) гранул, специфичных в отношении CD3⁺ и CD28, в соотношении 1:1 в течение 3 дней или (В) (D) с использованием аллогенных дендритных клеток (ДК) в соотношении 5 Т-клеток: 1 ДК в течение 5 дней, или (Е) с использованием различных концентраций неочищенного белкового производного туберкулина (PPD) в течение 5 дней. Антитела добавляли на 0 день культивирования. Пролиферацию измеряли путем встраивания H³-тимидина в течение последних 12 ч культивирования.

Фиг. 13. Мышиные CD8⁺ Т-клетки выделяли из спленоцитов наивных мышей. CD8 Т-клетки стимулировали с использованием гранул, специфичных в отношении CD3⁺ и CD28, взятых в соотношении 1:1 в течение 3 дней. Антитела добавляли на 0 день культивирования. Пролиферацию измеряли путем встраивания H³-тимидина в течение последних 12 ч культивирования.

Фиг. 14. Т-клетки человека, выделенные из мононуклеарных клеток периферической крови здоровых добровольцев, стимулировали с использованием аллогенных дендритных клеток (ДК) в соотношении 5 Т-клеток: 1 ДК в течение 5 дней.

Антитела добавляли на 0 день культивирования. Пролиферацию измеряли путем встраивания H³-тимидина в течение последних 12 ч культивирования.

Фиг. 15. (А) Противоопухолевое действие антител к SIRP_a (клон P84) при в/б введении три раза в неделю в течение 4 недель (300 мкг/инъекцию) в комбинации с двумя инъекциями (4 и 8 день) МАТ к 4-1-BB (клон 3H3, 100 мкг/инъекцию) или без указанного антитела, или инъекциями (два раза в неделю) антитела к PDL-1 (клон 10F.9G2, 200 мкг/инъекцию, лечение в течение 4 недель) или без указанного антитела в ортотопической модели гепатомы мыши (2,5×10⁶ клеток Нера 1.6, которые вводили путем инъекции в портальную вену на 0 день). Мышей считали вылеченными, если период их выживания в три раза превышал время, в течение которого умирали все контрольные мыши. (В) Инфильтрирующие опухоль клетки исследовали на 13 день после инокуляции опухоли. (С) Инфильтрирующие опухоль клетки и клетки селезенки исследовали на 13 день после инокуляции опухоли. (D) Мышей, ранее вылеченных в модели гепатомы с помощью инъекции комбинации антитела к SIRP_a и антитела к 4-1BB, или мышей, мутантных по SIRP_a, получавших антитело к 4-1BB, повторно заражали путем инъекции клеток Нера 1.6 в селезенку (2,5×10⁶ клеток/мышь). Одновременно с этим наивные мыши также получали инъекции, вводимые аналогичным путем, чтобы сравнить развитие опухоли с мышами после повторного заражения. После этого мыши не получали лечения. (Е) Мышей, ранее вылеченных в модели гепатомы с помощью введения комбинации антитела к SIRP_a и антитела к 4-1BB, повторно заражали путем инъекции клеток Нера 1.6 в селезенку (2,5×10⁶ клеток/мышь), и их селезенки собирали через 30 дней после повторного заражения. Выделяли спленоциты и Т-клеточные спленоциты. Наивные мыши получали внутривенные инъекции носителя, целых спленоцитов (10×10⁶/мышь) или Т-клеток, очищенных от спленоцитов (2,5×10⁶/мышь), и все мыши получали инъекции клеток Нера 1.6 в селезенку (2,5×10⁶ клеток/мышь). После этого мыши не получали лечения и считались вылеченными, если период их выживания превышал в три раза время, в течение которого умирали все контрольные мыши.

Фиг. 16. Мышей, ранее вылеченных в модели гепатомы путем инъекции комбинации антитела к SIRP_a и антитела к PDL1, повторно заражали путем инъекции клеток Нера 1.6 в селезенку (2,5×10⁶ клеток/мышь). Одновременно с этим наивные мыши также получали инъекции, вводимые аналогичным путем, чтобы сравнить развитие опухоли с мышами после повторного заражения. После этого мыши не получали лечения.

Фиг. 17. Противоопухолевое действие антитела к SIRP_a (клон P84) при в/б введении три раза в неделю в течение 4 недель (200 мкг/инъекцию) в ортотопической модели мышинной карциномы молочной железы (0,25×10⁶ 4T1 клеток, инъецированных в молочную железу). Развитие опухоли оценивали путем измерения диаметра опухоли и рассчитывали по формуле: $\pi(0,5 \cdot d^2)^{1,5}$. Мышей подвергали эвтаназии, когда размер развилвшейся опухоли составлял приблизительно 1000 мм³, в соответствии с этическими руководствами.

Фиг. 18. Исследование фенотипа иммунных клеток в селезенке, опухоли и лимфатических узлах мышей, получавших антитело к SIRPa (клон P84) или контрольное МАТ внутривенно три раза в неделю в течение двух недель (200 мкг/инъекцию) в ортотопической модели карциномы молочной железы мыши ($0,25 \times 10^6$ клеток 4T1, инъецированных в молочную железу). Исследование иммунных клеток проводили через две недели после инокуляции опухоли.

Фиг. 19. Антитело к SIRPa (клон P84), антитело к CD47 (клон M1AP410) и нецелевое антитело для контроля изотипа вводили в концентрации 12 мг/кг внутривенно на 0 день и 2 день мышам линии C57B1/6. Образцы крови собирали на 0 и 3 день в пробирки, содержащие ЭДТА, и общий анализ крови выполняли с помощью гематологического анализатора XS-800i (Sysmex). Уровень гемоглобина (слева) и процент гематокрита (справа) оценивали на 3 день. Пунктирные линии представляют значения нормального диапазона у мышей линии C57B1/6 для каждого параметра.

Фиг. 20. (Верхняя панель) Исследование методом проточной цитометрии МАТ к SIRPa (HEFLB, серый) и МАТ к CD47 (B6H12, черный) в сравнении с контрольным МАТ (пунктирная линия) на тромбоцитах человека, свежеевыделенных из крови здоровых доноров. (Нижняя панель) Измерение агрегации тромбоцитов человека в присутствии 50 мкг/мл контрольного МАТ, антитела к SIRPa (HEFLB), антитела к CD47 (B6H12) или антитела к интегринам αIIb в качестве положительного контроля ингибитора агрегации с помощью оптического агрегометра. Антитела оценивали на неактивированных и АДФ-активированных тромбоцитах.

Фиг. 21. Аллогенные $CD4^+$ Т-клетки культивировали в соотношении 1:1 с $CD14^+$ миелоидными клетками, экстрагированными из (А) свежих или (В) замороженных асцитов рака яичников, в присутствии 10 мкг/мл контрольного антитела (белый), антитела к SIRPa, HEFLB (черный), или МАТ к CD47 (серый). Пролиферацию измеряли на 5 день путем встраивания H^3 -тимидина. (С) В другом варианте аллогенные Т-клетки культивировали в соотношении 5:1 с аллогенными дендритными клетками и различным соотношением $CD14^+$ миелоидных клеток, экстрагированных из асцитов рака яичников, в присутствии 10 мкг/мл антитела, указанного в (А).

Примеры

В следующих примерах антитело "18D5" (или "m18D5") соответствует мышинному антителу 18D5, "химерное" антитело соответствует химерному антителу мыши/человека 18D5 и антитела "HALA, HALB, HBLA, HBLB, HCLA, HCLB, HELA, HELB, HFLA, HFLB, HEFLA и HEFLB" соответствуют конкретным гуманизированным вариантам 18D5. Антитела 6G10 и 12D7 принадлежат Заявителю; эти антитела были получены тем же способом, как и m18D5, и используются в качестве контроля. Указанные контрольные антитела представляют собой мышинные моноклональные антитела IgG2a к SIRPa человека.

Помимо этого для сравнения использовали коммерческие антитела. Первое антитело представляет собой антитело к SIRPa, названное SE7C2 (Santa Cruz sc-23863); второе антитело представляет собой антитело, способное распознавать оба SIRP α/β и названное SE5A5 (BioLegend BLE323802); и третье антитело представляет собой антитело к SIRPa человека, названное Kwar23 (Creative Biolabs). Антитело к SIRPa человека, названное SIRP29, из Университета Торонто, описанное в РСТ публикации WO2013056352, использовали для сравнения.

Пример 1. Исследования связывания антител к SIRPa на SIRPa методом ИФА.

Способ: активность связывания антител к SIRPa оценивали методом ИФА. Для проведения количественного исследования методом ИФА с использованием химерного антитела, гуманизированные антитела, SIRP29 и Kwar23, рекомбинантный SIRPa человека (Sino Biologicals, Пекин, Китай; каталожный номер 11612-H08H) иммобилизовали на пластике в концентрации 0,5 мкг/мл в карбонатном буфере (pH 9,2) и очищенное антитело добавляли, чтобы измерить связывание. После инкубации и промывки добавляли меченое пероксидазой антитело ослы к IgG человека (Jackson ImmunoResearch, США, каталожный номер 709-035-149) и выявляли обычными способами.

Для проведения количественного исследования методом ИФА с использованием антител мыши, рекомбинантный SIRPa человека (Sino Biologicals, Пекин, Китай; каталожный номер 10975-H08H) иммобилизовали на пластике в концентрации 0,5 мкг/мл в карбонатном буфере (pH 9,2) и добавляли очищенное антитело, чтобы измерить связывание. После инкубации и промывки добавляли меченое пероксидазой козье антитело к цепи Fc мыши (Jackson ImmunoResearch, каталожный номер 115-036-071) и выявляли обычными способами.

Результаты: как показано на фиг. 1A, 1B и 1C, активность связывания различных антител к SIRPa на SIRPa, измеренная методом ИФА, характеризовалась эффективными концентрациями (EC_{50}), составившими 2,9 нг/мл для химерного антитела, 3,9 нг/мл для HALA, 5,1 нг/мл для HFLA, 4,0 нг/мл для HFLB, 7,1 нг/мл для HEFLA, 4,4 нг/мл HEFLB в первом эксперименте, 4,06 нг/мл для химерного антитела, 5,60 нг/мл для HCLA, 5,59 нг/мл для HCLB, 4,61 нг/мл для HELA, 4,13 нг/мл для HELB во втором эксперименте и 2,74 нг/мл для химерного антитела, 2,53 нг/мл для HALB, 2,68 нг/мл для HBLA, 2,95 нг/мл для HBLB в третьем эксперименте. Полученные результаты указывают на то, что антитела согласно настоящему изобретению эффективно связывали SIRPa, согласно результатам ИФА, по сравнению с другими известными антителами к SIRPa, SIRP29 (3,7 нг/мл) и Kwar23 (3,3 нг/мл). Полученные

результаты указывают на то, что эпитоп, распознаваемый всеми антителами согласно настоящему изобретению, является доступным, когда SIRPa нанесен на пластиковую лунку.

Как показано на фиг. 1D, активность связывания различных антител к SIRPa на SIRPa, измеренная методом ИФА, характеризовалась эффективной дозой (ED_{50}), составившей 0,16 нМ (24 нг/мл) для SE5A5 и 0,06 нМ (9 нг/мл) для клона m18D5. Клоны 6G10 и 12D7, по-видимому, не связывались с SIRPa, согласно результатам ИФА. Полученные результаты указывают на то, что клон m18D5 эффективно связывал SIRPa, согласно данным ИФА, по сравнению с коммерческим антителом, и указывают на то, что эпитоп, распознаваемый этим клоном, является доступным, когда SIRPa нанесен на пластиковую лунку, по сравнению с клонами 6G10 и 12D7.

Пример 2. Измерение аффинности антител к SIRPa в отношении SIRPa с помощью биосенсора.

Способ: рекомбинантный SIRPa человека (Sino Biologicals, Пекин, Китай, каталожный номер 11612-H08H) иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 (GeHealthcare, Франция) в концентрации 5 мкг/мл (500 ед.откл.), и различные концентрации антител вносили при скорости потока 40 мкл/мин. Исследование проводили с использованием системы BIAcore 3000 (Biacore, GeHealthcare). Значения измеряли после 3 мин периода ассоциации (ka) с последующим 10 мин периодом диссоциации (kd) для определения константы аффинности (KD).

Результаты: как показано на фиг. 2, антитела согласно настоящему изобретению имеют более высокую аффинность (KD) в отношении SIRPa (от $1,93 \times 10^{-10}$ М до $3,67 \times 10^{-10}$ М), которая эквивалентна аффинности известных антител к SIRPa, SIRP29 и Kwar23, и превышает аффинность коммерческих антител к SIRPa, SE7C2 и SE5A5.

Пример 3. Исследование связывания SIRPa на моноцитах человека методом цитофлуориметрии.

Способ: для измерения связывания антител к SIRPa на моноцитах человека, сначала добавляли ингибитор связывания с рецептором Fc человека (BD Pharmingen, США; каталожный номер 564220) и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, чтобы заблокировать рецепторы Fc человека на моноцитах человека для снижения неспецифического связывания. Затем антитела инкубировали в течение 30 мин при 4°C и промывали перед окрашиванием в течение 30 мин при 4°C с использованием ФЭ-меченого антитела к Fc IgG человека (BioLegend; США; каталожный номер 409303). В случае антител мыши использовали ФЭ-меченое антитело к IgG мыши (Jackson ImmunoResearch; каталожный номер 715-116-151). Образцы исследовали на цитофлуориметре BD LSR II или Canto II.

Результаты: как показано на фиг. 3, результаты указывают на сильное связывание антител к SIRPa согласно настоящему изобретению на моноцитах человека и более эффективное связывание (измеренное на основании MFI (медиана интенсивности флуоресценции)), чем связывание известных антител к SIRPa, Kwar23, SE7C2 и SE5A5.

Пример 4. Количественное исследование конкурентного связывания CD47 и антител к SIRPa методом ИФА для оценки антагонистической активности.

Способ: для проведения количественного исследования конкурентного связывания методом ИФА рекомбинантный SIRPa человека (Sino Biologicals, Пекин, Китай, каталожный номер 11612-H08H) иммобилизовали на пластике в концентрации 0,5 мкг/мл в карбонатном буфере (pH 9,2). В случае химерного антитела гуманизированные антитела, SIRP29 и Kwar23, очищенное антитело (в различных концентрациях) смешивали с биотинилированным CD47Fc человека (AcroBiosystems interchim, Франция, каталожный номер CD7-H82F6) в конечной концентрации 6 мкг/мл (фиксированная концентрация), чтобы измерить конкурентное связывание в течение 2 ч при 37°C. После инкубации и промывки меченый пероксидазой стрептавидин (Vector laboratoring, США; каталожный номер SA-5004) добавляли для детектирования связывания с биотин-CD47Fc и выявляли обычными способами.

При применении мышиных антител очищенное антитело (в различных концентрациях) смешивали с 0,04 мкг/мл CD47Fc (Sino Biologicals, Пекин, Китай, каталожный номер 12283-H02H) для измерения конкурентного связывания в течение 2 ч при 37°C. После инкубации и промывки меченое пероксидазой антитело осла к цепи Fc человека (Jackson ImmunoResearch, каталожный номер 709-035-149) добавляли для детектирования связывания CD47Fc и выявляли обычными способами.

Результаты: как показано на фиг. 4, антитела согласно настоящему изобретению обладали антагонистической активностью в отношении взаимодействия SIRPa-CD47. В частности, наблюдали, что химерное антитело, HFLA, HFLB, HEFLA и HEFLB обладали лучшей антагонистической активностью по сравнению с антагонистической активностью SIRP29 и коммерческого антитела к SIRPa, SE5A5.

Пример 5. Количественное исследование конкурентного связывания CD47 и гуманизированных антител к SIRPa на моноцитах человека методом цитофлуориметрии для оценки антагонистической активности.

Способ: для измерения конкуренции между CD47 и гуманизированными антителами к SIRPa на моноцитах человека, очищенное антитело добавляли на моноциты и инкубировали в течение 15 мин при 4°C, затем смешивали с биотинилированным CD47Fc человека (AcroBiosystems Interchim, Франция; каталожный номер CD7-H82F6) в конечной концентрации 5 мкг/мл и инкубировали в течение 30 мин при 4°C, чтобы измерить конкурирующее связывающееся антитело. После инкубации и промывки ФЭ-

меченый стрептавидин (BD Biosciences, США, каталожный номер 554061) добавляли и инкубировали в течение 15 мин при 4°C для детектирования связывания биотин-CD47Fc и исследовали на цитофлуориметре BD LSRII или Canto II.

Чтобы измерить конкуренцию между CD47 и мышиными антителами к SIRPa человека на моноцитах человека, очищенное антитело добавляли на моноциты в течение 15 мин при 4°C, затем смешивали с CD47Fc (Sino Biologicals, Пекин, Китай, каталожный номер 12283-H02H) в конечной концентрации 5 мкг/мл и инкубировали в течение 15 мин при 4°C, чтобы измерить конкурирующее связывающееся антитело. После инкубации и промывки FITC-меченое антитело к Fc человека (Beckman Coulter, каталожный номер IM1627) добавляли и инкубировали в течение 15 мин при 4°C для детектирования связывания CD47Fc и исследовали на цитофлуориметре BD LSRII или Canto II.

Результаты: как показано на фиг. 5, антитела согласно настоящему изобретению обладают антагонистической активностью в отношении взаимодействия SIRPa-CD47 на моноцитах человека.

Пример 6. Исследование конкурентного связывания в присутствии SP-D с помощью системы BLItz™.

Способ: данный способ выполняли с помощью системы BLItz™ (Forté Bio, США, каталожный номер C22-2 № 61010-1).

Условие A: SIRPa + антитело к SIRPa + белок сурфактанта D (SP-D). На первом этапе рекомбинантный белок SIRPa (His) (Sino Biologicals, Пекин, Китай, каталожный номер 11612-H08H) иммобилизовали в концентрации 10 мкг/мл посредством гистидинового хвоста на биосенсоре Ni-NTA (Forté Bio, США, каталожный номер 18-0029) в течение 30 с. На втором этапе антитела к SIRPa добавляли в концентрации 20 мкг/мл (насыщающая концентрация) в течение 120 с. Затем SP-D человека (R&D Systems, США, каталожный номер 1920-SP-050) ассоциировали в концентрации 100 мкг/мл, в условиях конкуренции с антителами к SIRPa, в течение 120 с.

Диссоциацию SP-D проводили в кинетическом буфере в течение 120 с. Анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения BLItz™ pro 1.2, с помощью которого рассчитали константу ассоциации (k_a) и константу диссоциации (k_d), а также определили константу аффинности KD (k_a/k_d).

Условие B: SIRPa + белок сурфактанта D (SP-D) + антитело к SIRPa. На первом этапе рекомбинантный белок SIRPa (His) (Sino Biologicals, Пекин, Китай, каталожный номер 11612-H08H) иммобилизовали посредством гистидинового хвоста в концентрации 10 мкг/мл на биосенсоре Ni-NTA (Forté Bio, США, каталожный номер 18-0029) в течение 30 с. На втором этапе SP-D человека (R&D Systems, США, каталожный номер 1920-SP-050) добавляли в концентрации 100 мкг/мл в течение 120 с. Затем антитела к SIRPa ассоциировали в концентрации 20 мкг/мл (насыщающая концентрация) в течение 120 с. Диссоциацию антитела к SIRPa проводили в кинетическом буфере в течение 120 с. Анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения BLItz™ pro 1.2, с помощью которого рассчитали константу ассоциации (k_a) и константу диссоциации (k_d), а также определили константу аффинности KD (k_a/k_d).

Результаты: как показано на фиг. 6, связывание антитела к SIRPa, 18D5, не блокировало связывание SP-D с SIRPa, и связывание SP-D не блокировало связывание 18D5 с SIRPa. Следовательно, антитело согласно настоящему изобретению не ингибирует взаимодействие SIRPa и SP-D.

Пример 7. Исследование аффинности антител к SIRPa в отношении SIRPb с помощью системы BLItz™.

Способ: данный способ выполняли с помощью системы BLItz™ (Forté Bio, США каталожный номер C22-2 № 61010-1). Рекомбинантный hSIRPb-His (Antibodies-online, США, каталожный номер ABIN3077231) иммобилизовали посредством гистидинового хвоста в концентрации 10 мкг/мл на биосенсоре Ni-NTA (Forté Bio, США, каталожный номер 18-0029) в течение 30 с. Затем антитело к SIRPa ассоциировали в концентрации 20 мкг/мл в течение 120 с. Диссоциацию антитела к SIRPa проводили в кинетическом буфере в течение 120 с. Анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения BLItz™ pro 1.2, с помощью которого рассчитали константу ассоциации (k_a) и константу диссоциации (k_d), а также определили константу аффинности KD (k_a/k_d).

Результаты: как показано на фиг. 7A, антитела согласно настоящему изобретению имели более низкую аффинность в отношении SIRPb по сравнению с SIRPa. В частности, отмечено, что химерное антитело, HFLA, HFLB, HEFLA, HEFLB имели сниженную аффинность в отношении SIRPb по сравнению с SIRP29 и Kwar23.

Пример 8. Исследования связывания антител к SIRP на SIRPb методом ИФА.

Способ: для количественного исследования активности методом ИФА, рекомбинантный hSIRPb-His (Antibodies-online; США; каталожный номер ABIN1466557) иммобилизовали на пластике в концентрации 1 мкг/мл в карбонатном буфере (pH 9,2) и очищенное антитело добавляли, чтобы измерить связывание. После инкубации и промывки меченое пероксидазой антитело осли к IgG человека (Jackson ImmunoResearch, США, каталожный номер 709-035-149) добавляли и выявляли обычными способами.

Результаты: как показано на фиг. 7B, антитела к SIRPa имели низкую аффинность в отношении SIRPb. Следует указать, что обнаружение выполняли с использованием антитела осли к антителу человека для всех антител за исключением B4B6 (обнаруживали с использованием мышиного антитела), это

может объяснить тот факт, что сигнал, полученный для антитела к SIRPb, B4B6, ниже сигнала, полученного для антител к SIRPa.

Пример 9. Исследование аффинности антител к SIRPa в отношении SIRPg с помощью системы BLItz™.

Способ: данный способ выполняли с помощью системы BLItz™ (Forté Bio, США каталожный номер C22-2 № 61010-1). Рекомбинантный hSIRPg-His (Sino Biologicals, Пекин, Китай, каталожный номер 11828-H08H) иммобилизовали посредством гистидинового хвоста в концентрации 10 мкг/мл на биосенсоре Ni-NTA (Forté Bio, США, каталожный номер 18-0029) в течение 30 с. Затем антитело к SIRPa ассоциировали в концентрации 20 мкг/мл в течение 120 с. Диссоциацию антитела к SIRPa проводили в кинетическом буфере в течение 120 с. Анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения BLItz™ pro 1.2, с помощью которого рассчитали константу ассоциации (k_a) и константу диссоциации (k_d), а также определили константу аффинности KD (k_a/k_d).

Результаты: как показано на фиг. 8A, антитела к SIRPa согласно настоящему изобретению имели низкую аффинность в отношении SIRPg. Такая аффинность незначительно слабее, чем аффинность известных антител к SIRPa, SIRP29 и Kwar23. Однако кинетические свойства различались у антител к SIRPa, SIRP29 и Kwar23, при этом для антител к SIRPa была характерна высокая константа скорости диссоциации (K_d) по сравнению с SIRP29 и Kwar23. В частности, антитело HFLB имело самую низкую аффинность в отношении SIRPg со значением KD, составившим $1,036 \times 10^{-7}$ М, что равно разнице в 2 log по сравнению со значениями KD для SIRP29 и Kwar23.

Пример 10. Исследование связывания антител к SIRPa на SIRPg методом ИФА.

Способ: для количественного исследования активности методом ИФА, hSIRPg-His (Sino Biologicals, Пекин, Китай, каталожный номер 11828-H08H) иммобилизовали на пластике в концентрации 1 мкг/мл в карбонатном буфере (pH 9,2) и добавляли очищенное антитело, чтобы измерить связывание. После инкубации и промывки меченое пероксидазой антитело осли к IgG человека (Jackson ImmunoResearch, США, каталожный номер 709-035-149) добавляли и выявляли обычными способами.

Результаты: как показано на фиг. 8B, антитело к SIRPa, HEFLB, не связывалось с SIRPg, тогда как известные антитела к SIRPa, SIRP29 и Kwar23, проявляли значительное связывание с SIRPg.

Пример 11. Исследование конкуренции с CD47 за связывание с SIRPg с помощью системы BLItz™: SIRPg + антитело к SIRPa + CD47.

Способ: данный способ выполняли с помощью системы BLItz™ (Forté Bio, США, каталожный номер C22-2 № 61010-1). На первом этапе hSIRPg-His (Sino Biologicals, Пекин, Китай, каталожный номер 11828-H08H) иммобилизовали в концентрации 10 мкг/мл посредством гистидинового хвоста на биосенсоре Ni-NTA (Forté Bio, США, каталожный номер 18-0029) в течение 30 с. На втором этапе антитело к SIRPa добавляли в концентрации 20 мкг/мл (насыщающая концентрация) в течение 120 с. Затем CD47Fc человека (Sino Biologicals, Пекин, Китай, каталожный номер 12283-H02H) ассоциировали в концентрации 100 мкг/мл, в условиях конкуренции с антителами к SIRPa, в течение 120 с. Диссоциацию CD47Fc проводили в кинетическом буфере в течение 120 с. Анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения BLItz™ pro 1.2, с помощью которого рассчитали константу ассоциации (k_a) и константу диссоциации (k_d), а также определили константу аффинности KD (k_a/k_d).

Результаты: как показано на фиг. 9, антитело к SIRPa, HEFLB, согласно настоящему изобретению не конкурировало с CD47 за связывание с SIRPg. Напротив, другие известные антитела SIRP29 и, в частности, kwar23, конкурировали с CD47 за связывание с SIRPg.

Пример 12. Исследование связывания с эритроцитами методом проточной цитометрии.

Способ: эксперимент проводили для исследования связывания антител к SIRPa на клетках крови человека. CD3-положительные Т-лимфоциты, эритроциты и тромбоциты экстрагировали из очищенной крови от здоровых добровольцев. Затем клетки окрашивали в течение 30 мин при 4°C с использованием 10 мкг/мл каждого испытываемого антитела, промывали и затем окрашивали вторичным флуоресцентномеченым антителом к IgG в течение еще 30 мин при 4°C. После промывок клетки исследовали на проточном цитометре CANTO II (BD Bioscience).

Результаты: как показано на фиг. 10, Т-клетки, эритроциты и тромбоциты были положительными на наличие CD47, который повсеместно экспрессируется, и клетки были окрашены антителом B6H12. Антитела SIRP29 и Kwar23, такие как LSB2.20 (специфическое антитело к SIRPγ), связываются с Т-клетками, которые, как известно, экспрессируют SIRPγ. Тем не менее, гуманизированное антитело к SIRPa, 18D5, не связывалось с Т-клетками (аналогичные результаты были получены с использованием четырех различных испытанных вариантов гуманизированного 18D5). Эритроциты и тромбоциты не экспрессируют SIRPa и, следовательно, они не были выявлены с помощью гуманизированного антитела 18D5 и других антител к SIRPa. Полученный результат свидетельствует о специфичности гуманизированного антитела 18D5 в отношении SIRPa на живых клетках по сравнению с известными антителами к SIRPa.

Как показано на фиг. 11, Т-клетки не окрашивались гуманизированным антителом 18D5 (аналогичные результаты были получены при использовании пяти различных испытанных гуманизированных ва-

риантов 18D5) и химерным 18D5 (данные не показаны), тогда как более 70% Т-клеток окрашивались SIRP29 и Kwar23.

Пример 13. Пролиферация CD3⁺ Т-клеток человека.

Способ: МКИК человека выделяли из лейкоцитарной пленки здоровых добровольцев. CD4 или CD8 Т-клетки отбирали путем положительного отбора с использованием AutoMACS (Miltenyi) и высевали в 96-луночный планшет (50000 клеток/лунку). Пролиферативные сигналы обеспечивали с помощью микрогранул, покрытых агентами против CD3/CD28 (LifeTechnologies), в соотношении 1 гранула: 1 Т-клетка в течение трех дней или аллогенных зрелых дендритных клеток, полученных в условиях *in vitro*, в соотношении 5 Т-клеток: 1 зрелая ДК в течение 5 дней или с помощью разных концентраций неочищенного белкового производного туберкулина (PPD) в течение 5 дней. Антитела, нацеленные на путь SIRPa/CD47, добавляли в начале испытания пролиферации в насыщающей концентрации (10 мкг/мл). Пролиферацию измеряли путем встраивания H³-тимидина в течение последних 12 ч культивирования.

Результаты: как показано на фиг. 12, антитело к SIRPa, HALA, и варианты HEFLB не ингибировали пролиферацию Т-клеток при стимуляции Т-клеток гранулами, специфичными в отношении CD3⁺/CD28 (A) (C), или аллогенными дендритными клетками (B) (D) или PPD (E), в то время как антитело к SIRPa, Kwar23, ингибировало пролиферацию Т-клеток при стимуляции Т-клеток аллогенными дендритными клетками. Как и ожидалось, антитела к CD47 и антитело к SIRPg являлись ингибиторами пролиферации Т-клеток.

Пример 14. Пролиферация CD8⁺ Т-клеток мыши.

Способ: спленоциты выделяли у наивных мышей. CD8 Т-клетки отбирали с помощью положительного отбора с использованием AutoMACS (Miltenyi) и высевали в 96-луночный планшет (50000 клеток/лунку). Пролиферативные сигналы обеспечивали с помощью микрогранул, специфичных в отношении CD3/CD28 (LifeTechnologies), в соотношении 1 гранула: 1 Т-клетка в течение трех дней. Мышиное антитело к SIRPa (P84) и антитело к CD47 (MIAP310), нацеленные на путь SIRPa/CD47, добавляли в начале испытания пролиферации в насыщающей концентрации (10 мкг/мл). Пролиферацию измеряли путем встраивания H³-тимидина в течение последних 12 ч культивирования.

Результаты: как показано на фиг. 13, антитело к SIRPa или антитело к CD47 не ингибировали пролиферацию Т-клеток мыши. Этот результат объясняется тем фактом, что мыши не экспрессируют ген SIRPg. Следовательно, мышей можно использовать в качестве модели для предсказания эффектов специфического антитела к SIRPa, которое не связывается с SIRPg, в условиях *in vivo*. Напротив, доклиническая эффективность антитела к CD47 или неселективных антител к SIRPa в условиях *in vivo*, в частности, влияние на адаптивный иммунитет и выработку Т-лимфоцитов памяти, не обладает прогностической ценностью у человека.

Пример 15. Пролиферация Т-клеток человека

Способ: МКИК человека выделяли из лейкоцитарной пленки здоровых добровольцев. CD4 или CD8 Т-клетки отбирали с помощью положительного отбора с использованием AutoMACS (Miltenyi) и высевали в 96-луночный планшет (50000 клеток/лунку). Пролиферативные сигналы обеспечивали с помощью микрогранул, специфичных в отношении CD3/CD28 (LifeTechnologies), в соотношении 1 гранула: 1 Т-клетка в течение трех дней, или аллогенных зрелых дендритных клеток, полученных в условиях *in vitro*, в соотношении 5 Т-клеток: 1 зрелая ДК в течение 5 дней. Антитела добавляли в начале испытания пролиферации в насыщающей концентрации (5 мкг/мл для антител к CD47 и антител к SIRPa и 2,5 мкг/мл для антител к PD-1/PD-L1 и рекомбинантного 4-1BBL). Пролиферацию измеряли путем встраивания H³-тимидина в течение последних 12 ч культивирования.

Результаты: как показано на фиг. 14, антитела к PD-1/PD-L1 и рекомбинантный 4-1BBL оказывали стимулирующее действие на пролиферацию Т-клеток человека, в то время как антитело к CD47 оказывало отрицательное воздействие на пролиферацию Т-клеток человека. В частности, антитело к CD47 предотвращало иммуностимулирующую эффективность агонистических агентов, направленных против PD-1/PD-L1 или 4-1BB, в отношении Т-клеток человека. Антитело к SIRPa, HEFLB, не оказывало значительного влияния на пролиферацию Т-клеток.

Пример 16. Противоопухолевые эффекты у мышей.

Способ: мышей анестезировали с использованием коктейля ксилазин/кетамин. После лапаротомии опухолевые клетки Нера 1.6 вводили путем инъекции в портальную вену ($2,5 \times 10^6$ клеток/100 мкл) в ФСБ. Лечение начинали через 4 дня после инъекции опухоли. Агонистическое моноклональное антитело к 4-1BB (3H3) вводили путем внутрибрюшинной инъекции два раза на 4 и 8 день после инъекции клеток Нера 1.6 (клетки карциномы печени, НСС) в ФСБ (100 мкг/инъекцию). Моноклональное антитело к PDL1 вводили путем внутрибрюшинной инъекции два раза в неделю в течение 4 недель в ФСБ (200 мкг/инъекцию). Антагонистическое антитело к SIRPa (P84) вводили путем внутрибрюшинной инъекции три раза в неделю в течение четырех недель в ФСБ (300 мкг/инъекцию).

Противоопухолевый ответ оценивали в ортотопической модели НСС через тринадцать дней после инокуляции опухоли. В это время опухоль и селезенку собирали, чтобы фенотипировать иммунные клетки, которые инфильтрировали в опухоль или попадали в системный кровоток. Спленоциты и непаренхиматозные клетки (НПК) печени, которые являются инфильтрирующими иммунными клетками,

окрашивали с использованием четырех различных смесей для регистрации методом проточной цитометрии.

Результаты: как показано на фиг. 15A, антитело к SIRPa по отдельности значительно увеличивало выживаемость у доли мышей (28%). В комбинации с антителом к 4-1BB или антителом к PDL1 антитело к SIRPa обеспечивало очень высокую частоту ответа у мышей, которые выживали даже после отмены лечения.

Как показано на фиг. 15B, комбинация антитела к SIRPa с костимулирующим агентом (например, антителом к 4-1BB) или ингибитором контрольной точки Т-клеток (например, антителом к PDL1) модифицировала микроокружение опухоли путем уменьшения количества регуляторных и иммуносупрессорных иммунных клеток (регуляторных Т-клеток, Мо-MDSC), увеличивая при этом накопление эффекторных CD8⁺ Т-клеток памяти, в случае комбинации с антителом к 4-1BB. Мо-MDSC характеризуются высоким уровнем экспрессии Ly6C и отсутствием Ly6G в популяции, положительной на наличие CD11b и отрицательной на наличие ГКГС класса II.

Как показано на фиг. 15C, комбинация антитела к SIRPa с костимулирующим агентом (например, антителом к 4-1BB) или ингибитором контрольной точки Т-клеток (например, антителом к PDL1) модифицировала клеточный состав микроокружения опухоли и на периферии в селезенке, уменьшая частоту незрелых и наивных В-клеток, увеличивая при этом накопление клеток памяти и плазмобластов. Аналогичным образом, комбинация антитела к SIRPa с антителом к 4-1BB или антителом к PDL1 индуцировала накопление цитолитических (CD27-отрицательных) NK-клеток в опухоли и на периферии.

В совокупности полученные результаты указывают на то, что антитело к SIRPa модифицировало опухоль и периферический иммунитет, в частности, адаптивные (Т-клетки, регуляторные Т-клетки, В-клетки) и врожденные (MDSC, макрофаги, NK-клетки) иммунные клетки, способствующие устранению опухоли и долгосрочной защите.

Пример 17. Противоопухолевые эффекты у ранее вылеченных мышей.

Способ: мышей, ранее вылеченных в модели гепатомы с помощью инъекций комбинации антитела к SIRPa и антитела к 4-1BB, или мышей, мутантных по SIRPa, получавших антитело к 4-1BB, повторно заражали путем инъекции клеток Нера 1.6 в селезенку ($2,5 \times 10^6$ клеток/мышь). Мышей анестезировали с использованием 3% изофлурана в воздухе. Затем на боку мышей делали разрез, извлекали селезенку, и опухолевые клетки Нера 1.6 в ФСБ вводили в селезенку путем инъекции ($2,5 \times 10^6$ клеток/50 мкл). Одновременно с этим наивные мыши также получали инъекции, вводимые аналогичным путем, чтобы сравнить развитие опухоли с мышами после повторного заражения.

Результаты: как показано на фиг. 15D, все вылеченные мыши выжили при повторном заражении, и, напротив, все наивные мыши погибли. Этот результат демонстрирует, что терапия антителом к SIRPa или отсутствие сигналов SIRPa (мышь, мутантная по SIRPa) приводили к индукции Т-клеток памяти, которые все еще сохранялись в течение длительного срока у вылеченных мышей.

Пример 18. Противоопухолевые эффекты Т-клеточных спленоцитов или целых спленоцитов, собранных у ранее вылеченных мышей.

Способ: мышей после повторного заражения, вылеченных с помощью комбинации антитела к SIRPa и антитела к 4-1BB, подвергали эктаназии и собирали селезенку. После лизиса эритроцитов экстрагировали спленоциты, и CD3-положительные Т-клетки выделяли из части спленоцитов с помощью AutoMACS. После анестезии мышам вводили путем внутривенной инъекции Т-клеточные спленоциты ($2,5 \times 10^6$ клеток/100 мкл) или целые спленоциты (10×10^6 клеток/100 мкл) или только вспомогательное вещество (ФСБ). Все мыши получали клетки Нера 1.6 через портальную вену, как описано ранее ($2,5 \times 10^6$ клеток/100 мкл).

Результаты: как показано на фиг. 15E, спленоциты и выделенные Т-лимфоциты, собранные у вылеченных мышей, оказывали сильное положительное влияние на выживание мышей. Эти результаты указывают на то, что Т-клетки памяти присутствовали среди спленоцитов вылеченных мышей после лечения гепатомы и были ответственны за долгосрочную адаптивную иммунную память.

Пример 19. Противоопухолевые эффекты у ранее вылеченных мышей.

Способ: мышей, ранее вылеченных в модели гепатомы путем инъекции комбинации антитела к SIRPa и антитела к PDL-1, повторно заражали путем инъекции клеток Нера 1.6 в селезенку ($2,5 \times 10^6$ клеток/мышь). Мышей анестезировали с использованием 3% изофлурана в воздухе. Затем на боку мышей делали разрез, извлекали селезенку, и опухолевые клетки Нера 1.6 в ФСБ вводили путем инъекции в селезенку ($2,5 \times 10^6$ клеток/50 мкл). Одновременно с этим наивные мыши также получали инъекции, вводимые аналогичным путем, чтобы сравнить развитие опухоли с мышами после повторного заражения.

Результаты: как показано на фиг. 16, все вылеченные мыши выжили при повторном заражении и, напротив, все наивные мыши погибли. Этот результат свидетельствовал о том, что Т-клетки памяти все еще присутствовали у вылеченных мышей. Этот результат продемонстрировал, что терапия с применением антитела к SIRPa индуцировала Т-клетки памяти, которые все еще сохранялись в течение длительного времени у вылеченных мышей.

Пример 20. Влияние на рост опухоли в модели карциномы молочной железы.

Способ: мышей анестезировали с использованием 3% изофлурана в воздухе. Мышей брили в области брюшной полости, и клетки 4T1 в 50 мкл ФСБ вводили путем инъекции с помощью инсулинового шприца (30 Gauges) в молочную железу. Антагонистическое антитело к SIRPa (P84) или контрольное антитело в ФСБ вводили путем внутрибрюшинной инъекции три раза в неделю в течение четырех недель (200 мкг/инъекцию).

Результаты: как показано на фиг. 17, антитело к SIRPa значительно ($p < 0,01$) уменьшало рост опухоли в модели карциномы молочной железы по сравнению с контрольным антителом.

На фиг. 18 представлены результаты исследования иммунных клеток через две недели после инокуляции. Антитело к SIRPa оказывало положительное действие на миелоидные и немиелоидные клетки (Т и НК-клетки) как в опухоли, так и на периферии (селезенке) с сильным снижением количества регуляторных Т-клеток и накоплением Т-клеток памяти.

Пример 21. Влияние антител к SIRPa на концентрацию гемоглобина и гематокрит.

Способ: антитело к SIRPa (клон P84), антитело к CD47 (клон MIAP410) и нецелевое антитело для контроля изотипа вводили внутрибрюшинно на 0 и 2 день в концентрации 12 мг/кг мышам линии C57B1/6. Образцы крови собирали на 0 и 3 день в пробирки, содержащие ЭДТА, и общий анализ крови проводили с помощью гематологического анализатора XS-800i (Sysmex). Уровень гемоглобина (слева) и процент гематокрита (справа) оценивали на 3 день.

Результаты: как показано на фиг. 19, антитело к SIRPa не оказывало токсического действия на концентрацию гемоглобина и гематокрит. Напротив, антитело к CD47 индуцировало снижение концентрации гемоглобина и уменьшение гематокрита, что согласовывалось с анемией, наблюдаемой во время фазы 1 у человека.

Пример 22. Агрегация тромбоцитов.

Способ: кровь собирали у здоровых добровольцев-доноров в пробирки для сбора образцов Vacuette (Greiner Bio-One), содержащие в качестве буфера цитрат натрия. Обогащенную тромбоцитами плазму крови (PRP) и обедненную тромбоцитами плазму крови (PPP) получали путем центрифугирования в течение 10 мин при 200g и 15 мин при 3500g, соответственно. Рабочую PRP корректировали до 3×10^8 тромбоцитов/ $\mu\text{л}$. Количественные исследования ингибирования: MAT предварительно инкубировали с PRP для конечной концентрации испытываемых антител 40 или 50 мкг/мл. Через 3 мин без перемешивания агрегацию тромбоцитов инициировали добавлением 5 мкМ АДФ. Агрегацию определяли путем измерения пропускания света через образец при 37°C при непрерывном перемешивании с использованием стандартного оптического агрегометра (TA-8V Thrombo-Aggregometer, SD Innovation SAS, Фруар, Франция). Пропускание PPP устанавливали как 100%. Агрегацию регистрировали при перемешивании в общей сложности в течение 5 мин. Количественные исследования индукции: агрегацию тромбоцитов непосредственно инициировали добавлением MAT (50 мкг/мл). Агрегацию регистрировали при перемешивании в общей сложности в течение 10 мин.

Результаты: как показано на фиг. 20, в отличие от антител к CD47, антитела к SIRPa не связывались с эритроцитами или тромбоцитами человека. Следовательно, антитело к CD47 индуцировало агрегацию тромбоцитов в условиях *in vitro*, тогда как антитела к SIRPa не оказывали такого действия. Аналогичным образом, антитела к SIRPa не нарушали обратимую АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека, тогда как антитело к интегрину $\alpha 2b$ полностью нейтрализовало ее.

Пример 23. Пролиферация аллогенных Т-клеток под действием SIRPa-блокирующих CD14⁺ клеток из асцита рака яичников.

Способ: аллогенные CD4-Т-клетки выделяли с помощью положительного отбора с использованием AutoMACS (Miltenyi) из МКПК человека из лейкоцитарной пленки здорового добровольца. CD4 высевали в 96-луночный планшет (50000 клеток/луночку). CD14⁺ клетки выделяли аналогичным способом из асцита пациентки с раком яичников. Клетки CD14⁺ высевали с аллогенными CD4-Т-клетками в соотношении 1:1 в течение 5 дней. В некоторых условиях аллогенные дендритные клетки моноцитарного происхождения человека (moDC), созревание которых индуцировали ЛПС, добавляли в соотношении 1:5 для стимуляции Т-клеток, и исследовали иммуносупрессорное действие различного соотношения CD14⁺ MDSC, очищенных из асцита. Антитела, нацеленные на путь SIRPa/CD47, добавляли в начале испытания пролиферации в насыщающей концентрации (10 мкг/мл). Пролиферацию измеряли путем встраивания H³-тимидина в течение последних 12 ч культивирования.

Результаты: как показано на фигурах 21A и 21B, свежие и замороженные миелоидные клетки человека (TAM), очищенные из асцитов рака яичников, представляли собой гипостимулирующие аллогенные Т-лимфоциты человека. В отличие от антител к CD47, антитела к SIRPa модифицировали свойства миелоидных клеток, обеспечивая активацию и пролиферацию Т-клеток человека.

Как показано на фиг. 21C, миелоидные клетки человека (MDSC), очищенные из асцитов рака яичников, могли подавлять пролиферацию Т-клеток человека, индуцированную аллогенными moDC при соотношении миелоидных клеток и Т-клеток 1:1 и 2:1. В отличие от антител к CD47, антитела к SIRPa не усиливали иммуносупрессию, индуцированную MDSC человека.

10. Антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, в котором константный домен тяжелой цепи антитела происходит из константного домена тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

11. Антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10, в котором константный домен тяжелой цепи антитела состоит из последовательности SEQ ID NO: 34.

12. Антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, которое содержит

тяжелую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42, и

легкую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45.

13. Антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, которое содержит

тяжелую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42, и

легкую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44.

14. Антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, которое содержит

тяжелую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41, и

легкую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44.

15. Антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, которое содержит

тяжелую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41, и

легкую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45.

16. Антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-15, которое является антагонистом SIRPa и ингибирует связывание CD47 человека с SIRPa человека.

17. Антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16, которое не ингибирует связывание CD47 человека с SIRP_g человека.

18. Антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-17 для изготовления лекарственного средства.

19. Антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-17 для предотвращения или лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из рака, в частности воспалительного рака и рака с инфильтрированными миелоидными клетками, в частности с инфильтрированными MDSC (супрессорными клетками миелоидного происхождения) и/или TAM (ассоциированными с опухолью макрофагами), инфекционного заболевания, хронического воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, неврологического заболевания, повреждения головного мозга, повреждения нервов, полицитемии, гемохроматоза, травмы, септического шока, хронического инфекционного заболевания, фиброза, атеросклероза, ожирения, сахарного диабета типа II и дисфункции трансплантата, или для вакцинации.

20. Фармацевтическая композиция для предотвращения или лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из рака, инфекционного заболевания, хронического воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, неврологического заболевания, повреждения мозга, повреждения нервов, полицитемии, гемохроматоза, травмы, септического шока, хронического инфекционного заболевания, фиброза, атеросклероза, ожирения, сахарного диабета типа II и дисфункции трансплантата, или для применения для вакцинации, содержащая по меньшей мере одно антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент, определенный в любом из пп.1-17, и фармацевтически приемлемый носитель.

21. Фармацевтическая композиция по п.20, характеризующаяся тем, что заболевание представляет собой воспалительный рак или рак с инфильтрованными миелоидными клетками, в частности MDSCs и/или TAM, или хроническое инфекционное заболевание, вызванное *Pseudomonas* или ЦМВ.

22. Комбинированный продукт для предотвращения или лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из рака, инфекционного заболевания, хронического воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, неврологического заболевания, повреждения мозга, повреждения нервов, полицитемии, гемохроматоза, травмы, септического шока, хронического инфекционного заболевания, фиброза, атеросклероза, ожирения, сахарного диабета типа II и дисфункции трансплантата, или для применения для вакцинации, содержащий

по меньшей мере одно антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент, определенный в любом из пп.1-17, и

по меньшей мере один второй терапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из химиотерапевтических агентов, радиотерапевтических агентов, иммунотерапевтических агентов, агентов для клеточной терапии, антибиотиков и пробиотиков; в частности иммунотерапевтических агентов, выбранных из группы, состоящей из блокатора контрольных точек или активатора адаптивных иммунных кле-

ток, особенно выбранного из группы, состоящей из агонистов, направленных против PDL1, PD1, CTLA4, CD137, CD2, CD28, CD40, HVEM, BTLA, CD160, TIGIT, TIM-1/3, LAG-3, 2B4, OX40 и CD40, CD40-L, агонистов TLR, агонистов, направленных против ICOS, ICOS-L и агонистов, направленных против рецепторов В-клеток.

23. Комбинированный продукт по п.22, характеризующийся тем, что заболевание представляет собой воспалительный рак или рак с инфильтрованными миелоидными клетками, в частности MDSCs и/или TAM, или хроническое инфекционное заболевание, вызванное *Pseudomonas* или ЦМВ.

24. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело к SIRPa человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-17.

25. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с п.24.

26. Выделенная клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с п.24 и/или вектор в соответствии с п.25.

27. Способ определения *in vitro* или *ex vivo* SIRPa-положительных клеток у субъекта по биологическому образцу, ранее взятому у указанного субъекта, включающий:

i) *in vitro* определение экспрессии и/или уровня экспрессии SIRPa в биологическом образце, ранее взятом у указанного субъекта, с применением антитела к SIRPa человека или его антигенсвязывающего фрагмента, определенного в любом из пп.1-17 к указанному биологическому образцу, и определение количества антитела к SIRPa человека или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-17, который связывается с клетками, присутствующими в биологическом образце.

28. Применение антитела к SIRPa человека или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-17 в изготовлении соединения, пригодного для применения в диагностическом тесте, причем диагностируемое состояние выбрано из рака, инфекционного заболевания, хронического воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, неврологического заболевания, повреждения мозга, повреждения нервов, полицитемии, гемохроматоза, травмы, септического шока, хронического инфекционного заболевания, фиброза, атеросклероза, ожирения, сахарного диабета типа II и дисфункции трансплантата.

29. Применение по п.28, характеризующееся тем, что указанное соединение предназначено для применения в персонализированной медицине или во вспомогательном диагностическом тесте.

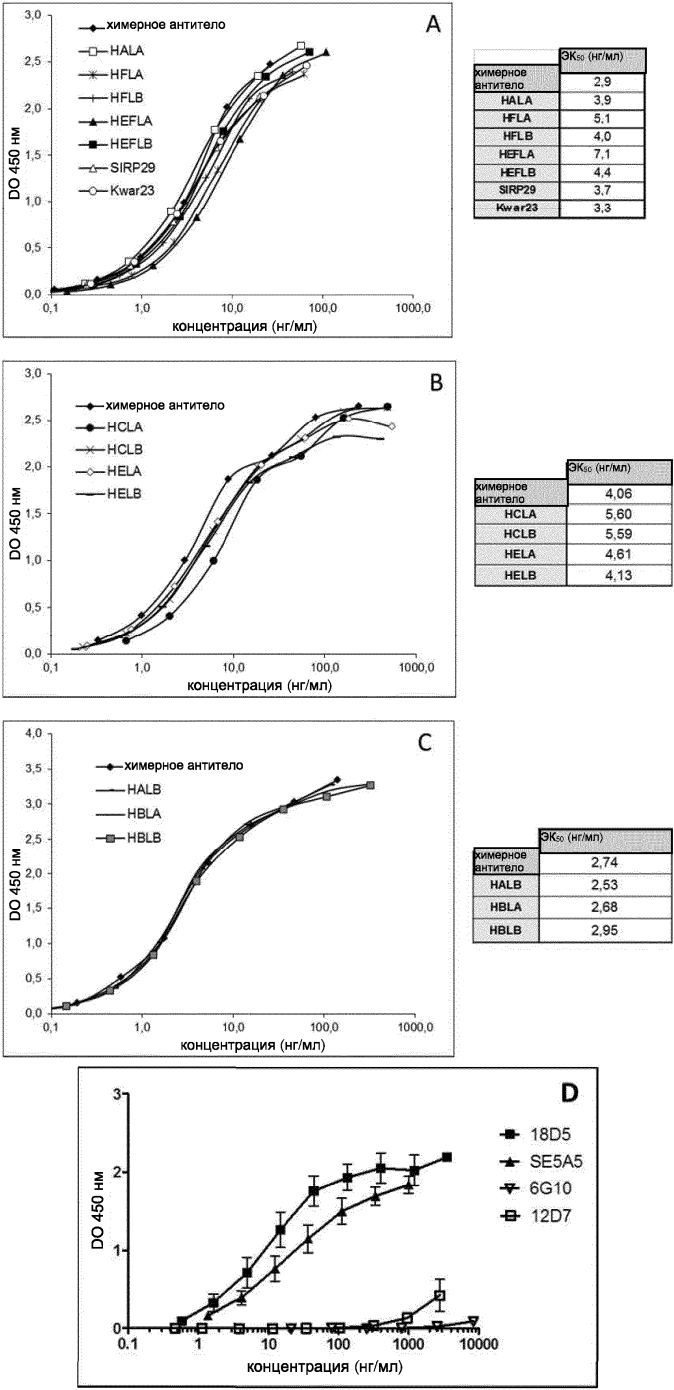
30. Применение по п.28 или 29, характеризующееся тем, что заболевание представляет собой воспалительный рак или рак с инфильтрованными миелоидными клетками, в частности MDSCs и/или TAM, или хроническое инфекционное заболевание, вызванное *Pseudomonas* или ЦМВ.

31. *In vitro* или *ex vivo* способ предсказания ответа на лечение у субъекта, страдающего раком, включающий

определение уровня экспрессии SIRPa в образце опухоли, взятом ранее у субъекта, с применением указанного антитела к SIRPa человека или его антигенсвязывающего фрагмента, определенного в любом из пп.1-17, и

сравнение указанного уровня экспрессии SIRPa со значением, представляющим уровень экспрессии SIRPa в популяции пациентов без ответа на лечение, причем более высокий уровень экспрессии SIRPa в образце опухоли указанного субъекта указывает на пациента, который ответит на лечение.

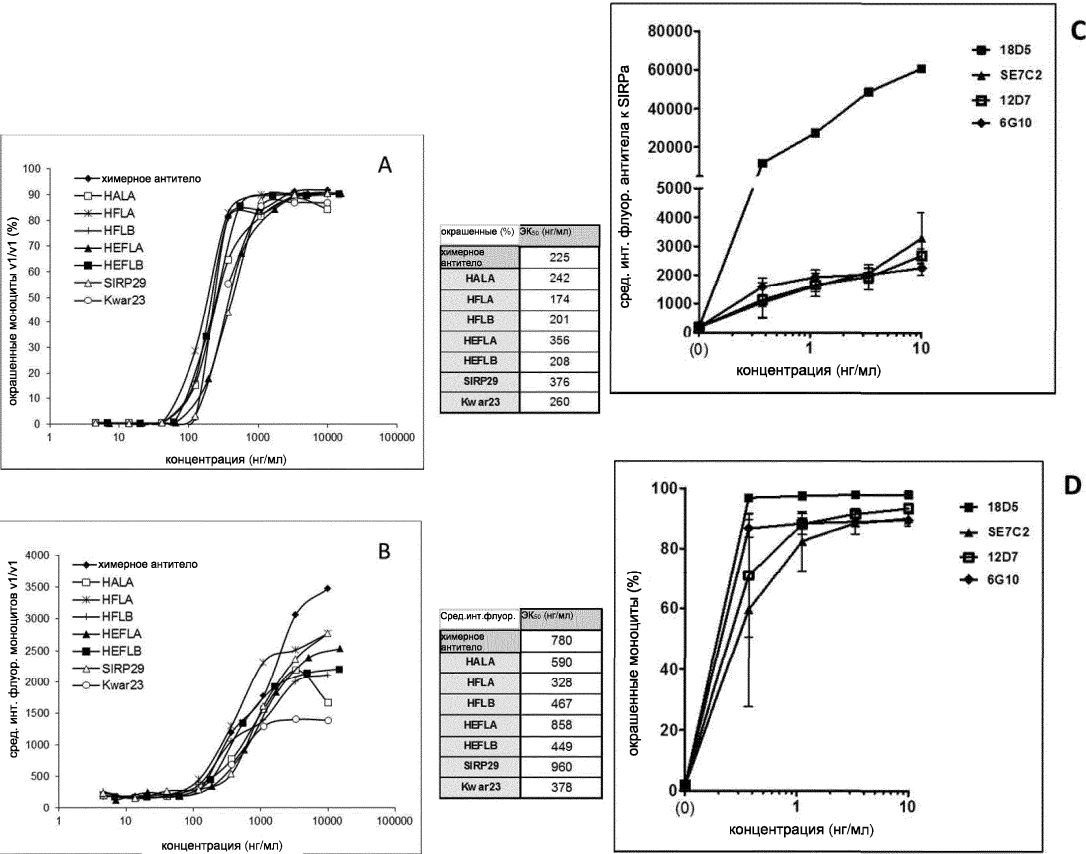
32. *In vitro* или *ex vivo* способ по п.31, где субъект, страдающий раком, вероятно будет получать лечение антителом к SIRPa человека или его антигенсвязывающему фрагменту по любому из пп.1-17.

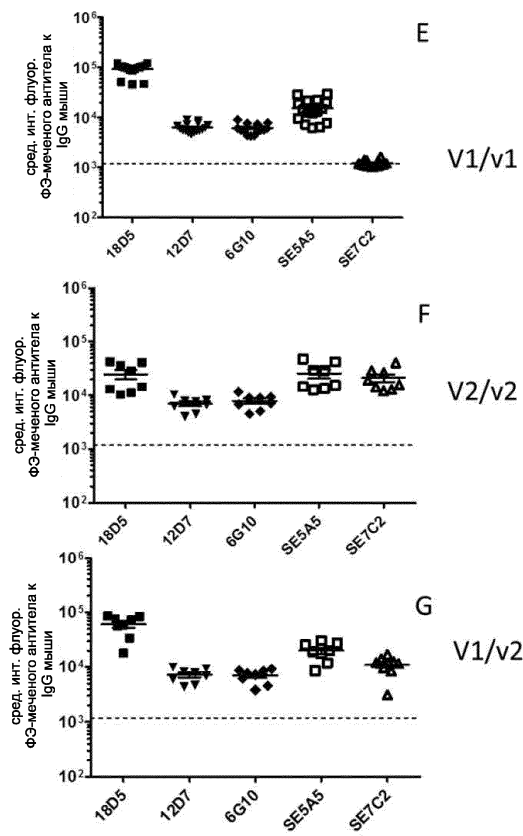


Фиг. 1

	Ассоциация (ka) (1/Мс)	Диссоциация (kd) (1/с)	Аффинность (KD) (М)
Мышиное антитело 18D5	6,23×10 ⁴	1,20×10 ⁻⁵	1,93×10 ⁻¹⁰
Химерное антитело	1,49×10 ⁵	5,14×10 ⁻⁵	3,44×10 ⁻¹⁰
HFLA	8,57×10 ⁵	1,86×10 ⁻⁴	2,17×10 ⁻¹⁰
HFLB	7,91×10 ⁵	2,49×10 ⁻⁴	3,15×10 ⁻¹⁰
HEFLA	5,59×10 ⁵	1,48×10 ⁻⁴	2,64×10 ⁻¹⁰
HEFLB	6,54×10 ⁵	1,89×10 ⁻⁴	2,89×10 ⁻¹⁰
SIRP29	4,15×10 ⁴	1,01×10 ⁻⁵	2,43×10 ⁻¹⁰
Kwar23	2,44×10 ⁵	8,95×10 ⁻⁵	3,67×10 ⁻¹⁰
SE7C2	5,98×10 ³	0,01	1,67×10 ⁻⁶
SE5A5	2,45×10 ⁴	9,49×10 ⁻⁴	3,87×10 ⁻⁸

Фиг. 2

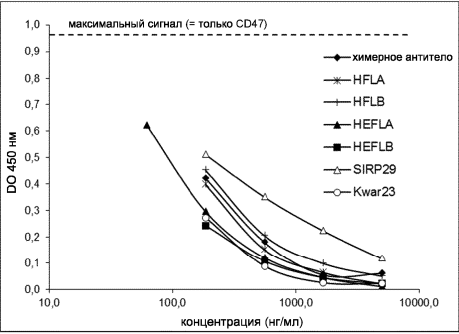




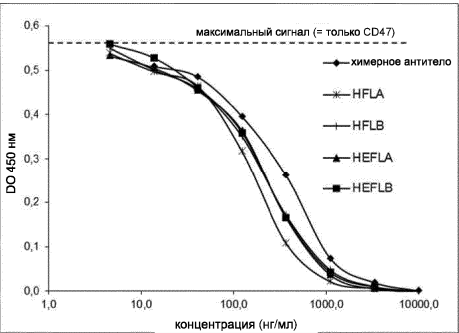
Фиг. 3

А

Первый эксперимент

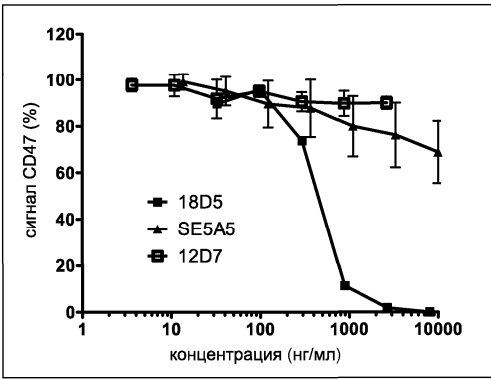


Второй эксперимент



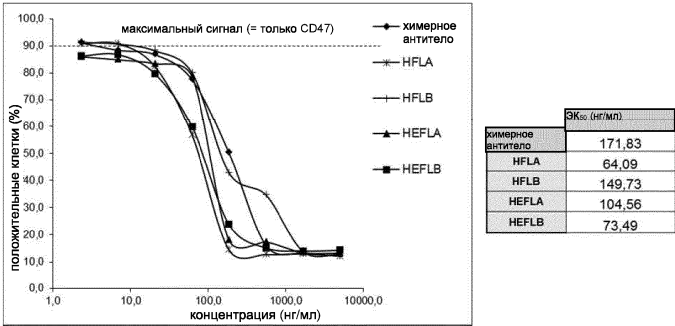
	ЭК ₅₀ (нг/мл)
химерное антитело	303,8
HFLA	146,2
HFLB	182,7
HEFLA	190,6
HEFLB	186,3

В

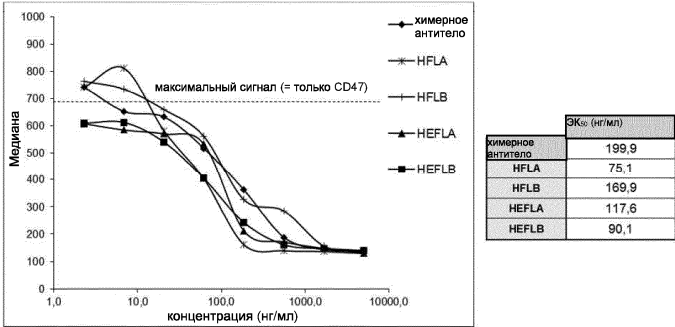


Фиг. 4

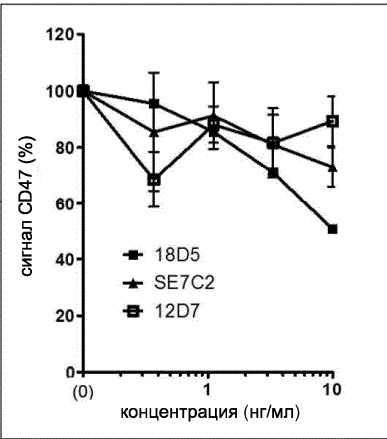
А



В



С



Фиг. 5

A	Ассоциация (ka) (1/Мс)	Диссоциация (kd) (1/с)	Аффинность (KD) (М)
Мышиное антитело 18D5	$1,58 \times 10^4$	$1,76 \times 10^{-3}$	$1,11 \times 10^{-7}$
Мышиное антитело 18D5 с SP-D	$3,797 \times 10^5$	$1,088 \times 10^{-2}$	$2,865 \times 10^{-8}$

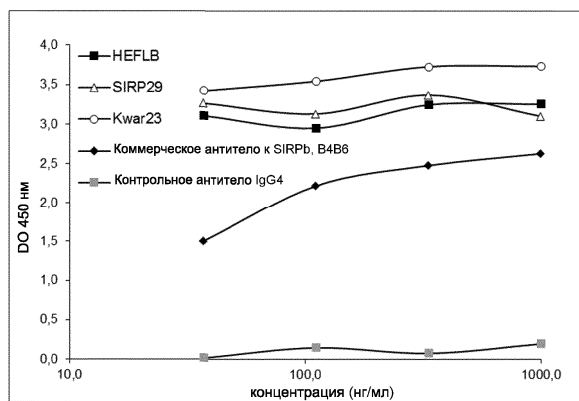
B	Ассоциация (ka) (1/Мс)	Диссоциация (kd) (1/с)	Аффинность (KD) (М)
SP-D	$2,465 \times 10^3$	$1,078 \times 10^{-2}$	$4,372 \times 10^{-6}$
SPD с мышиным антителом 18D5	$3,272 \times 10^3$	$2,405 \times 10^{-3}$	$7,35 \times 10^{-7}$

Фиг. 6

A

	Ассоциация (ka) (1/Мс)	Диссоциация (kd) (1/с)	Аффинность (KD) (М)
Химерное антитело	$8,837 \times 10^4$	$1,385 \times 10^{-3}$	$1,568 \times 10^{-8}$
HALA	$1,328 \times 10^5$	$8,504 \times 10^{-4}$	$6,403 \times 10^{-9}$
HFLA	$7,447 \times 10^4$	$1,919 \times 10^{-3}$	$2,576 \times 10^{-8}$
HFLB	$6,694 \times 10^4$	$1,738 \times 10^{-3}$	$2,596 \times 10^{-8}$
HEFLA	$9,827 \times 10^4$	$1,221 \times 10^{-3}$	$1,243 \times 10^{-8}$
HEFLB	$1,939 \times 10^4$	$1,711 \times 10^{-3}$	$8,69 \times 10^{-8}$
SIRP29	$1,078 \times 10^5$	$8,114 \times 10^{-4}$	$7,531 \times 10^{-9}$
kwar23	$2,863 \times 10^5$	$7,935 \times 10^{-4}$	$2,772 \times 10^{-9}$

B

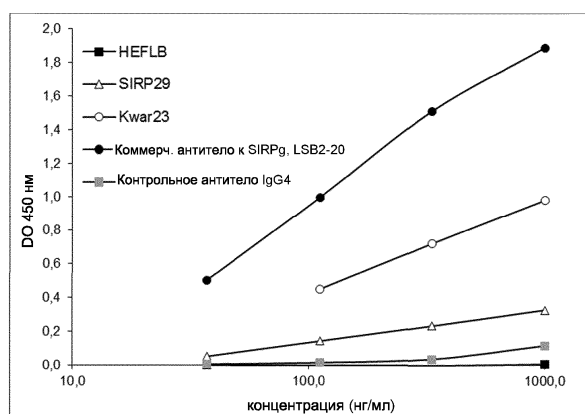


Фиг. 7

A

	Ассоциация (ka) (1/Мс)	Диссоциация (kd) (1/с)	Аффинность (KD) (М)
Химерное антитело	$4,93 \times 10^4$	$3,194 \times 10^{-3}$	$6,479 \times 10^{-8}$
HALA	$1,539 \times 10^5$	$7,093 \times 10^{-3}$	$4,609 \times 10^{-8}$
HFLA	$2,477 \times 10^5$	$1,18 \times 10^{-2}$	$4,764 \times 10^{-8}$
HFLB	$1,191 \times 10^5$	$1,234 \times 10^{-2}$	$1,036 \times 10^{-7}$
HEFLA	$2,173 \times 10^5$	$1,14 \times 10^{-2}$	$5,244 \times 10^{-8}$
HEFLB	$1,92 \times 10^5$	$1,193 \times 10^{-2}$	$6,215 \times 10^{-8}$
SIRP29	$1,36 \times 10^5$	$7,2 \times 10^{-4}$	$5,296 \times 10^{-9}$
kwar23	$3,57 \times 10^5$	$7,648 \times 10^{-4}$	$2,142 \times 10^{-9}$

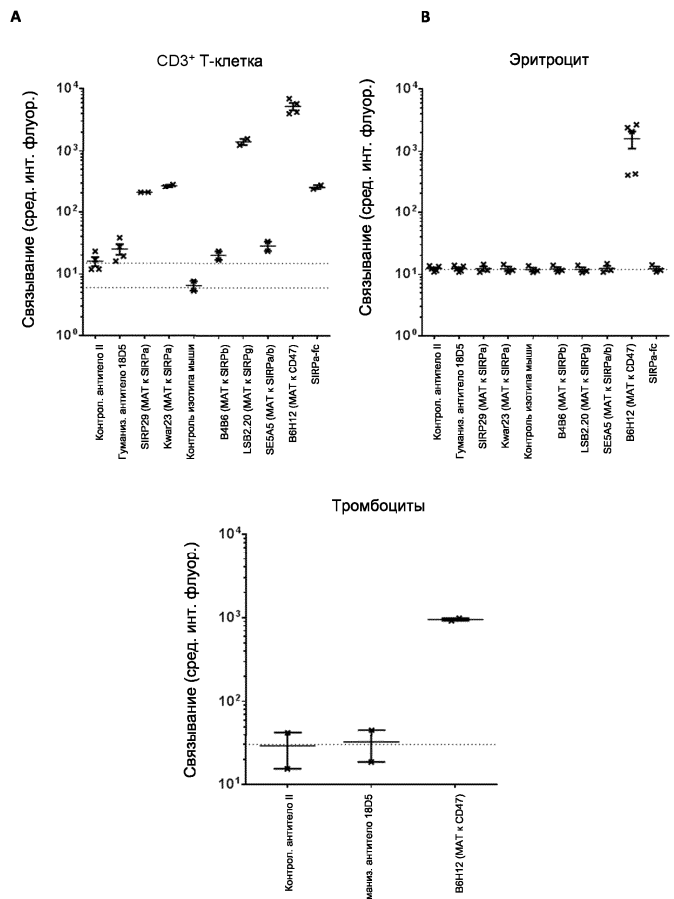
B



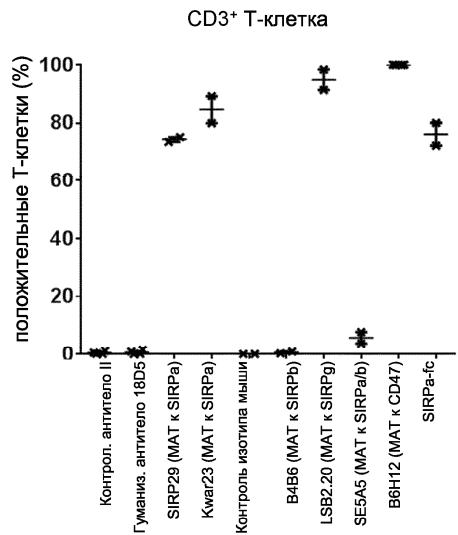
Фиг. 8

	Ассоциация (ka) (1/Мс)	Диссоциация (kd) (1/с)	Аффинность (KD) (М)
Только CD47	$2,193 \times 10^4$	$1,309 \times 10^{-2}$	$5,969 \times 10^{-7}$
HEFLB +CD47	$5,372 \times 10^4$	$5,334 \times 10^{-2}$	$9,928 \times 10^{-7}$
SIRP29 +CD47	$2,118 \times 10^4$	$5,525 \times 10^{-2}$	$2,572 \times 10^{-6}$
Kwar23 +CD47	$4,369 \times 10^2$	$1,259 \times 10^{-1}$	$2,88 \times 10^{-4}$

Фиг. 9

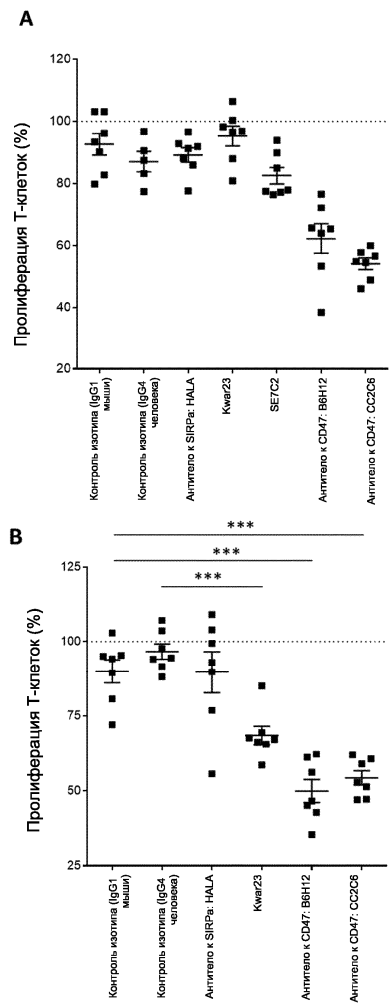


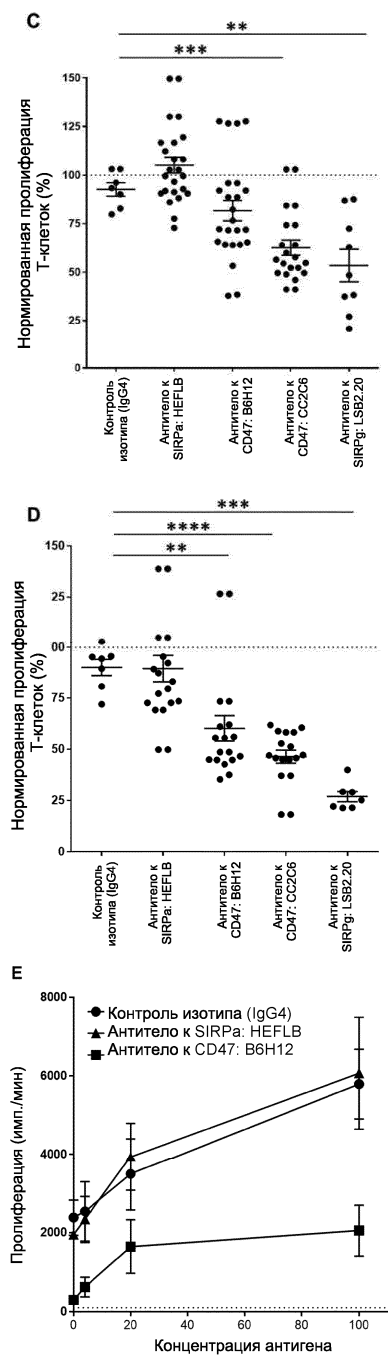
Фиг. 10



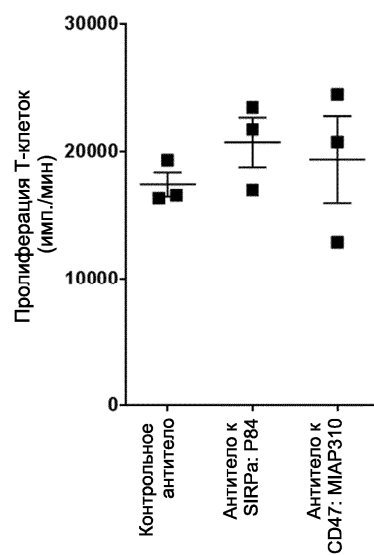
	Контрольное антитело II	Гуманизированное антитело 18D5	SIRP29 (MAT к SIRPa)	Kwar23 (MAT к SIRPa)	Контроль изотипа мыши	B4B6 (MAT к SIRPb)	LSB2.20 (MAT к SIRPg)	SE5A5 (MAT к SIRPab/b)	B6H12 (MAT к CD47)	SIRPa-Fc
Эксп. 1 HV1	0,45	1,54	73,5	80	0	0,87	91,4	3,72	100	72,2
Эксп. 1 HV2	1,12	0,84	75,2	89,3	0,016	0,25	98,4	7,69	100	81,4
Эксп. 2 HV1	0,057	0,016							99,9	
Эксп. 2 HV2	0,076	0,058							99,9	

Фиг. 11

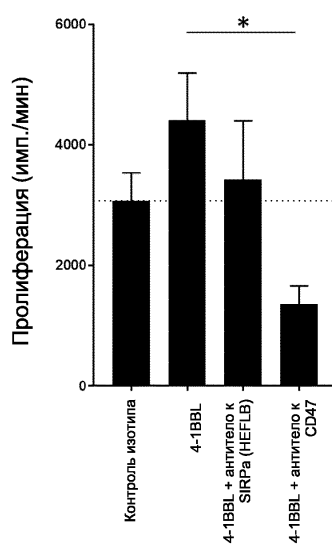
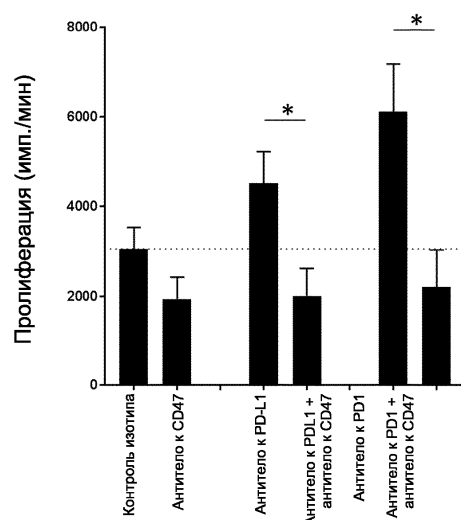




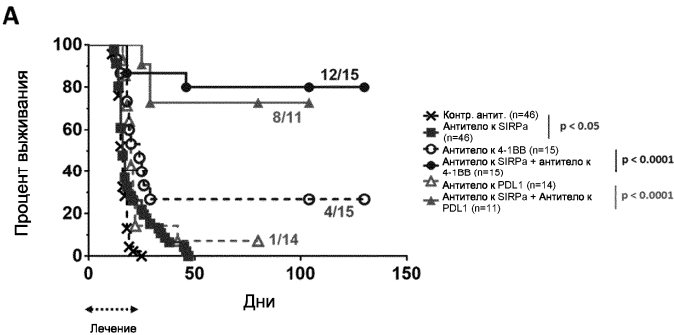
Фиг. 12



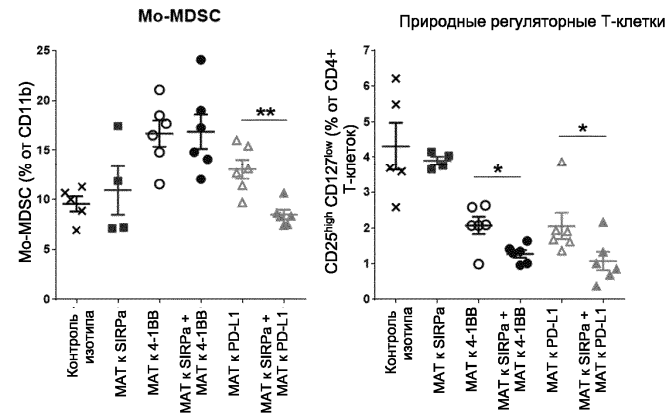
Фиг. 13



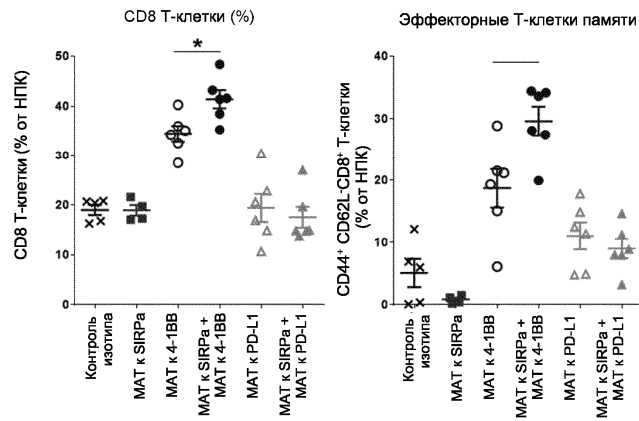
Фиг. 14



B Сниженное кол-во регуляторных клеток

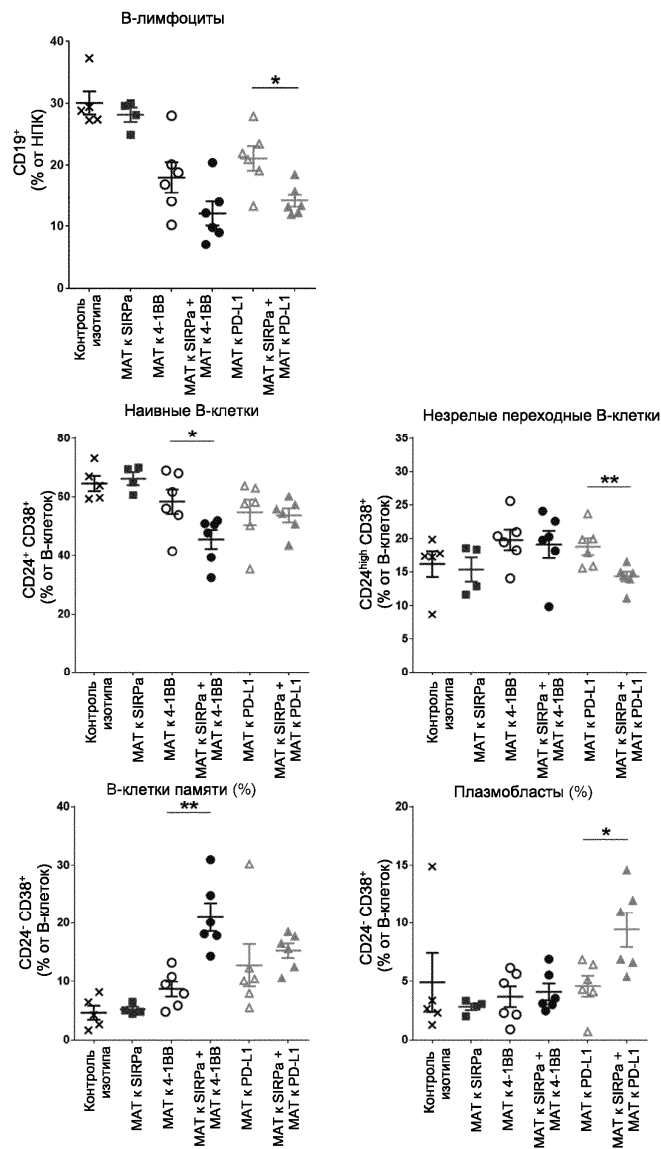


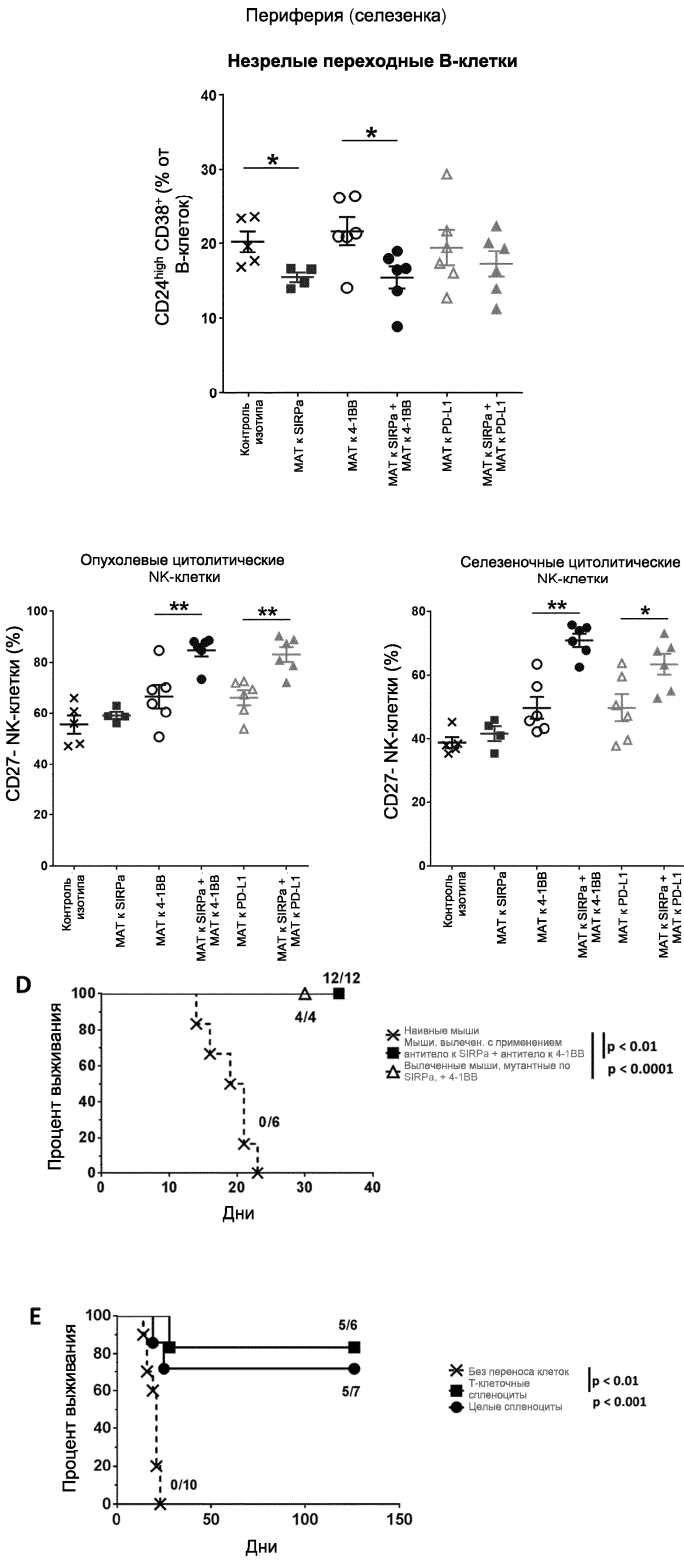
Повышенное кол-во эффекторных Т-клеток



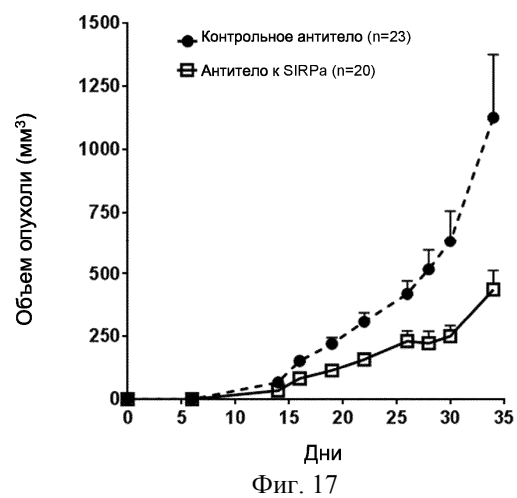
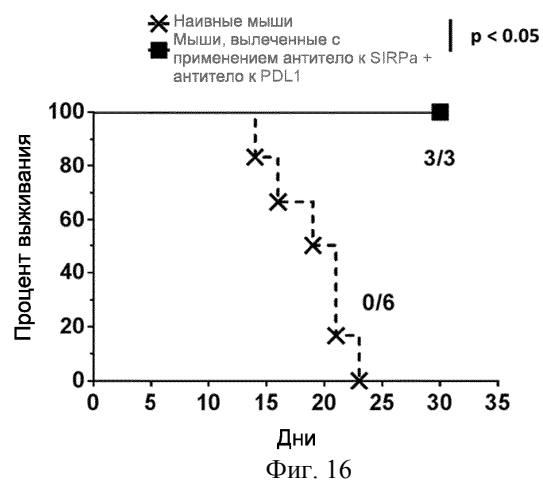
C

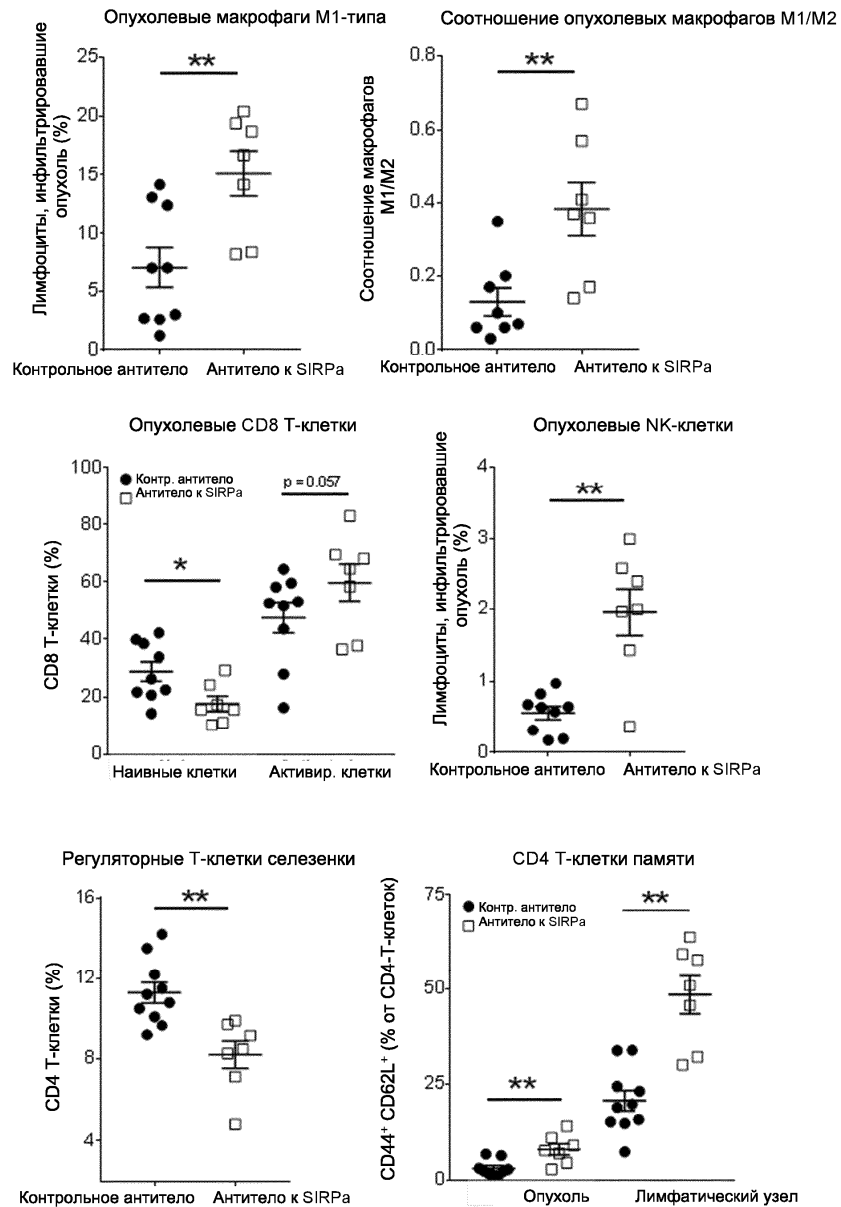
Tumor HCC



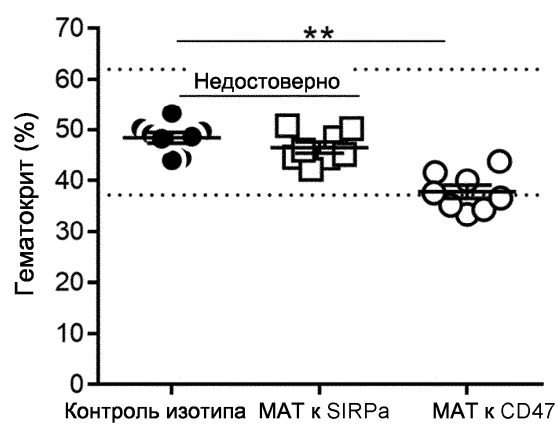
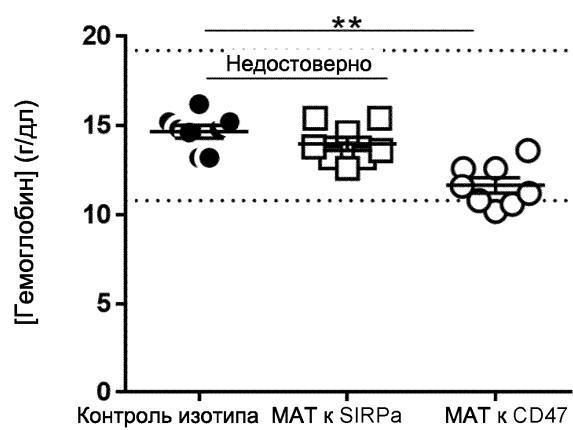


Фиг. 15

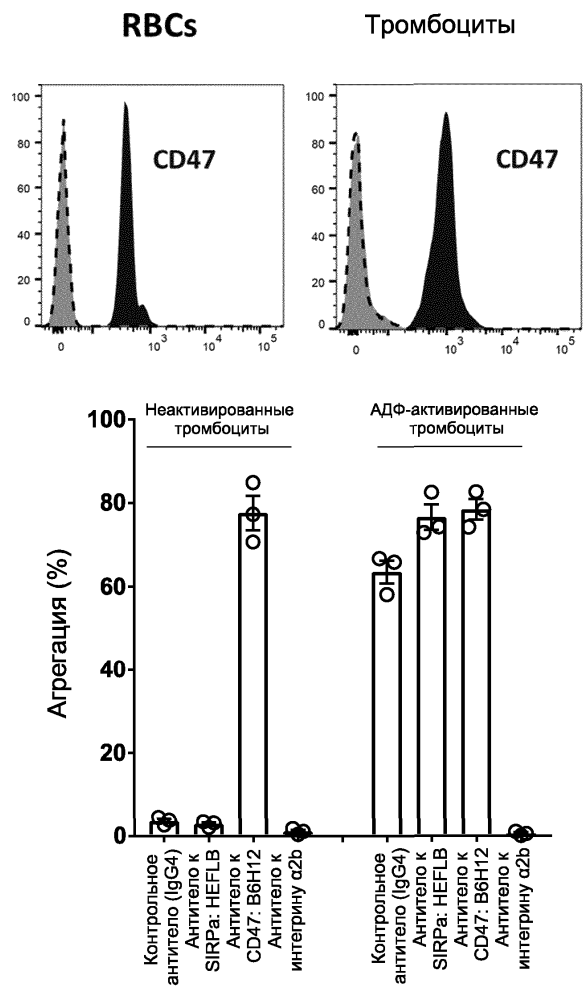




Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20

