



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.19

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

(21) Номер заявки
201991851

(22) Дата подачи заявки
2018.04.13

(54) АНТИТЕЛО ИЛИ ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С SIRP α ЧЕЛОВЕКА

(31) **2018708; 2019166**

WO-A2-2017178653

(32) **2017.04.13; 2017.07.03**

A. P. A. THEOCHARIDES ET AL.: "Disruption of SIRP signaling in macrophages eliminates human acute myeloid leukemia stem cells in xenografts", BLOOD, vol. 119, no. 18, 3 September 2012 (2012-09-03), pages 4333-1899, XP055126663, ISSN: 0006-4971, DOI:10.1182/blood-2011-11-391367, the whole document

(33) **NL**

(43) **2020.02.21**

(86) **PCT/NL2018/050234**

(87) **WO 2018/190719 2018.10.18**

HANKE L. MATLUNG ET AL.: "The CD47-SIRP[alpha] signaling axis as an innate immune checkpoint in cancer", IMMUNOLOGICAL REVIEWS., vol. 276, no. 1, 1 March 2017 (2017-03-01), pages 145-164, XP055429046, US ISSN: 0105-2896, DOI: 10.1111/imr.12527

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САЙРОПА Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
**Ван Эненнаам Ханс, Ван Элсас
Андреа, Вутс Эрик, Винк Пол,
Хюлсик Давид Лютье (NL)**

WO-A2-2018190719

WO-A2-2018210793

RUDIKOFF S ET AL.: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 79, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP007901436, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.79.6.1979

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2013056352
TADAHIKO YANAGITA ET AL.: "Anti-SIRP[alpha] antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy", JCI INSIGHT, vol. 2, no. 1, 12 January 2017 (2017-01-12), XP055421877, ISSN: 2379-3708, DOI:10.1172/jci.insight.89140, the whole document

WO-A1-0066159

K. WEISKOPF ET AL.: "Engineered SIRP Variants as Immunotherapeutic Adjuvants to Anticancer Antibodies", SCIENCE, vol. 341, no. 6141, 30 May 2013 (2013-05-30), pages 88-91, XP055223925, ISSN: 0036-8075, DOI:10.1126/science.1238856, abstract

WO-A2-2015138600

YEE WAH WONG ET AL.: "Structural Requirements for a Specificity Switch and for Maintenance of Affinity Using Mutational Analysis of a Phage-Displayed Anti-Arsonate Antibody of Fab Heavy Chain First Complementarity-Determining Region", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, INC, US, vol. 160, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 5990-5997, XP007916801, ISSN: 0022-1767

JEFFEREY R JACKSON: "In Vitro Antibody Maturation Improvement of a High Affinity, Neutralizing Antibody Against IL-1 beta", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 154, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 3310-3319, XP055033979

(57) В изобретении предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с SIRP α человека. Антитела согласно настоящему изобретению эффективно блокируют взаимодействие hSIRP α /hCD47 и способны усиливать фагоцитоз, тем самым обеспечивая лечение рака или инфекции. Также предложены выделенные нуклеиновые кислоты и векторы экспрессии, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, клетки-хозяева, содержащие указанные векторы, композиция для лечения состояния, характеризующегося передачей сигналов SIRP α /CD47, способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способ обнаружения присутствия пептида SIRP α или его фрагмента и применение указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для лечения состояния, характеризующегося передачей сигнала SIRP α /CD47.

Заявка на настоящий патент испрашивает приоритет на основании заявки на патент Нидерландов № 2018708, поданной 13 апреля 2017 г., и заявки на патент Нидерландов № 2019166, поданной 3 июля 2017 г., каждая из которых настоящим полностью включена в данную заявку посредством ссылки, включая все таблицы, фигуры и пункты формулы изобретения.

Область техники

В настоящем изобретении предложены антитела против SIRP α , а также применение данных антител для лечения заболеваний.

Уровень техники

Сигнальный регуляторный белок альфа (SIRP α) представляет собой мембранный гликопротеин из семейства SIRP. У представителей семейства SIRP есть некоторые общие структурные мотивы. Данные мотивы включают трансмембранный фрагмент и N-концевой внеклеточный домен, который содержит три Ig-подобные петли, соединенные тремя парами дисульфидных связей. С-концевой внутриклеточный домен, тем не менее, отличается у разных представителей семейства SIRP. SIRP α содержит удлиненный внутриклеточный домен, содержащий четыре остатка тирозина, которые образуют два тирозинсодержащих ингибиторных мотива иммунорецептора (ITIM), тогда как SIRP β 1 содержит остаток лизина в трансмембранном домене, за которым следует короткий внутриклеточный хвост, в котором нет мотивов ITIM, служащий в качестве рецептора для DAP12. Было обнаружено восемь однонуклеотидных полиморфизмов SIRP α , при этом наиболее распространенными вариантами являются SIRP α V1 и SIRP α V2 (Takenaka и др., *Nat. Immunol.* 2007, 8:1313-23).

Сигналы "съешь меня" (т.е. "измененное своё") представляют собой внеклеточные сигналы, специфично продуцируемые и представляемые на поверхности апоптических клеток, но не на здоровых клетках, и являются ключевыми для запуска фагоцитоза путем активации фагоцитарных рецепторов и последующих сигнальных каскадов. Для того чтобы сигналы "съешь меня" были представлены на апоптических клетках, требуется их транспорт наружу из клетки. Определенную категорию сигналов "съешь меня" предоставляют заякоренные в мембрану белки, такие как фосфатидилсерин (PtdSer) и кальретикулин (CRT). Выставленный наружу PtdSer связывается со своими рецепторами на фагоцитах, чтобы способствовать клиренсу апоптических клеток (процессу, известному как эффероцитоз). Аналогичным образом, экспрессия CRT повышена на поверхности апоптических клеток, и он связывается с родственным LDL-рецептору белком 1 (LRP1) на фагоците, тем самым опосредуя поглощение.

SIRP α обширно экспрессирован на фагоцитах (например, макрофагах, гранулоцитах и дендритных клетках) и действует как ингибиторный рецептор посредством взаимодействия с трансмембранным белком CD47. Данное взаимодействие опосредует ответ, который называют сигналом "не ешь меня". Данное взаимодействие отрицательно регулирует эффекторную функцию клеток врожденной иммунной системы, такую как фагоцитоз клетками хозяина. Так как CD47 часто присутствует на опухолевых клетках, считают, что данный сигнал "не ешь меня" способствует устойчивости опухолей к зависимому от фагоцитов клиренсу. Несмотря на сходства внеклеточных доменов SIRP α и SIRP β 1, существуют функциональные различия между представителями семейства SIRP. Например, SIRP β 1 не связывает CD47 на детектируемых уровнях и, следовательно, не опосредует сигнал "не ешь меня". Вместо этого, SIRP β 1 участвует в активации миелоидных клеток.

Нарушение передачи сигнала CD47-SIRP α (например, с помощью антагонистических моноклональных антител, которые связываются либо с CD47, либо с SIRP α) по имеющимся сведениям приводит к повышенному фагоцитозу клеток как солидных, так и гематопозитических опухолей, включая повышенный фагоцитоз клеток глиобластомы *in vitro* и значительную противоопухолевую активность *in vivo*.

Краткое описание изобретения

В первом аспекте настоящего изобретения предложены антитела против SIRP α и их антигенсвязывающие фрагменты, включающие структурные и функциональные особенности, перечисленные ниже.

В различных вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с SIRP α человека, содержащий один, два или все три из (i), (ii) и (iii): (i) гипервариабельного участка 1 (CDR1) вариабельной области тяжелой цепи, включающего последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1 или последовательность аминокислот, отличающуюся от SEQ ID NO: 1 на 1, 2, 3 или более консервативных замен; (ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, включающего последовательность аминокислот SEQ ID NO: 2 или последовательность аминокислот, отличающуюся от SEQ ID NO: 2 на 1, 2, 3 или более консервативных замен; и/или (iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, включающего последовательность аминокислот SEQ ID NO: 3 или последовательность аминокислот, отличающуюся от SEQ ID NO: 3 на 1, 2, 3 или более консервативных замен.

В различных других вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с SIRP α человека, содержащий один, два или все три из (i), (ii) и (iii): (i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, включающего последовательность аминокислот SEQ ID NO: 69 или последовательность аминокислот, отличающуюся от SEQ ID NO: 1 на 1, 2, 3 или более консервативных замен; (ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи,

SEQ ID NO: 102 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичной указанной последовательности, и

вариабельную область легкой цепи, включающую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 76 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 90 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 92 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 94 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 96 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 98 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 100 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности, и

SEQ ID NO: 104 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичной указанной последовательности.

В данном контексте "подобие последовательностей" основывается на степени идентичности в комбинации со степенью консервативных изменений. Процент "подобия последовательностей" представляет собой процент аминокислот или нуклеотидов, которые либо идентичны, либо консервативно заменены, то есть "подобие последовательностей" = процент идентичности последовательностей + процент консервативных изменений. Таким образом, для целей настоящего изобретения "консервативные изменения" и "идентичность" считают разновидностями более широкого термина "подобие". Таким образом, всякий раз, когда используют термин "подобие" последовательностей, в его объем входит "идентичность" последовательностей и "консервативные изменения". Согласно некоторым вариантам реализации консервативные изменения не учитывают, и процент подобия последовательностей относится к проценту идентичности последовательностей. В некоторых вариантах реализации изменения в последовательности, допускаемые указанным процентом идентичности последовательностей, все или почти все представляют собой консервативные изменения; то есть когда последовательность идентична на 90%, остальные 10% все или почти все представляют собой консервативные изменения. Термин "почти все" в данном контексте относится к случаю, когда по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% допускаемых изменений последовательности представляют собой консервативные изменения. В некоторых вариантах реализации тяжелых и/или легких цепей антител допускаемые изменения последовательности находятся внутри каркасных областей, но не в CDR.

Предпочтительно указанное антитело содержит тяжелую цепь согласно SEQ ID NO: 7. Ещё более предпочтительно указанное антитело содержит легкую цепь согласно SEQ ID NO: 8. Более предпочтительно тяжелую цепь выбирают из любой из последовательностей SEQ ID NO: 10, 12, 14, 16, 18 или 30. Более предпочтительно легкую цепь выбирают из любой из последовательностей SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 28 или 32.

В качестве альтернативы указанное антитело содержит тяжелую цепь согласно SEQ ID NO: 75.

Ещё более предпочтительно указанное антитело содержит легкую цепь согласно SEQ ID NO: 76. Более предпочтительно тяжелую цепь выбирают из любой из последовательностей SEQ ID NO: 78, 80, 82, 84, 86, 88 или 102. Более предпочтительно легкую цепь выбирают из любой из последовательностей SEQ ID NO: 90, 92, 94, 96, 98, 100 или 104.

В любом из описанных выше вариантов реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть выделенным, согласно определению данного термина в настоящей заявке.

В любом из описанных выше вариантов реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой рекомбинантное антитело, согласно определению данного термина в настоящей заявке.

В любом из описанных выше вариантов реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полноразмерное антитело, согласно определению данного термина в настоящей заявке.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению можно получить из различных видов. Например, антитела согласно настоящему изобретению могут включать последовательности иммуноглобулинов, которые представляют собой последовательности кролика, мыши, крысы, морской свинки, цыпленка, козы, овцы, осла, человека, ламы или верблюдовых, или комбинации таких последовательностей (так называемые химерные антитела). В наиболее предпочтительном случае указанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой человеческие или гуманизированные антитела.

рованные антитела или антигенсвязывающие фрагменты.

Термин антитело включает антигенсвязывающие части, т.е. "сайты связывания антигенов" (например, фрагменты, подпоследовательности, определяющие комплементарность области (CDR)), которые сохраняют способность связывать антиген, включая: (i) фрагмент Fab - моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_H1 ; (ii) фрагмент $F(ab')_2$ - бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов V_H и C_H1 ; (iv) фрагмент F_V , состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward и др., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из домена V_H ; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR). Одноцепочечные антитела также включены посредством ссылки в объем термина "антитело". Предпочтительные терапевтические антитела представляют собой интактные антитела IgG. Подразумевают, что термин "интактный IgG" в данном изобретении означает полипептид, относящийся к классу антител, которые по существу кодируются известным геном иммуноглобулина гамма. У человека данный класс включает IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. У мышей данный класс включает IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3. Известные домены Ig в классе IgG антител представляют собой V_H , $C\gamma1$, $C\gamma2$, $C\gamma3$, V_L и C_L .

В любом из описанных выше вариантов реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой человеческое или гуманизированное антитело, содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи. В одном варианте реализации антитело представляет собой IgG. В предпочтительных вариантах реализации антитело представляет собой IgG1, IgG2 или IgG4, и предпочтительно представляет собой IgG1, IgG2 или IgG4 человека.

В любом из приведенных выше вариантов реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению могут содержать любые из переменных областей легкой цепи, описанных выше, константный домен легкой цепи каппа или лямбда человека и константный домен тяжелой цепи IgG1, IgG2 или IgG4. Примеры последовательностей константных областей легкой (каппа) и тяжелой (IgG2 и IgG4) цепей, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, перечислены в последовательностях SEQ ID NO: 63, 65, 67 (каждая представляет собой последовательность нуклеотидов), 64, 66 и 68 (каждая представляет собой полипептидную последовательность).

Исключительно в качестве примера, в различных вариантах реализации такое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают одну из следующих комбинаций последовательности тяжелой цепи/последовательности переменной области легкой цепи:

SEQ ID NO: 10 / SEQ ID NO: 20 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H1L1),
 SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 22 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H1L2),
 SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 24 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H1L3),
 SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 26 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H1L4),
 SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 28 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H1L5),
 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 20 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H2L1),
 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 22 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H2L2),
 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 24 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H2L3),
 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 26 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H2L4),
 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 28 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H2L5),
 SEQ ID NO: 14/SEQ ID NO: 20 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H3L1),
 SEQ ID NO: 14/SEQ ID NO: 22 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H3L2),
 SEQ ID NO: 14/SEQ ID NO: 24 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H3L3),
 SEQ ID NO: 14/SEQ ID NO: 26 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H3L4),
 SEQ ID NO: 14/SEQ ID NO: 28 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H3L5),
 SEQ ID NO: 16/SEQ ID NO: 20 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H4L1),
 SEQ ID NO: 16/SEQ ID NO: 22 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H4L2),
 SEQ ID NO: 16/SEQ ID NO: 24 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H4L3),
 SEQ ID NO: 16/SEQ ID NO: 26 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H4L4),
 SEQ ID NO: 16/SEQ ID NO: 28 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H4L5),
 SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 20 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H5L1),
 SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 22 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H5L2),
 SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 24 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H5L3),
 SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 26 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H5L4),
 SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 28 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H5L5),
 SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 90 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H1L1),
 SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 92 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H1L2),
 SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 94 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H1L3),
 SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 96 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H1L4),
 SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 98 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H1L5),

каждая легкая цепь содержит константный домен легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека; и каждая тяжелая цепь содержит константную область IgG1, IgG2 или IgG4 человека.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизованное антитело, которое содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи, при этом каждая тяжелая цепь включает SEQ ID NO: 80 и каждая легкая цепь включает SEQ ID NO: 92, или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобную или идентичную последовательности с соответствующим SEQ ID NO, и наиболее предпочтительно каждая легкая цепь содержит константный домен легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека; и каждая тяжелая цепь содержит константную область IgG1, IgG2 или IgG4 человека.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизованное антитело, которое содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи, при этом каждая тяжелая цепь включает SEQ ID NO: 80 и каждая легкая цепь включает SEQ ID NO: 96, или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобную или идентичную последовательности с соответствующим SEQ ID NO, и наиболее предпочтительно каждая легкая цепь содержит константный домен легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека; и каждая тяжелая цепь содержит константную область IgG1, IgG2 или IgG4 человека.

В одном варианте реализации антитело против SIRP α согласно настоящему изобретению включает структуру полноразмерного антитела, содержащую две легкие цепи и две тяжелые цепи, перечисленные выше, при этом каждая легкая цепь содержит константный домен легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека; и каждая тяжелая цепь содержит константную область IgG1 человека.

В одном варианте реализации антитело против SIRP α согласно настоящему изобретению включает структуру полноразмерного антитела, содержащую две легкие цепи и две тяжелые цепи, перечисленные выше, при этом каждая легкая цепь содержит константный домен легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека; и каждая тяжелая цепь содержит константную область IgG2 человека.

В одном варианте реализации антитело против SIRP α согласно настоящему изобретению включает структуру полноразмерного антитела, содержащую две легкие цепи и две тяжелые цепи, перечисленные выше, при этом каждая легкая цепь содержит константный домен легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека; и каждая тяжелая цепь содержит константную область IgG4 человека.

В некоторых вариантах реализации антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению обладают одним, двумя, тремя, четырьмя или более и предпочтительно каждым из следующих функциональных свойств:

связывают белок SIRP α V1 человека, имеющий последовательность SEQ ID NO: 34, с $EC_{50} < 1$ нМ; и проявляют по меньшей мере в 100 раз более высокую EC_{50} по отношению к SIRP α V1(P74A), имеющему последовательность SEQ ID NO: 62; и необязательно также по меньшей мере в 100 раз более высокую EC_{50} по отношению к белку SIRP β 1 человека, имеющему последовательность SEQ ID NO: 38 (при этом в каждом случае пониженная EC_{50} относится к EC_{50} по отношению к белку SIRP α V1 человека, имеющему последовательность SEQ ID NO: 34, и в каждом случае предпочтительно измерение проводят с помощью клеточного анализа ELISA (CELISA), описанного далее в данном изобретении; связываются с клеткой, экспрессирующей белок SIRP α V1 человека, с $EC_{50} < 10$ нМ, предпочтительно < 5 нМ, более предпочтительно $< 1,5$ нМ, еще более предпочтительно $< 1,0$ нМ, еще более предпочтительно $< 0,5$ нМ, и наиболее предпочтительно равной приблизительно 0,3 нМ или менее; связываются с клеткой, экспрессирующей белок SIRP α V2 человека, с $EC_{50} < 10$ нМ, предпочтительно < 5 нМ, более предпочтительно $< 1,5$ нМ, еще более предпочтительно $< 1,0$ нМ, еще более предпочтительно $< 0,5$ нМ, и наиболее предпочтительно равной приблизительно 0,3 нМ или менее; не проявляют заметного связывания с белком SIRP β 1 при концентрации антитела 50 нМ, предпочтительно 67 нМ и более предпочтительно 100 нМ; или, в качестве альтернативы, при концентрации, которая в 10 раз больше, предпочтительно в 50 раз больше, более предпочтительно в 100 раз больше и еще более предпочтительно в 200 раз больше, чем EC_{50} антитела по отношению к SIRP α V1 или SIRP α V2;

ингибируют связывание между SIRP α человека и CD47 с $IC_{50} < 10,0$ нМ, более предпочтительно $< 5,0$ нМ, еще более предпочтительно $< 2,5$ нМ и наиболее предпочтительно равной приблизительно 1,0 нМ или менее; и проявляют балл "человечности" T20, равный по меньшей мере 79, и более предпочтительно 85.

Предпочтительно антитела против SIRP α или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению значительно не связываются с одним или обоими из белков SIRP α V1(P74A) и SIRP β 1 при концентрации антитела 100 нМ или, в качестве альтернативы, при концентрации антитела, которая в 200 раз больше, чем EC_{50} указанного антитела по отношению к SIRP α V1 или SIRP α V2, но при этом связываются с клеткой, экспрессирующей белок SIRP α V1 человека, с $EC_{50} < 10$ нМ. В наиболее предпочтительном случае каждая легкая цепь содержит константный домен легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека; и каждая тяжелая цепь содержит константную область IgG1, IgG2 или IgG4 человека.

В некоторых вариантах реализации антитело против SIRP α или его антигенсвязывающий фрагмент

согласно настоящему изобретению можно конъюгировать с по меньшей мере одним терапевтическим агентом. В одном варианте реализации указанный терапевтический агент представляет собой второе антитело или его фрагмент, иммуномодулятор, гормон, цитотоксический агент, фермент, радионуклид или второе антитело, конъюгированное с по меньшей мере одним иммуномодулятором, ферментом, радиоактивной меткой, гормоном, антисмысловым олигонуклеотидом или цитотоксическим агентом, или комбинацию перечисленных агентов.

В соответствии с настоящим изобретением также предложены выделенные полипептиды, включающие любую из перечисленных последовательностей аминокислот SEQ ID NO: 75, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 76, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 7, 10, 12, 14, 16, 18, 30, 8, 20, 22, 24, 26, 28 и 32 или фрагмент любой из указанных последовательностей, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанным последовательностям.

В соответствии с настоящим изобретением также предложены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие любое из антител против SIRP α или антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению.

В одном варианте реализации в соответствии с настоящим изобретением предложена выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 75 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 78 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 80 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 82 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 84 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 86 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 88 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 102 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 10 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 12 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 14 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 16 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 18 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности, и

SEQ ID NO: 30 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобной или идентичной указанной последовательности.

В некоторых вариантах реализации последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10 или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобная или идентичная указанной последовательности, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9 или последовательностью нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичной указанной последовательности.

В некоторых вариантах реализации последовательность аминокислот SEQ ID NO: 12 или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобная или идентичная указанной последовательности, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 11 или последовательностью нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичной указанной последовательности.

В некоторых вариантах реализации последовательность аминокислот SEQ ID NO: 14 или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобная или идентичная указанной последовательности, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 13 или последовательностью нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичной указанной последовательности.

В некоторых вариантах реализации последовательность аминокислот SEQ ID NO: 16 или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% подобная или идентичная указан-

последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 15 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности,
 последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 17 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности,
 последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 29 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности,
 последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 19 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности,
 последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 21 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности,
 последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 23 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности,
 последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 25 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности,
 последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности, и/или
 последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 31 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности.

В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота может кодировать человеческое или гуманизованное антитело, и включает последовательности нуклеиновых кислот для обеих тяжелой и легкой цепей. В одном варианте реализации антитело представляет собой IgG. В предпочтительных вариантах реализации антитело представляет собой IgG1, IgG2 или IgG4, и предпочтительно представляет собой IgG1, IgG2 или IgG4 человека. В некоторых вариантах реализации последовательность легкой цепи включает последовательность константного домена легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека; и каждая последовательность тяжелой цепи включает последовательность константной области IgG1, IgG2 или IgG4 человека.

Предпочтительно такие нуклеиновые кислоты включают следующую комбинацию последовательностей нуклеиновых кислот переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи:

SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 19 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H1L1),
 SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 21 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H1L2),
 SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 23 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H1L3),
 SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 25 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H1L4),
 SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 27 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H1L5),
 SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 19 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H2L1),
 SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 21 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H2L2),
 SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 23 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H2L3),
 SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 25 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H2L4),
 SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 27 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H2L5),
 SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 19 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H3L1),
 SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 21 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H3L2),
 SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 23 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H3L3),
 SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 25 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H3L4),
 SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 27 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H3L5),
 SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 19 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H4L1),
 SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 21 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H4L2),
 SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 23 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H4L3),
 SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 25 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H4L4),
 SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 27 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H4L5),
 SEQ ID NO: 17/SEQ ID NO: 19 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H5L1),
 SEQ ID NO: 17/SEQ ID NO: 21 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H5L2),
 SEQ ID NO: 17/SEQ ID NO: 23 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H5L3),
 SEQ ID NO: 17/SEQ ID NO: 25 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H5L4),
 SEQ ID NO: 17/SEQ ID NO: 27 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H5L5),
 SEQ ID NO: 77/SEQ ID NO: 89 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H1L1),
 SEQ ID NO: 77/SEQ ID NO: 91 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H1L2),
 SEQ ID NO: 77/SEQ ID NO: 93 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H1L3),
 SEQ ID NO: 77/SEQ ID NO: 95 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H1L4),
 SEQ ID NO: 77/SEQ ID NO: 97 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H1L5),
 SEQ ID NO: 77/SEQ ID NO: 99 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H1L6),
 SEQ ID NO: 79/SEQ ID NO: 89 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H2L1),

SEQ ID NO: 79/SEQ ID NO: 91 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H2L2),
SEQ ID NO: 79/SEQ ID NO: 93 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H2L3),
SEQ ID NO: 79/SEQ ID NO: 95 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H2L4),
SEQ ID NO: 79/SEQ ID NO: 97 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H2L5),
SEQ ID NO: 79/SEQ ID NO: 99 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H2L6),
SEQ ID NO: 81/SEQ ID NO: 89 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H3L1),
SEQ ID NO: 81/SEQ ID NO: 91 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H3L2),
SEQ ID NO: 81/SEQ ID NO: 93 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H3L3),
SEQ ID NO: 81/SEQ ID NO: 95 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H3L4),
SEQ ID NO: 81/SEQ ID NO: 97 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H3L5),
SEQ ID NO: 81/SEQ ID NO: 99 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H3L6),
SEQ ID NO: 83/SEQ ID NO: 89 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H4L1),
SEQ ID NO: 83/SEQ ID NO: 91 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H4L2),
SEQ ID NO: 83/SEQ ID NO: 93 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H4L3),
SEQ ID NO: 83/SEQ ID NO: 95 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H4L4),
SEQ ID NO: 83/SEQ ID NO: 97 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H4L5),
SEQ ID NO: 83/SEQ ID NO: 99 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H4L6),
SEQ ID NO: 85/SEQ ID NO: 89 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H5L1),
SEQ ID NO: 85/SEQ ID NO: 91 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H5L2),
SEQ ID NO: 85/SEQ ID NO: 93 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H5L3),
SEQ ID NO: 85/SEQ ID NO: 95 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H5L4),
SEQ ID NO: 85/SEQ ID NO: 97 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H5L5),
SEQ ID NO: 85/SEQ ID NO: 99 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H5L6),
SEQ ID NO: 87/SEQ ID NO: 89 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H6L1),
SEQ ID NO: 87/SEQ ID NO: 91 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H6L2),
SEQ ID NO: 87/SEQ ID NO: 93 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H6L3),
SEQ ID NO: 87/SEQ ID NO: 95 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H6L4),
SEQ ID NO: 87/SEQ ID NO: 97 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H6L5),
SEQ ID NO: 87/SEQ ID NO: 99 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H6L6),
или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную соответствующему SEQ ID NO.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации нуклеиновая кислота включает SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 19 или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную соответствующему SEQ ID NO.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации нуклеиновая кислота включает SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 27 или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную соответствующему SEQ ID NO.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации нуклеиновая кислота включает SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 19 или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную соответствующему SEQ ID NO.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации нуклеиновая кислота включает SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 89 или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную соответствующему SEQ ID NO.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации нуклеиновая кислота включает SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 91 или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную соответствующему SEQ ID NO.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации нуклеиновая кислота включает SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 95 или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную соответствующему SEQ ID NO.

В соответствии с настоящим изобретением также предложены векторы экспрессии, содержащие одну или более нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Вектор экспрессии представляет собой молекулу ДНК, содержащую регуляторные элементы, необходимые для транскрипции целевой нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Обычно целевую нуклеиновую кислоту помещают под контроль некоторых регуляторных элементов, включая конститутивные или индуцируемые промоторы, тканеспецифические регуляторные элементы и энхансерные элементы. Говорят, что такая целевая нуклеиновая кислота "функционально связана с" регуляторными элементами, если указанный регулирующий элемент контролирует экспрессию указанного гена.

Данные выделенные нуклеиновые кислоты и векторы экспрессии, содержащие их, можно применять для экспрессии антител согласно настоящему изобретению или их антигенсвязывающих фрагментов в рекомбинантных клетках-хозяевах. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением так-

или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную соответствующему SEQ ID NO.

В любом из описанных выше вариантов реализации вектор экспрессии может кодировать экспрессию человеческого или гуманизированного антитела, и включает последовательности нуклеиновых кислот для обеих тяжелой и легкой цепей. В одном варианте реализации антитело представляет собой IgG. В предпочтительных вариантах реализации антитело представляет собой IgG1, IgG2 или IgG4, и предпочтительно представляет собой IgG1, IgG2 или IgG4 человека. В некоторых вариантах реализации последовательность легкой цепи включает последовательность константного домена легкой цепи каппа человека или легкой цепи ламбда человека; и каждая последовательность тяжелой цепи включает последовательность константной области IgG4 человека.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации вектор экспрессии кодирует экспрессию человеческого или гуманизированного антитела, в котором последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 9 и последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи включает SEQ ID NO: 19, или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную соответствующему SEQ ID NO, и наиболее предпочтительно представляет собой изотип IgG1, IgG2 или IgG4.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации вектор экспрессии кодирует экспрессию человеческого или гуманизированного антитела, в котором последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 15 и последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи включает SEQ ID NO: 27, или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную соответствующему SEQ ID NO, и наиболее предпочтительно представляет собой изотип IgG1, IgG2 или IgG4.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации вектор экспрессии кодирует экспрессию человеческого или гуманизированного антитела, в котором последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 17 и последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи включает SEQ ID NO: 19, или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную соответствующему SEQ ID NO или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную соответствующему SEQ ID NO, и наиболее предпочтительно представляет собой изотип IgG1, IgG2 или IgG4.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации вектор экспрессии кодирует экспрессию человеческого или гуманизированного антитела, в котором последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 79 и последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи включает SEQ ID NO: 89, или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную соответствующему SEQ ID NO, и наиболее предпочтительно представляет собой изотип IgG1, IgG2 или IgG4.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации вектор экспрессии кодирует экспрессию человеческого или гуманизированного антитела, в котором последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 79 и последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи включает SEQ ID NO: 91, или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную соответствующему SEQ ID NO, и наиболее предпочтительно представляет собой изотип IgG1, IgG2 или IgG4.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации вектор экспрессии кодирует экспрессию человеческого или гуманизированного антитела, в котором последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 79 и последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи включает SEQ ID NO: 95, или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную соответствующему SEQ ID NO, и наиболее предпочтительно представляет собой изотип IgG1, IgG2 или IgG4.

В одном варианте реализации клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO). В одном варианте реализации клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего (например, клетку человека, такую как клетка HEK293, клетку хомяка, такую как клетка CHO, и т.д.), бактериальную клетку (например, клетку *E. coli*), клетку дрожжей (например, клетку *Pichia pastoris*, и т.д.), клетку растения (например, клетку *Nicotiana benthamiana*) и т.д. Клетки млекопитающих предпочтительны благодаря наиболее благоприятным паттернам гликозилирования.

В соответствии с настоящим изобретением также предложены фармацевтические композиции, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В одном варианте реализации композиция содержит один или более дополнительных терапевтических агентов. В одном варианте реализации дополнительный терапевтический агент выбран из группы, состоящей из: антитела против CD27 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против LAG3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против APRIL или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против VISTA или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против BTLA или его антигенсвязывающего фрагмента; ан-

титела против TIM3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против HVEM или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD137 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD28 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против PD1 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против PDL1 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против PDL2 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против GITR или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ICOS или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT2 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT4 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT5 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против NKG2A или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против NKG2C или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против NKG2E или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против TSLP или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против IL-10 или его антигенсвязывающего фрагмента; IL-10 или пегелированного IL-10; агониста (например, агонистического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или растворимого гибридного белка) рецепторного белка TNF; иммуноглобулин-подобного белка; рецептора цитокина; интегрин; активирующих лимфоциты сигнальных молекул (белков SLAM); активирующего NK-клетку рецептора; Toll-подобного рецептора; OX40; CD2; CD7; CD27; CD28; CD30; CD40; ICAM-1; LFA-1 (CD11a/CD18); 4-1BB (CD137); B7-H3; ICOS (CD278); GITR; BAFFR; LIGHT; HVEM (LIGHTR); KIRDS2; SLAMF7; NKp80 (KLRF1); NKp44; NKp30; NKp46; CD19; CD4; CD8-альфа; CD8-бета; IL2R-бета; IL2R-гамма; IL7R-альфа; ITGA4; VLA1; CD49a; ITGA4; IA4; CD49D; ITGA6; VLA-6; CD49f; ITGAD; CD11d; ITGAE; CD103; ITGAL; ITGAM; CD11b; ITGAX; CD11c; ITGB1; CD29; ITGB2; CD18; ITGB7; NKG2D; NKG2C; TNFR2; TRANCE/RANKL; DNAM1 (CD226); SLAMF4 (CD244; 2B4); CD84; CD96 (TACTILE); CEACAM1; CRTAM; Ly9 (CD229); CD160 (BY55); PSGL1; CD100 (SEMA4D); CD69; SLAMF6 (NTB-A; Ly108); SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3); SLAM7; BLAME (SLAMF8); SELPLG (CD162); LTBR; LAT; GADS; PAG/Cbp; CD19a; лиганда, который специфично связывается с CD83; ингибитора CD47, PD-1, PD-L1; PD-L2; CTLA4; TIM3; LAG3; CEACAM (например; CEACAM-1, -3 и/или -5); VISTA; BTLA; TIGIT; LAIR1; IDO; TDO; CD160; TGFR-бета; и циклического динуклеотида или другого агониста сигнального пути STING.

Настоящее изобретение также включает комбинацию, включающую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению и второе антитело, которое индуцирует антителозависимую опосредованную клетками цитотоксичность (АЗКЦ), при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению повышает опосредованное вторым антителом разрушение клеток. Антителозависимая опосредованная клетками цитотоксичность (АЗКЦ) представляет собой механизм опосредованной клетками иммунной защиты, посредством которого эффекторная клетка иммунной системы активно лизует целевую клетку, антигены на поверхности мембраны которой были связаны специфическими антителами. Часто считают, что АЗКЦ опосредована клетками-естественными киллерами (NK), но дендритные клетки, макрофаги, моноциты и гранулоциты также могут опосредовать АЗКЦ.

Настоящее изобретение также включает комбинацию, включающую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению и второе антитело, которое индуцирует АЗКФ, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению повышает опосредованный антителами фагоцитоз клеток вторым антителом. Антителозависимый опосредованный клетками фагоцитоз (АЗКФ) представляет собой механизм опосредованной клетками иммунной защиты, с помощью которого клетки-мишени уничтожаются посредством опосредованного гранулоцитами, моноцитами, дендритными клетками или макрофагами фагоцитоза.

Клетки-естественные киллеры (NK) играют главную роль в иммунотерапии рака, которая включает нацеливание на антиген опухоли с помощью моноклональных антител (МАТ). В контексте нацеливания клеток NK-клетки можно "специфично активировать" посредством некоторых Fc-рецепторов, которые экспрессируются на поверхности данных клеток. NK-клетки могут экспрессировать FcγRIIIA и/или FcγRIIC, которые могут связываться с Fc-областью иммуноглобулинов, передавая активирующие сигналы внутри NK-клеток. После активации посредством Fc-рецепторов антителами, связанными с клетками-мишенями, NK-клетки способны лизировать клетки-мишени без примирования и секретировать цитокины, такие как интерферон-гамма, для привлечения клеток приобретенного иммунитета. Аналогичным образом, макрофаги, ассоциированные с опухолью (MAO), экспрессируют рецепторы на поверхности, которые связываются с Fc-фрагментами антител и позволяют им участвовать в АТ-зависимой опосредованной клетками цитотоксичности/фагоцитозе (АЗКЦ/АЗКФ). Так как передача сигнала SIRPα/CD47 индуцирует ответ "не ешь меня", который снижает АЗКЦ/АЗКФ, блокирование данной передачи сигнала антителами против SIRPα или антигенсвязывающими фрагментами согласно настоящему изобретению может повышать АЗКЦ в отношении опухолевых клеток, несущих антигенную детерминанту, на которую направлено терапевтическое антитело.

Такие АЗКЦ/АЗКФ как механизм действия можно применять для лечения различных видов рака и инфекционных заболеваний. Типичный перечень индуцирующих АЗКЦ/АЗКФ антител и конъюгатов антител, которые можно комбинировать с антителами или антигенсвязывающими фрагментами согласно настоящему изобретению, включает, но не ограничен перечисленными антителами: ритуксимаб, ублитуксимаб, маргетуксимаб, MGN-529, SCT400, велтузумаб, обинутузумаб, ADCT-502, Hul4, 18K322A, Hu3F8, динутуксимаб, трастузумаб, цетуксимаб, ритуксимаб-RLI, C.60C3-RLI, Hul4.18-IL2, KM2812, AFM13, и (CD20)₂×CD16, эрлотиниб (тарцева), даратумумаб, алемтузумаб, пертузумаб, брентуксимаб, элутузумаб, ибритумомаб, ифаботузумаб, фарлетузумаб, отлертузумаб, каротуксимаб, эпратузумаб, инебилизумаб, лумретузумаб, 4G7SDIE, AFM21, AFM22, LY-3022855, SNDX-6352, AFM-13, BI-836826, BMS-986012, BVX-20, могамулизумаб, ChiLob-7/4, лейкотуксимаб, изатуксимаб, DS-8895, FPA144, GM102, GSK-2857916, IGN523, IT1208, ADC-1013, CAN-04, XOMA-213, PankoMab-GEX, chKM-4927, IGN003, IGN004, IGN005, MDX-1097, MOR202, MOR-208, опортузумаб, энситуксимаб, ведотин (адцетрис), ибритумомаб тиуксетан, ABBV-838, HuMax-AXL-ADC и адо-трастузумаб эмтанзин (кадсила). Типичный перечень целевых антигенов для таких индуцирующих АЗКЦ/АЗКФ антител включает, но не ограничен перечисленными антигенами: AMHR2, AXL, BCMA, CAIX, CD4, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD37, CD38, CD40, CD52, CD98, CSF1R, GD2, CCR4, CS1, EpCam, EGFR, EGFRvIII, эндоглин, EphA2, EphA3, FGFR2b, рецептор фолиевой кислоты альфа, фукозил-GM1, HER2, HER3, IL1RAP, антиген миеломы-каппа, MS4A1, рецептор пролактина, TA-MUC1 и PSMA.

В некоторых вариантах реализации второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцирует АЗКФ. Исключительно в качестве примера такие антитела можно выбрать из группы, состоящей из ритуксимаба, ублитуксимаба, маргетуксимаба, MGN-529, SCT400, велтузумаба, обинутузумаба, трастузумаба, цетуксимаба, алемтузумаба, ибритумомаба, фарлетузумаба, инебилизумаба, лумретузумаба, 4G7SDIE, BMS-986012, BVX-20, могамулизумаба, ChiLob-7/4, GM102, GSK-2857916, PankoMab-GEX, chKM-4927, MDX-1097, MOR202 и MOR-208.

В вариантах реализации, в которых антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению комбинируют с одним или более индуцирующими АЗКЦ/АЗКФ антителами и конъюгатами антител, такие комбинации также можно необязательно применять в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом или терапевтической процедурой. В одном варианте реализации дополнительный терапевтический агент выбран из группы, состоящей из: антитела против LAG3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против APRIL или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против VISTA или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против BTLA или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против TIM3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против HVEM или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD137 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD28 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против PD1 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против PDL1 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против GITR или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ICOS или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT2 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT4 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT5 или его антигенсвязывающего фрагмента; и антитела против 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против NKG2A или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против NKG2C или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против NKG2E или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против TSLP или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против IL-10 или его антигенсвязывающего фрагмента; и IL-10 или пегилированного IL-10.

В соответствии с настоящим изобретением также предложены сосуд или устройство для инъекции, содержащие любое из направленных против SIRPα антител или антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению.

В соответствии с настоящим изобретением также предложен способ получения направленного против SIRPα антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, включающий: культивирование клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и/или легкую цепь антитела согласно настоящему изобретению (или его антигенсвязывающий фрагмент), при условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида; и необязательно выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки-хозяина и/или культуральной среды. В одном варианте реализации полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, и полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, находятся в одном векторе. В другом варианте реализации полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, и полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, находятся в различных векторах.

В соответствии с настоящим изобретением также предложен способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества направленного

против SIRP α антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, необязательно в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом или терапевтической процедурой.

В одном варианте реализации субъект, которого нужно лечить, представляет собой человека. В одном варианте реализации дополнительный терапевтический агент выбран из группы, состоящей из: антитела против LAG3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против APRIL или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против VISTA или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против BTLA или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против TIM3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против HVEM или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD137 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD28 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против PD1 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против PDL1 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против PDL2 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против GITR или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ICOS или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT2 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT4 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT5 или его антигенсвязывающего фрагмента; и антитела против 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против NKG2A или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против NKG2C или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против NKG2E или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против TSLP или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против IL-10 или его антигенсвязывающего фрагмента; и IL-10 или пегилированного IL-10.

В соответствии с настоящим изобретением также предложен способ лечения инфекции или инфекционного заболевания у субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, необязательно в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом или терапевтической процедурой. В одном варианте реализации субъект, которого нужно лечить, представляет собой человека.

В одном варианте реализации дополнительный терапевтический агент выбран из группы, состоящей из: антитела против LAG3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против APRIL или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против VISTA или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против BTLA или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против TIM3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CTLA4 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против HVEM или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD70 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD137 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против CD28 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против PD1 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против PDL1 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против PDL2 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против GITR или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ICOS или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT2 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT3 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT4 или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против ILT5 или его антигенсвязывающего фрагмента; и антитела против 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против NKG2A или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против NKG2C или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против NKG2E или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против TSLP или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против IL-10 или его антигенсвязывающего фрагмента; и IL-10 или пегилированного IL-10.

В соответствии с настоящим изобретением также предложен способ обнаружения присутствия пептида SIRP α или его фрагмента в образце, включающий приведение в контакт образца с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом согласно настоящему изобретению и детектирование присутствия комплекса между указанным антителом или фрагментом и пептидом; при этом обнаружение указанного комплекса свидетельствует о присутствии пептида SIRP α .

Краткое описание фигур

На фиг. 1 изображена перекрестная реакционная способность доступных для приобретения антител, направленных против hSIRP α , по отношению к hSIRP β 1 и аллель-специфическое связывание с hSIRP α V1 и hSIRP α V2.

На фиг. 2 изображена реакционная способность антитела KWAR23 по отношению к hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP β 1 и hSIRP γ .

На фиг. 3 изображена реакционная способность клона антитела hSIRP α .50A по отношению к различным аллелям hSIRP α .

На фиг. 4 изображена способность антитела hSIRP α .50A блокировать связывание рекомбинантного белка hCD47/Fc с экспрессированным на поверхности клетки hSIRP α .

На фиг. 5A и фиг. 5B изображено связывание антитела hSIRP α .50A с первичными обогащенными CD14⁺ моноцитами человека.

На фиг. 5C и фиг. 5D изображена способность антитела hSIRP α .50A блокировать связывание hCD47 с первичными обогащенными CD14⁺ моноцитами человека.

На фиг. 6A изображено связывание антитела hSIRP α . 50A с первичными гранулоцитами человека.

На фиг. 6B изображен фагоцитоз опухолевых клеток первичными гранулоцитами человека в присутствии ритуксимаба плюс или минус антитело hSIRP α .50A.

На фиг. 6C изображен фагоцитоз опухолевых клеток первичными гранулоцитами человека в присутствии даратумумаба плюс или минус антитело hSIRP α .50A.

На фиг. 6D изображен фагоцитоз опухолевых клеток первичными гранулоцитами человека в присутствии алектумумаба плюс или минус антитело hSIRP α . 50A.

На фиг. 6E изображен фагоцитоз опухолевых клеток первичными гранулоцитами человека в присутствии цетуксимаба плюс или минус антитело hSIRP α . 50A.

На фиг. 7 изображен фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами человека в присутствии указанного антитела (ритуксимаба или даратумумаба) плюс или минус антитело hSIRP α .50A.

На фиг. 8 изображено блокирование взаимодействия hSIRP α /hCD47 антителом hSIRP α .50A мыши и гуманизированным антителом hSIRP α .50A против hSIRP α .

На фиг. 9 изображено связывание антитела hSIRP α .50Ac hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP β 1, hSIRP α -V β C1 α C2 α , hSIRP α -V α C1 β C2 α и hSIRP α -V α C1 α C2 β .

На фиг. 10A изображено выравнивание последовательностей аминокислот домена IgV hSIRP α и hSIRP β 1.

На фиг. 10B изображено прекращение связывания антитела hSIRP α .50A с hSIRP α V1(P74A).

На фиг. 11 изображено связывание антител hSIRP α .40A и hSIRP α .50A с hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP β 1, hSIRP β L и hSIRP γ .

На фиг. 12 изображено связывание антител hSIRP α .40A и hSIRP α .50A с hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP α V3, hSIRP α V4, hSIRP α V5, hSIRP α V6, hSIRP α V8 и hSIRP α V9.

На фиг. 13 изображена способность антител hSIRP α .40A и hSIRP α .50A блокировать связывание рекомбинантного белка hCD47/Fc с экспрессированным на поверхности клетки hSIRP α .

На фиг. 14A и фиг. 14B изображено связывание антитела hSIRP α .40A с первичными обогащенными CD14⁺ моноцитами человека.

На фиг. 14C и фиг. 14D изображена способность антитела hSIRP α .40A блокировать связывание hCD47 с первичными обогащенными CD14⁺ моноцитами человека.

На фиг. 15A изображено связывание антител hSIRP α .40A и hSIRP α .50A с первичными гранулоцитами человека.

На фиг. 15B изображен фагоцитоз клеток Ramos первичными гранулоцитами человека в присутствии ритуксимаба плюс или минус антитела hSIRP α .40A и hSIRP α .50A.

На фиг. 16 изображено повышение антителами hSIRP α .40A и hSIRP α .50A вызванного ритуксимабом фагоцитоза клеток Raji.

На фиг. 17 изображено связывание антитела hSIRP α .40A мыши и гуманизованного антитела hSIRP α .40A с hSIRP α .

На фиг. 18 изображено блокирование связывания hCD47 с hSIRP α в присутствии вариантов гуманизованного антитела hSIRP α .40A.

На фиг. 19 изображено связывание антител hSIRP α .40A и hSIRP α .50A с hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP β 1, hSIRP-V γ C1 β C2 β , hSIRP-V β C1 γ C2 β и hSIRP-V β C1 β C2 γ .

На фиг. 20 изображено прекращение связывания антител hSIRP α .40A и hSIRP α .50A с hSIRP α V1(P74A).

На фиг. 21 изображена способность вариантов химерного антитела hSIRP α .40A влиять на опосредованный ритуксимабом фагоцитоз.

На фиг. 22 изображена способность вариантов гуманизованного антитела hSIRP α .40A влиять на опосредованный ритуксимабом фагоцитоз.

На фиг. 23A изображена способность hSIRP α .50A мыши и вариантов химерного антитела hIgG2 и hIgG4 hSIRP α . 50A влиять на опосредованный ритуксимабом фагоцитоз.

На фиг. 23B изображена способность вариантов химерного антитела hIgG2 и hIgG4 hSIRP α .50A влиять на опосредованный ритуксимабом фагоцитоз.

На фиг. 23C изображена способность вариантов химерного антитела hIgG2 и hIgG4 hSIRP α .50A влиять на опосредованный даратумумабом фагоцитоз.

На фиг. 23D изображена способность hSIRP α .50A мыши и вариантов химерного антитела hIgG2 hSIRP α . 50A влиять на опосредованный ритуксимабом фагоцитоз в гранулоцитах.

На фиг. 24A изображена способность hSIRP α .50A мыши и вариантов химерного антитела

hSIRP α .50A.hIgG1.N297Q, hSIRP α .50A.hIgG4.N297Q или hSIRP α .50A.hIgG2 влиять на опосредованный ритуксимабом фагоцитоз.

На фиг. 24B изображена способность hSIRP α .50A мыши и вариантов химерного антитела hSIRP α .50A.hIgG1.N297Q, hSIRP α .50A.hIgG4.N297Q или hSIRP α .50A.hIgG2 влиять на опосредованный даратумумабом фагоцитоз.

На фиг. 25 изображена способность вариантов химерного антитела hSIRP α .50A.hIgG1.N297Q, hSIRP α .50A hIgG1.L234A.L235A.P329G и hIgG2 или hIgG4 hSIRP α .50A влиять на опосредованный ритуксимабом фагоцитоз.

Подробное описание изобретения

Сокращения.

На всем протяжении подробного описания и примеров настоящего изобретения применяют следующие сокращения:

AЗКЦ	Антителозависимая опосредованная клетками цитотоксичность
AЗКФ	Антителозависимый опосредованный клетками фагоцитоз
КЗЦ	Комплемент-зависимая цитотоксичность
CDR	Определяющая комплементарность область в переменных областях иммуноглобулина, определенная с применением системы нумерации по Кабату
СНО	Яичник китайского хомячка
EC50	Концентрация, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания
ELISA	Твердофазный иммуферментный анализ
FR	Каркасная область антитела: переменные области иммуноглобулина за исключением участков CDR.
HRP	Пероксидаза хрена
IFN	Интерферон
IC50	Концентрация, приводящая к 50%-ному ингибированию
IgG	Имуноглобулин G
Кабат	Система выравнивания и нумерации иммуноглобулинов, впервые предложенная Elvin A. Kabat ((1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ое изд., Служба общественного здравоохранения, Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэриленд).
мАТ, или Mat, или МАТ	Моноклональное антитело
SEB	Энтеротоксин В стафилококка
ТТ	Столбнячный анатоксин
V-область	Фрагмент Ig цепей, последовательность которого переменна между различными антителами. Она простирается до остатка 109 по Кабату в легкой цепи и 113 - в тяжелой цепи.
VH	Переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина
VK	Переменная область легкой цепи каппа иммуноглобулина
VL	Переменная область легкой цепи иммуноглобулина

Определения.

Для того чтобы настоящее изобретение можно было более легко понять, ниже приведены конкретные определения некоторых технических и научных терминов. За исключением случаев, когда приведены конкретные определения в других местах в данном документе, все другие технические и научные термины, используемые в данном изобретении, имеют значения, которые обычно понимает средний специалист в области, к которой относится настоящее изобретение.

В данном изобретении, включая прилагаемую формулу изобретения, формы единственного числа терминов включают ссылку на множественное число соответствующих терминов, если в контексте явно не указано иное.

"Введение" и "лечение" применительно к животному, человеку, экспериментальному субъекту, клетке, ткани, органу или биологической жидкости относится к контакту экзогенного фармацевтического, терапевтического, диагностического агента или композиции с животным, человеком, субъектом, клеткой, тканью, органом или биологической жидкостью. В объем термина "обработка клетки" входит контакт реагента с клеткой, а также контакт реагента с жидкостью, при этом жидкость находится в контакте с клеткой. "Введение" и "лечение" также означает лечение, например, клетки *in vitro* и *ex vivo* реагентом, диагностическим агентом, связывающим соединением или другой клеткой.

"Лечить" или "лечение" означает вводить терапевтический агент, такой как композиция, содержа-

шая любое из антител или антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению, вовнутрь или наружно субъекту или пациенту, проявляющему один или более симптомов заболевания, или у которого подозревают наличие заболевания, по отношению к которому указанный агент обладает терапевтической активностью. Обычно агент вводят в количестве, эффективном для смягчения одного или более симптомов заболевания у получающего лечение субъекта или популяции, либо индуцируя ослабление, либо ингибируя прогрессирование такого(их) симптома(ов) до любой клинически измеримой степени. Количество терапевтического агента, которое эффективно смягчает любой конкретный симптом заболевания, может изменяться, в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст и масса тела пациента и способность лекарственного средства индуцировать желательный ответ у субъекта. Произошло ли смягчение симптома заболевания, можно оценить с помощью любого клинического измерения, которое обычно используют врачи или другие квалифицированные представители услуг здравоохранения для оценки тяжести или статуса прогрессирования данного симптома.

"Рекомбинантная экспрессия" белка означает транскрипцию и трансляцию экзогенного гена в организме хозяина с получением белка, который в данном изобретении называют "рекомбинантным белком".

SIRP α и связанные с ним белки.

SIRP α относится к классу мембранных белков, известных как "парные рецепторы", который включает несколько генов, кодирующих белки (например, SIRP α , SIRP β 1 и SIRP γ) со сходными внеклеточными участками, но различными трансмембранными и/или цитоплазматическими участками, обладающие противоположными (активирующими или ингибирующими) сигнальными способностями. Подобно SIRP α , существует несколько примеров парных рецепторов на НК-клетках и несколько - на миелоидных клетках, включая семейства рецепторов SIRP и CD200 (Hatherley и др., Mol Cell. 2008; 31: 266-277).

SIRP α содержит внеклеточный участок, который можно подразделить на три отдельных домена: Ig-подобный домен (иммуноглобулин-подобный) V-типа (IgV), Ig-подобный домен C1-типа (IgC1) и Ig-подобный домен C2-типа (IgC2). Домен IgV также известен как лиганд-связывающий N-концевой домен SIRP α . Подобно SIRP α , родственные белки SIRP β 1 и SIRP γ также содержат внеклеточный участок, который можно подразделить на домены IgV, IgC1 и IgC2. Тем не менее, SIRP α , SIRP β 1 и SIRP γ содержат различные цитоплазматические участки. SIRP β 1 содержит очень короткий цитоплазматический участок лишь из 6 аминокислот, в котором отсутствуют сигнальные мотивы для ассоциации с фосфатазами. Вместо этого, данный белок ассоциируется с активирующим DNAX белком 12 (DAP12) - димерным адапторным белком, который связывает аминокислоту с основной боковой цепью в трансмембранном участке SIRP β 1 и способен передавать активирующие сигналы через иммунорецепторный активирующий мотив на основе тирозина (ITAM). SIRP γ также содержит короткий цитоплазматический участок из 4 аминокислот, но в нем отсутствует заряженная боковая цепь аминокислоты в трансмембранном участке, и, следовательно, он не связывается с DAP12. Следовательно, SIRP γ описан как несигнальный белок (Bargclay, A.N. и Brown, M.H., Nat Rev Immunol. 2006; 6: 457-464).

Основным лигандом SIRP α является CD47, который состоит из одного внеклеточного домена IgV, пять раз пронизывающего мембрану домена и короткого цитоплазматического хвоста. CD47 действует как клеточный лиганд, при этом связывание опосредуется через NH₂-концевой домен IgV SIRP α . Подтверждение того, что CD47 способствует распознаванию своего, следует из наблюдения, что макрофаги селезенки, полученные из экспрессирующих CD47 мышей, устраняют введенные путем инфузии клетки CD47^{-/-} крови мышей (Oldenborg и др., Science. 2000; 288: 2051-2054).

Дополнительно к CD47 были описаны два других лиганда SIRP α , известных как поверхностно-активные белки A и D (Sp-A и Sp-D), оба из которых относятся к семейству коллектинов. Сообщали, что Sp-D связывается с расположенным рядом с мембраной доменом IgC2 SIRP α зависимым от кальция и сахараидом образом. Считают, что Sp-A и Sp-D помогают сохранять противовоспалительное окружение в легком путем стимуляции SIRP α на макрофагах альвеол (Gardai и др., Cell. 2003; 115: 13-23).

Последовательности аминокислот восьми вариантов SIRP α человека представлены в SEQ ID NO: 34, 36, 44, 46, 48, 50, 52 и 54; примеры последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих данные варианты, представлены в SEQ ID NO: 33, 35, 43, 45, 47, 49, 51 и 53, соответственно.

Для сравнения, последовательности аминокислот SIRP β 1 и SIRP γ человека представлены в SEQ ID NO: 38 и 40, соответственно, и примеры последовательностей нуклеиновых кислот представлены в SEQ ID NO: 37 и 39, соответственно.

Последовательность аминокислот CD47 человека представлена в SEQ ID NO: 42, и пример последовательности нуклеиновой кислоты представлен в SEQ ID NO: 41.

Модифицированные полипептиды SIRP α hSIRP α -V β C1 α C2 α , hSIRP α -V α C1 β C2 α , hSIRP α -V α C1 α C2 β и hSIRP α V1(P74A), которые обсуждаются далее в данном изобретении, представлены в SEQ ID NO: 56, 58, 60, и 62; примеры последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих данные варианты, перечислены в SEQ ID NO: 55, 57, 59 и 61, соответственно.

Антитела против SIRP α и их антигенсвязывающие фрагменты.

В соответствии с настоящим изобретением предложены антитела или их антигенсвязывающие

фрагменты, которые связывают SIRP α человека, и применения таких антител или фрагментов. В некоторых вариантах реализации антитела против SIRP α являются выделенными.

Способно ли антитело специфично связываться с полипептидной последовательностью (например, SIRP α , hSIRP β 1 человека и т.д.) можно определить, применяя любой анализ, известный в данной области. Примеры анализов, известных в данной области, для определения аффинности связывания включают поверхностный плазмонный резонанс (например, BIACORE) или аналогичную методику (например, KinExa или OCTET).

В данном изобретении термин "антитело" относится к любой форме антитела, которая проявляет желательную биологическую активность. Термин антитело включает антигенсвязывающие части, т.е. "сайты связывания антигенов" (например, фрагменты, подпоследовательности, определяющие комплементарность области (CDR)), которые сохраняют способность связывать антиген, включая (i) фрагмент Fab -моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L, V_H, C_L и C_{H1}; (ii) фрагмент F(ab')₂ - бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов V_H и C_{H1}; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward и др., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из домена V_H; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR). Одно цепочечные антитела также включены посредством ссылки в объем термина "антитело". Предпочтительные терапевтические антитела представляют собой интактные антитела IgG. Под термином "интактный IgG" в данном изобретении подразумевают полипептид, относящийся к классу антител, которые по существу кодируются известным геном иммуноглобулина-гамма. У человека данный класс включает IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. У мышей данный класс включает IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Известные домены Ig в классе IgG антител представляют собой V_H, C γ 1, C γ 2, C γ 3, V_L и C_L.

В объем настоящего изобретения входят антигенсвязывающие SIRP α фрагменты и способы их применения.

В данном изобретении "полноразмерное антитело" представляет собой, в случае IgG, бивалентную молекулу, содержащую две тяжелые цепи и две легкие цепи. Каждая тяжелая цепь содержит домен V_H, за которым следует константный домен (C_{H1}), шарнирная область и еще два константных домена (C_{H2} и C_{H3}); тогда как каждая легкая цепь содержит один домен V_L и один константный домен (C_L). Полноразмерное антитело в случае IgM представляет собой декавалентную или додекавалентную молекулу, содержащую 5 или 6 связанных иммуноглобулинов, в указанных иммуноглобулинах каждый мономер содержит два сайта связывания антигенов, образованных тяжелой и легкой цепью.

В данном изобретении, если не указано иначе, "фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент" относится к антигенсвязывающим фрагментам антитела, т.е. фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном, который связывает полноразмерное антитело, например, к фрагментам, в которых сохранен один или более участков CDR. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничены перечисленными: фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител, например, sc-Fv; нанотела и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

В объем настоящего изобретения входят направленные против SIRP α фрагменты Fab и способы их применения. "Фрагмент Fab" состоит из одной легкой цепи и C_{H1} и переменных областей одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи. "Фрагмент Fab" может представлять собой продукт расщепления антитела папаином.

В объем настоящего изобретения входят антитела против SIRP α и их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат область Fc, и способы их применения. Область "Fc" содержит два фрагмента тяжелой цепи, включающих домены C_{H3} и C_{H2} антитела. Указанные два фрагмента тяжелой цепи удерживаются двумя или более дисульфидными связями и гидрофобными взаимодействиями доменов C_{H3}.

В объем настоящего изобретения входят фрагменты Fab' против SIRP α и способы их применения. "Фрагмент Fab'" содержит одну легкую цепь и часть или фрагмент одной тяжелой цепи, которая содержит домен V_H и домен C_{H1}, а также участок, расположенный между доменами C_{H1} и C_{H2}, так что может образоваться межцепочечная дисульфидная связь между двумя тяжелыми цепями двух фрагментов Fab' с образованием молекулы F(ab')₂.

В объем настоящего изобретения входят фрагменты F(ab')₂ против SIRP α и способы их применения. "Фрагмент F(ab')₂" содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами C_{H1} и C_{H2}, так что образуется межцепочечная дисульфидная связь между двумя указанными тяжелыми цепями. Фрагмент F(ab')₂, следовательно, состоит из двух фрагментов Fab', которые удерживаются вместе дисульфидной связью между двумя тяжелыми цепями. "Фрагмент F(ab')₂" может представлять собой продукт расщепления антитела пепсином.

В объем настоящего изобретения входят фрагменты Fv против SIRP α и способы их применения. "Область FV" содержит переменные области из обеих тяжелой и легкой цепей, но в ней отсутствуют константные области.

В объем настоящего изобретения входят фрагменты scFv против SIRP α и способы их применения.

Термин "одноцепочечные Fv" или антитело "scFv" относится к фрагментам антитела, содержащим домены V_H и V_L антитела, при этом данные домены находятся в одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L , который позволяет scFv образовывать желательную структуру для связывания антигена. Обзор scFv можно найти в Pluckthun (1994) *The Pharmacology Monoclonal Antibodies*, том 113, Rosenberg и Moore, ред. Springer-Verlag, Нью-Йорк, с. 269-315. Также см. публикацию международной заявки на патент № WO 88/01649 и патенты США № 4946778 и 5260203.

В объем настоящего изобретения входят доменные антитела против SIRP α и способы их применения. "Доменное антитело" представляет собой иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, содержащий только переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи. В некоторых случаях две или более областей V_H ковалентно соединены с пептидным линкером с получением бивалентного доменного антитела. Две области V_H бивалентного доменного антитела могут быть нацелены на один и тот же или различные антигены.

В объем настоящего изобретения входят бивалентные антитела против SIRP α и способы их применения. "Бивалентное антитело" содержит два сайта связывания антигена. В некоторых случаях указанные два сайта связывания специфичны к одинаковым антигенам. Тем не менее, бивалентные антитела могут быть биспецифическими (см. ниже).

В объем настоящего изобретения входят диатела против SIRP α и способы их применения. В данном изобретении термин "диатела" относится к малым фрагментам антител с двумя сайтами связывания антигена, указанные фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (V_H) соединенный с переменным доменом легкой цепи (V_L) в одной полипептидной цепи (V_H - V_L или V_L - V_H). Применяя линкер, который слишком короток, чтобы позволить спаривание между двумя доменами на одной цепи, домены Диатела более полно описаны, например, в EP 404097; WO 93/11161 и Holliger и др. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448. Дуотела описаны in Labrij пи др., 2013, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110 (13): 5145-5150. Обзор сконструированных вариантов антител, как правило, см. в Holliger и Hudson (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1126-1136.

Обычно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, который модифицирован каким-либо образом, сохраняет по меньшей мере 10% от своей связывающей активности (по сравнению с исходным антителом), когда данная активность выражена на молярной основе.

Предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению сохраняет по меньшей мере 20, 50, 70, 80, 90, 95 или 100% или более аффинности связывания SIRP α от таковой у исходного антитела. Также предполагается, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению может содержать консервативные или неконсервативные замены аминокислот (называют "консервативными вариантами" или "функционально-консервативными вариантами" антитела), которые по существу не изменяют его биологическую активность.

В объем настоящего изобретения входят выделенные антитела против SIRP α и их антигенсвязывающие фрагменты и способы их применения. В данном изобретении не предполагается, что термин "выделенные" относится к полному отсутствию таких биологических молекул, или к отсутствию воды, буферов или солей, или к отсутствию компонентов фармацевтического состава, который содержит указанные антитела или фрагменты. "Выделенное" антитело, антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновая кислота и т.д. представляют собой такие антитело, антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту, которые были обнаружены и отделены и/или извлечены из одного или более компонентов их природного окружения. В предпочтительных вариантах реализации антитело, антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту и т.д. очищают до 75% по массе или более, более предпочтительно до 90% по массе или более, еще более предпочтительно до 95% по массе или более, еще более предпочтительно до 98% по массе или более. Таким образом, "выделенные" биологические молекулы по меньшей мере частично свободны от других биологических молекул из клеток или культур клеток, в которых они получены. Такие биологические молекулы включают нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы или другой материал, такой как обломки клеток и ростовая среда. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно может быть по меньшей мере частично свободен от компонентов системы экспрессии, таких как биологические молекулы из клетки-хозяина или из ее ростовой среды.

В объем настоящего изобретения входят химерные антитела против SIRP α (например, константный домен человека/переменный домен мыши) и способы их применения. В данном изобретении "химерное антитело" представляет собой антитело, содержащее переменный домен из первого антитела и константный домен из второго антитела, при этом первое и второе антитела получены из различных видов (патент США № 4816567; и Morrison и др., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855). Обычно переменные домены получают из антитела из экспериментального животного ("исходного антитела"), такого как грызун, и последовательности константных доменов получают из антител человека, так что полученное в результате этого химерное антитело будет с меньшей вероятностью индуцировать нежелательный иммунный ответ у субъекта, представляющего собой человека, чем исходное (например, мыши-

ное) антитело.

В объем настоящего изобретения входят гуманизированные антитела против SIRP α , их антигенсвязывающие фрагменты (например, антитела крысы или мыши, которые были гуманизированы) и способы их применения. В данном изобретении термин "гуманизированное антитело" относится к формам антитела, которые содержат последовательности как из антител человека, так и из не относящихся к человеку (например, мышинных или крысиных) антител. Как правило, гуманизированное антитело будет состоять по существу из по меньшей мере одного и обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все из гиперпеременных петель соответствуют таковым из не относящегося к человеку иммуноглобулина и все или по существу все из каркасных (FR) областей получены из последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина человека (Fc). Более подробное описание гуманизированных антител, см., например, в Jones и др., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann и др., *Nature*, 332:323-329 (1988); Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992); и Clark, *Immunol. Today* 21: 397-402 (2000).

Обычно, стандартная структурная единица антитела включает тетрамер. Каждый тетрамер содержит две идентичные пары полипептидных цепей, каждая пара содержит одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи содержит переменную область из приблизительно 100-110 или более аминокислот, которая, главным образом, отвечает за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть тяжелой цепи может соответствовать константной области, которая, главным образом, отвечает за эффекторную функцию. Обычно, легкие цепи человека классифицируют как легкие цепи каппа и ламбда. Более того, тяжелые цепи человека обычно классифицируют как мю, дельта, гамма, альфа или эpsilon, и по ним определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. Внутри легких и тяжелых цепей переменные и константные области объединены участком "J" из приблизительно 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также содержит участок "D" из приблизительно 10 или более аминокислот. См., как правило, *Fundamental Immunology*, глава 7 (Paul, W., ред., 2ое изд. Raven Press, Нью-Йорк (1989)).

Переменные области каждой пары легкой/тяжелой цепи образуют сайт связывания на антителе. Таким образом, обычно, интактное антитело содержит два сайта связывания. За исключением бифункциональных или биспецифических антител, два указанных сайта связывания, как правило, одинаковые.

Обычно переменные домены как тяжелых, так и легких цепей содержат три гиперпеременных участка, также называемых определяющими комплементарность областями (CDR), расположенных внутри относительно консервативных каркасных областей (FR). Участки CDR обычно скоординированы каркасными областями, что позволяет связывание со специфическим эпитопом. Обычно, от N-конца к C-концу переменные домены как легкой, так и тяжелой цепи содержат FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Присвоение аминокислот каждому домену, как правило, осуществляется в соответствии с определениями из *Sequences of Proteins of Immunological Interest* Kabat и др.; Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэриленд; 5^{ое} изд.; NIH, номер публикации 91-3242 (1991); Kabat (1978) *Adv. Prot. Chem.* 32:1-75; Kabat и др., (1977) *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616; Chothia и др., (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917, или Chothia и др., (1989) *Nature* 342:878-883.

В данном изобретении термин "гиперпеременный участок" относится к аминокислотным остаткам антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые отвечают за связывание антигена. Гиперпеременный участок содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области" или "CDR" (т.е. CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в переменном домене легкой цепи и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в переменном домене тяжелой цепи). См. Kabat и др. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^{ое} изд. Служба общественного здравоохранения, Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэриленд (в котором границы участков CDR антитела обозначены по последовательности); см. также Chothia и Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (в котором границы участков CDR антитела обозначены по структуре). В данном изобретении термин "каркас" или остатки "FR" относится к остаткам переменного домена, отличным от остатков гиперпеременного участка, описанным в данном изобретении как остатки CDR.

"Выделенная молекула нуклеиновой кислоты" или "выделенный полинуклеотид" означает ДНК или РНК, полученную из генома, мРНК, кДНК или полученную синтетическим путем или из некоторой их комбинации, которая не связана со всем или частью полинуклеотида, в котором выделенный полинуклеотид встречается в природе, или связана с полинуклеотидом, с которым она не связана в природе. Для целей согласно настоящему описанию должно быть очевидно, что в объем термина "молекула нуклеиновой кислоты, включающая" конкретную последовательность нуклеотидов, не входят интактные хромосомы. Выделенные молекулы нуклеиновых кислот "включающие" определенные последовательности нуклеиновых кислот, могут содержать, дополнительно к указанным определенным последовательностям, кодирующие последовательности для вплоть до десяти или даже до двадцати или более других белков или их частей или фрагментов, или могут содержать функционально связанные регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию кодирующей области перечисленных последовательностей нуклеиновых кислот, и/или могут содержать последовательности вектора.

Формулировка "контролирующие последовательности" относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной с ними кодирующей последовательности в конкретном организме хозяина. Контролирующие последовательности, которые подходят для прокариот, например, включают промотор, необязательно последовательность оператора и участок связывания рибосомы. Известно, что в эукариотических клетках используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота или полинуклеотид "функционально связаны", когда они помещены в функциональную взаимосвязь с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК препоследовательности или секреторного лидера функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в составе пребелка и участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию указанной последовательности; или участок связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы способствовать трансляции. Как правило, но не всегда, "функционально связанный" означает, что связанные последовательности ДНК контактируют, и, в случае секреторного лидера, контактируют и находятся в фазе считывания. Тем не менее, энхансеры не обязательно должны контактировать. Соединение осуществляют путем лигирования в удобных сайтах рестрикции. Если такие сайты отсутствуют, то применяют синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры в соответствии с обычной практикой.

В данном изобретении формулировки "клетка", "линия клеток" и "культура клеток" используют взаимозаменяемо, и все такие названия включают потомство клеток. Таким образом, формулировки "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают первичные клетки субъекта и культуры, полученные из них, независимо от количества пересеваний. Также понятно, что не все потомство будет содержать совершенно идентичную ДНК, вследствие преднамеренных или самопроизвольных мутаций. Мутантное потомство с такой же функцией или биологической активностью, которую выявляли путем скрининга в исходных трансформированных клетках, входит в объем изобретения. Если предполагаются отличные обозначения, то они будут ясны из контекста.

В данном изобретении "зародышевая последовательность" относится к последовательности из не перестроенных последовательностей ДНК иммуноглобулинов. Можно использовать любой подходящий источник не перестроенных последовательностей иммуноглобулинов. Зародышевые последовательности человека можно получить, например, из баз данных зародышевых последовательностей JOINSOLVER на сайте в Интернете Национального института артрита и скелетно-мышечных и кожных заболеваний Национальных институтов здравоохранения Соединенных Штатов. Зародышевые последовательности мыши можно получить, например, как описано в Giudicelli и др. (2005) *Nucleic Acids Res.* 33: D256-D261.

Физические и функциональные свойства типичных антител против SIRP α .

В соответствии с настоящим изобретением предложены антитела против SIRP α и их антигенсвязывающие фрагменты, обладающие определенными структурными и функциональными особенностями, и способы применения антител или их антигенсвязывающих фрагментов для лечения или предотвращения заболевания (например, рака или инфекционного заболевания).

Выше описано, что антитела и фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом, с которым связывается любое из антител против SIRP α или их антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению, также входят в объем настоящего изобретения. В одном варианте реализации в соответствии с настоящим изобретением предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тем же эпитопом SIRP α человека, с которым связывается антитело, содержащее одну из следующих комбинаций последовательности тяжелой цепи/последовательности легкой цепи (или в каждом случае последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичной указанной последовательности):

SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 20 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H1L1),
 SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 22 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H1L2),
 SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 24 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H1L3),
 SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 26 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H1L4),
 SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 28 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H1L5),
 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 20 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H2L1),
 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 22 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H2L2),
 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 24 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H2L3),
 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 26 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H2L4),
 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 28 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H2L5),
 SEQ ID NO: 14/SEQ ID NO: 20 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H3L1),
 SEQ ID NO: 14/SEQ ID NO: 22 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H3L2),
 SEQ ID NO: 14/SEQ ID NO: 24 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H3L3),
 SEQ ID NO: 14/SEQ ID NO: 26 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H3L4),

SEQ ID NO: 14/SEQ ID NO: 28 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H3L5),
SEQ ID NO: 16/SEQ ID NO: 20 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H4L1),
SEQ ID NO: 16/SEQ ID NO: 22 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H4L2),
SEQ ID NO: 16/SEQ ID NO: 24 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H4L3),
SEQ ID NO: 16/SEQ ID NO: 26 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H4L4),
SEQ ID NO: 16/SEQ ID NO: 28 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H4L5),
SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 20 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H5L1),
SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 22 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H5L2),
SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 24 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H5L3),
SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 26 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H5L4),
SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 28 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .50A.H5L5),
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 90 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H1L1),
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 92 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H1L2),
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 94 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H1L3),
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 96 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H1L4),
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 98 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H1L5),
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 100 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H1L6),
SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 90 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H2L1),
SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 92 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H2L2),
SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 94 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H2L3),
SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 96 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H2L4),
SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 98 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H2L5),
SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 100 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H2L6),
SEQ ID NO: 82/SEQ ID NO: 90 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H3L1),
SEQ ID NO: 82/SEQ ID NO: 92 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H3L2),
SEQ ID NO: 82/SEQ ID NO: 94 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H3L3),
SEQ ID NO: 82/SEQ ID NO: 96 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H3L4),
SEQ ID NO: 82/SEQ ID NO: 98 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H3L5),
SEQ ID NO: 82/SEQ ID NO: 100 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H3L6),
SEQ ID NO: 84/SEQ ID NO: 90 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H4L1),
SEQ ID NO: 84/SEQ ID NO: 92 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H4L2),
SEQ ID NO: 84/SEQ ID NO: 94 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H4L3),
SEQ ID NO: 84/SEQ ID NO: 96 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H4L4),
SEQ ID NO: 84/SEQ ID NO: 98 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H4L5),
SEQ ID NO: 84/SEQ ID NO: 100 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H4L6),
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 90 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H5L1),
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 92 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H5L2),
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 94 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H5L3),
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 96 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H5L4),
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 98 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H5L5),
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 100 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H5L6),
SEQ ID NO: 88/SEQ ID NO: 90 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H6L1),
SEQ ID NO: 88/SEQ ID NO: 92 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H6L2),
SEQ ID NO: 88/SEQ ID NO: 94 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H6L3),
SEQ ID NO: 88/SEQ ID NO: 96 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H6L4),
SEQ ID NO: 88/SEQ ID NO: 98 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H6L5),
SEQ ID NO: 88/SEQ ID NO: 100 (в данном изобретении обозначают hSIRP α .40A.H6L6).

Доступно несколько способов картирования эпитопов для антител на целевых антигенах, включая: масс-спектрометрию, основанную на водородно-дейтериевом обмене, масс-спектрометрию, сопряженную с перекрестным связыванием, рентгеноструктурный анализ, анализ перскап и сайт-направленный мутагенез. Например, ВДО (водородно-дейтериевый обмен), сопряженный с протеолизом и масс-спектрометрией, можно применять для определения эпитопа для антитела на специфическом антигене Y. ВДО-МС основывается на точном измерении и сравнении степени включения дейтерия антигеном при инкубации в D₂O отдельно и в присутствии специфичного к нему антитела в различные промежутки времени. Дейтерий обменивается с водородом на амидном каркасе белков в открытых областях, тогда как области антигена, связанные с антителом, будут защищены, и в них будет наблюдаться меньший обмен или не будет обмена при анализе протеолитических фрагментов с помощью ЖХ/МС/МС. Масс-спектрометрия, сопряженная с перекрестным связыванием, начинается со связывания антитела и антигена с массивным меченым химическим линкером для перекрестного связывания. Затем присутствие ком-

плекса подтверждают путем детектирования большой массы с помощью матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ). Так как после реакции перекрестного связывания комплекс АТ/АГ чрезвычайно стабилен, его можно подвергать воздействию множества различных ферментов и условий расщепления с получением множества различных перекрывающихся пептидов. Идентификацию данных пептидов проводят, применяя методики масс-спектрометрии высокого разрешения и МС/МС. Идентификацию перекрестно сшитых пептидов проводят, применяя массивную метку, связанную с перекрестно сшивающими реагентами. После фрагментации МС/МС и анализа результатов как эпитоп, так и паратоп определяют в одном эксперименте.

В объем настоящего изобретения также входят выделенные антитела против SIRP α и их антиген-связывающие фрагменты (например, гуманизированные антитела), включающие вариант цепи иммуноглобулина, описанный в данном изобретении, при этом указанный вариант проявляет одно или более из следующих свойств:

связывает белок SIRP α V1 человека, имеющий последовательность SEQ ID NO: 34, с EC₅₀ < 1 нМ; и проявляет по меньшей мере в 100 раз более высокую EC₅₀ по отношению к SIRP α V1(P74A), имеющему последовательность SEQ ID NO: 62; и необязательно также по меньшей мере в 100 раз более высокую EC₅₀ по отношению к белку SIRP β 1 человека, имеющему последовательность SEQ ID NO: 38 (при этом в каждом случае пониженная EC₅₀ относится к EC₅₀ по отношению к белку SIRP α V1 человека, имеющему последовательность SEQ ID NO: 34, и в каждом случае предпочтительно измерение проводят с помощью клеточного анализа ELISA (CELISA), описанного далее в данном изобретении;

связывается с клеткой, экспрессирующей белок SIRP α V1 человека, с EC₅₀ < 10 нМ, предпочтительно < 5 нМ, более предпочтительно < 1,5 нМ, еще более предпочтительно < 1,0 нМ, еще более предпочтительно < 0,5 нМ и наиболее предпочтительно равной приблизительно 0,3 нМ или менее; связывается с клеткой, экспрессирующей белок SIRP α V2 человека, с EC₅₀ < 10 нМ, предпочтительно < 5 нМ, более предпочтительно < 1,5 нМ, еще более предпочтительно < 1,0 нМ, еще более предпочтительно < 0,5 нМ и наиболее предпочтительно равной приблизительно 0,3 нМ или менее; не проявляет заметного связывания с белком SIRP β 1 при концентрации антитела 50 нМ, предпочтительно 67 нМ и более предпочтительно 100 нМ; или, в качестве альтернативы, при концентрации, которая в 10 раз больше, предпочтительно в 50 раз больше, более предпочтительно в 100 раз больше и еще более предпочтительно в 200 раз больше, чем EC₅₀ антитела по отношению к SIRP α V1 или SIRP α V2;

ингибирует связывание между SIRP α человека и CD47 с IC₅₀ < 10,0 нМ, более предпочтительно < 5,0 нМ, еще более предпочтительно < 2,5 нМ и наиболее предпочтительно равной приблизительно 1,0 нМ или менее; и

проявляет балл "человечности" T20, равный по меньшей мере 79, и более предпочтительно 85%.

В других вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены антитела, или их антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают SIRP α человека (например, гуманизированные антитела) и содержат домены V_H и домены V_L с последовательностью, по меньшей мере на 90% идентичной последовательностям SEQ ID NO: 75, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 102, 7, 10, 12, 14, 16, 18 и 30; и 76, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 104, 8, 20, 22, 24, 26, 28 и 32. В других вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены антитела, или их антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают SIRP α человека (например, гуманизированные антитела) и содержат домены V_H и домены V_L с последовательностью, по меньшей мере на 95% идентичной последовательностям SEQ ID NO: 75, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 102, 7, 10, 12, 14, 16, 18 и 30; и 76, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 104, 8, 20, 22, 24, 26, 28 и 32. В других вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены антитела, или их антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают SIRP α человека (например, гуманизированные антитела) и содержат домены V_H и домены V_L с последовательностью, по меньшей мере на 97% идентичной последовательностям SEQ ID NO: 75, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 102, 7, 10, 12, 14, 16, 18, и 30; и 76, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 104, 8, 20, 22, 24, 26, 28 и 32. В других вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены антитела, или их антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают SIRP α человека (например, гуманизированные антитела) и содержат домены V_H и домены V_L с последовательностью, по меньшей мере на 98% идентичной последовательностям SEQ ID NO: 75, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 102, 7, 10, 12, 14, 16, 18 и 30; и 76, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 104, 8, 20, 22, 24, 26, 28 и 32. В других вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены антитела, или их антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают SIRP α человека (например, гуманизированные антитела) и содержат домены V_H и домены V_L с последовательностью, по меньшей мере на 99% идентичной последовательностям SEQ ID NO: 75, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 102, 7, 10, 12, 14, 16, 18 и 30; и 76, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 104, 8, 20, 22, 24, 26, 28 и 32. Предпочтительно в каждом случае различия в последовательностях между SEQ ID NO: 75, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 102, 7, 10, 12, 14, 16, 18 и 30; и 76, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 104, 8, 20, 22, 24, 26, 28 и 32 и указанными вариантами состоят из консервативных замен и наиболее предпочтительно ограничены заменами в карманных остатках.

В следующих источниках представлены алгоритмы BLAST, которые часто применяют для анализа последовательностей: BLAST ALGORITHMS: Camacho, C. и др. (2009): BMC Bioinformatics 10:421; Alt-

schul и др. (2005) FEBS J. 272(20): 5101-5109; Altschul, S.F., и др., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., и др., (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L., и др., (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F., и др., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J., и др., (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J.C., и др., (1993) Comput. Chem. 17:149-163; Hancock, J.M. и др., (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70; ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff, M.O., и др., "A model of evolutionary change in proteins" в Atlas of Protein Sequence and Structure (1978), том 5, прил. 3. M.O. Dayhoff (ред.), с. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Вашингтон, федеральный округ Колумбия; Schwartz, R.M., и др., "Matrices for detecting distant relationships" в Atlas of Protein Sequence and Structure (1978), том 5, прил. 3." M.O. Dayhoff (ред.), с. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Вашингтон, федеральный округ Колумбия; Altschul, S.F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D.J., и др., (1991) Methods 3:66-70; Henikoff, S., и др., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919; Altschul, S.F., и др., (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; ALIGNMENT STATISTICS: Karlin, S., и др., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268; Karlin, S., и др., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877; Dembo, A., и др., (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; и Altschul, S.F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments" в Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ред.), (1997), с. 1-14, пленум, Нью-Йорк. В настоящей заявке сравнения процентов идентичности предпочтительно осуществляют с помощью алгоритма BLAST, при этом параметры указанного алгоритма выбирают для получения наибольшего совпадения между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, ожидаемый порог: 10; длина слова: 6; максимальные совпадения в запрошенном диапазоне: 0; матрица: BLOSUM 62; цены гэпов: наличие - 11, удлинение - 1; корректировка матрицы весов в зависимости от состава и удовлетворения условиям).

Формулировки "консервативно модифицированные варианты" или "консервативная замена" относятся к заменам аминокислот в белке на другие аминокислоты, обладающие сходными свойствами (например, зарядом, размером боковых цепей, гидрофобностью/гидрофильностью, конформацией остова и жесткостью, и т.д.), так что данные изменения часто можно осуществить без изменения биологической активности белка. Специалистам в данной области известно, что, как правило, замены одной аминокислоты в несущественных областях полипептида значительно не изменяют биологическую активность (см., например, Watson и др. (1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., с. 224 (4-ое изд.)). Кроме того, замены на структурно или функционально сходные аминокислоты с меньшей вероятностью нарушат биологическую активность. Примеры консервативных замен описаны в следующей табл. 1.

Таблица 1
Примеры консервативных замен аминокислот

Исходный остаток	Консервативная замена
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Функционально консервативные варианты антител согласно настоящему изобретению также входят

в объем настоящего изобретения. "Функционально консервативные варианты" в данном изобретении относятся к антителам или фрагментам, в которых один или несколько аминокислотных остатков были заменены без изменения желательного свойства, такого как аффинность и/или специфичность к антигену. Такие варианты включают, но не ограничены заменой аминокислоты на таковую, обладающую сходными свойствами, например, консервативные замены аминокислот из табл. 1. Также предложены выделенные полипептиды, содержащие домены V_L антител против SIRP α согласно настоящему изобретению (например, последовательности SEQ ID NO: 76, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 8, 20, 22, 24, 26, 28 и 32), и выделенные полипептиды, содержащие домены V_H антител против SIRP α согласно настоящему изобретению (например, последовательности SEQ ID NO: 75, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 7, 10, 12, 14, 16, 18 и 30), содержащие до 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более замен аминокислот, и предпочтительно консервативных замен.

В объем настоящего изобретения дополнительно входят полинуклеотиды, кодирующие любой из полипептидов или иммуноглобулиновых цепей антител против SIRP α и их антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению. Например, в объем настоящего изобретения входят полинуклеотиды, кодирующие аминокислоты, описанные в любой из последовательностей SEQ ID NO: 75, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 102, 7, 10, 12, 14, 16, 18 и 30; и последовательностей SEQ ID NO: 76, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 104, 8, 20, 22, 24, 26, 28 и 32.

В одном варианте реализации предложен выделенный полинуклеотид, например, ДНК, кодирующая указанные полипептидные цепи выделенных антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном изобретении. В одном варианте реализации выделенный полинуклеотид кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий по меньшей мере один переменный домен легкой цепи (V_L) зрелого иммуноглобулина согласно настоящему изобретению и/или по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи (V_H) зрелого иммуноглобулина согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации выделенный полинуклеотид кодирует обе легкую цепь и тяжелую цепь на одной полинуклеотидной молекуле, и в других вариантах реализации легкая и тяжелая цепи кодируются на отдельных полинуклеотидных молекулах. В другом варианте реализации указанные полинуклеотиды дополнительно кодируют сигнальную последовательность.

В настоящем изобретении также предложены векторы, например, векторы экспрессии, такие как плазмиды, содержащие выделенные полинуклеотиды согласно настоящему изобретению, при этом указанный полинуклеотид функционально связан с контролируемыми последовательностями, которые распознаются клеткой-хозяином, когда указанную клетку-хозяина трансфицируют указанным вектором. Также предложены клетки-хозяева, содержащие вектор согласно настоящему изобретению, и способы получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или полипептида, описанных в данном изобретении, включающие культивирование клетки-хозяина, несущей вектор экспрессии или нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуноглобулиновые цепи антитела или их антигенсвязывающий фрагмент, в культуральной среде и выделение антигена или антигенсвязывающего фрагмента антитела из указанной клетки-хозяина или культуральной среды.

Аффинность связывания.

В качестве примера, но не ограничения, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, могут связывать SIRP α человека бивалентно со значением K_D , равным 10×10^{-9} М или меньше, что определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или аналогичной методики (например, KinExa или интерферометрии биослоя (ОСТЕТ)). В одном варианте реализации антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, могут связывать SIRP α человека бивалентно со значением K_D , равным приблизительно $5-10 \times 10^{-9}$ М, что определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или аналогичной методики (например, KinExa или ОСТЕТ). Аффинность рассчитывают как $K_D = k_{off}/k_{on}$ (k_{off} представляет собой константу скорости диссоциации, K_{on} представляет собой константу скорости ассоциации и K_D представляет собой константу равновесия). Аффинность можно определить при равновесии путем измерения фракции связанного (r) меченого лиганда при различных концентрациях (c). Результаты представляют графически, используя уравнение Скэтчарда: $r/c = K(n-r)$, где r —моли связанного лиганда/моль рецептора при равновесии; c —концентрация свободного лиганда при равновесии; K —равновесная константа ассоциации; и n —число сайтов связывания лигандов на молекуле рецептора. С помощью графического анализа r/c наносят на ось y , а r наносят на ось x , таким образом получая график Скэтчарда. Измерение аффинности антитела с помощью анализа Скэтчарда хорошо известно в данной области. См., например, van Eyr и др., J. Immunoassay 12: 425-43, 1991; Nelson и Griswold, Comput. Methods Programs Biomed. 27: 65-8, 1988.

Человечность.

Для целей настоящего документа "человечность" измеряют, используя анализатор балла T20 для количественного определения человечности переменной области моноклональных антител, как описано в Gao SH, Huang K, Tu H, Adler AS. Monoclonal antibody humanness score and its applications. BMC Biotechnology. 2013; 13:55. doi: 10.1186/1472-6750-13-55).

Предусмотрен доступный через интернет инструмент для расчета балла T20 последовательностей антител с применением баз данных T20 Cutoff Human Databases: <http://abAnalyzer.lakepharma.com>. При вычислении балла T20 вводимой белковой последовательности варибельной области VH, VK или VL сначала присваивается нумерация по Кабату и идентифицируются остатки CDR. Полноразмерную последовательность или последовательность только каркаса (с удаленными остатками CDR) сравнивают с каждой последовательностью в соответствующей базе данных антител, применяя алгоритм blastp (белок-белок) BLAST. Идентичность последовательностей при каждом попарном сравнении выбирают, и после анализа каждой последовательности в базе данных указанные последовательности сортируют от высокого уровня к низкому на основании идентичности указанных последовательностей с вводимой последовательностью. Процент идентичности 20 самых совпадающих (Top 20) последовательностей усредняют с получением балла T20.

Для каждого типа цепи (VH, VK, VL) и длины последовательности (полноразмерная или только каркас) в базах данных "All Human Databases" каждая последовательность антитела была оценена среди соответствующей базы данных, применяя анализатор балла T20. Балл T20 получали для 20 самых совпадающих последовательностей после исключения самой вводимой последовательности (усредняли процент идентичности последовательностей от 2 до 21, поскольку последовательность 1 всегда представляла собой само вводимое антитело). Баллы T20 для каждой группы сортировали от высокого к низкому. Убывание балла было приблизительно линейным для большинства последовательностей; тем не менее, баллы T20 для нижних ~15% антител начинали резко уменьшаться. Следовательно, нижние 15 процентов последовательностей удаляли, и остальные последовательности образовывали базы данных T20 Cutoff Human Databases, при этом отсечка балла T20 указывала на наиболее низкий балл T20 последовательности в новой базе данных.

В данном изобретении "человеческое" антитело представляет собой антитело, балл человечности T20 которого составляет по меньшей мере 79% и более предпочтительно по меньшей мере 85%.

Способность антител против hSIRP α блокировать связывание с CD47

В некоторых вариантах реализации антитела против SIRP α или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению способны блокировать связывание SIRP α человека с CD47 человека. Способность блокировать связывание SIRP α человека с CD47 человека можно определить, применяя любой способ, известный в данной области. В одном варианте реализации способность антител блокировать связывание SIRP α человека с CD47 человека определяют, применяя анализ ELISA.

Способы получения антител и их антигенсвязывающих фрагментов.

Таким образом, в объем настоящего изобретения входят способы получения антитела против SIRP α или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, включающие культивирование клетки гибридомы, которая экспрессирует антитело или фрагмент, при условии, благоприятном для такой экспрессии, и необязательно выделение антитела или фрагмента из гибридомы и/или ростовой среды (например, культуральной среды).

Антитела против SIRP α , описанные в данном изобретении, также можно получить рекомбинантным способом (например, в системе экспрессии *E. coli*/T7, в системе экспрессии клетки млекопитающего или в системе экспрессии низших эукариот). В данном варианте реализации нуклеиновые кислоты, кодирующие иммуноглобулиновые молекулы антител согласно настоящему изобретению (например, V_H или V_L), можно встроить в плазмиду на основе pET и экспрессировать в системе *E. coli*/T7. Например, в объем настоящего изобретения входят способы экспрессии антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, или его иммуноглобулиновой цепи, в клетке-хозяине (например, бактериальной клетке-хозяине, такой как *E. coli*, такой как BL21 или BL21DE3), включающие экспрессию РНК-полимеразы T7 в клетке, которая также содержит полинуклеотид, кодирующий цепь иммуноглобулина, которая функционально связана с промотором T7. Например, в одном варианте реализации настоящего изобретения бактериальная клетка-хозяин, такая как *E. coli*, содержит полинуклеотид, кодирующий ген РНК-полимеразы T7, функционально связанный с промотором lac, и экспрессию полимеразы и указанной цепи индуцируют путем инкубации клетки-хозяина с IPTG (изопропил-бета-D-тиогалактопиранозидом).

Существует несколько способов, с помощью которых можно получить рекомбинантные антитела, которые известны в данной области. Один пример способа рекомбинантного получения антител описан в патенте США № 4816567.

Трансформацию можно осуществить с помощью любого известного способа внедрения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Способы внедрения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают опосредованную декстраном трансфекцию, преципитацию с фосфатом кальция, опосредованную полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, заключение полинуклеотида(ов) в липосомы, биолистическую инъекцию и непосредственную микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновых кислот можно внедрить в клетки млекопитающих с помощью вирусных векторов. Способы трансформации клеток хорошо известны в данной области. См., например, патенты США № 4399216; 4912040; 4740461 и 4959455.

Таким образом, в объем настоящего изобретения входят рекомбинантные способы получения анти-

тела против SIRP α или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, или его иммуноглобулиновой цепи, включающие введение полинуклеотида, кодирующего одну или более иммуноглобулиновых цепей антитела или фрагмента (например, тяжелую и/или легкую цепи иммуноглобулина); культивирование клетки-хозяина (например, CHO, или *Pichia*, или *Pichia pastoris*) при условии, благоприятном для такой экспрессии, и необязательно выделение антитела, или фрагмента, или цепи из клетки-хозяина и/или среды, в которой растили клетку-хозяина.

Антитела против SIRP α также можно синтезировать с помощью любого из способов, представленных в патенте США № 6331415.

Эукариотические и прокариотические клетки-хозяева, включая клетки млекопитающих в качестве хозяев для экспрессии антител, или фрагментов, или цепей иммуноглобулинов, описанных в данном изобретении, хорошо известны в данной области и включают многие иммортализованные линии клеток, доступные из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Такие линии клеток включают, среди прочих, клетки яичника китайского хомячка (CHO), NSO, клетки SP2, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомячка (ВНК), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Нер G2), клетки A549, клетки 3T3, клетки HEK-293 и множество других линий клеток. Клетки млекопитающих-хозяев включают клетки человека, мыши, крысы, собаки, обезьяны, свиньи, козы, крупного рогатого скота, лошади и хомяка. Особенно предпочтительные линии клеток выбирают путем определения линий клеток с высокими уровнями экспрессии. Другие линии клеток, которые можно применять, представляют собой линии клеток насекомого, таких как клетки Sf9, клетки амфибий, клетки бактерий, клетки растений и клетки грибов. Клетки грибов включают клетки дрожжей и филamentного гриба, включая, например,

Pichia pastoris, *Pichia*

finlandica, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces sp.*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces sp.*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium sp.*, *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrella patens* и *Neurospora crassa*. *Pichia sp.*, любой *Saccharomyces sp.*, *Hansenula polymorpha*, любой *Kluyveromyces sp.*, *Candida albicans*, любой *Aspergillus sp.*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, любой *Fusarium sp.*, *Yarrowia lipolytica* и *Neurospora crassa*.

Когда рекомбинантные векторы экспрессии, кодирующие тяжелую цепь или его антигенсвязывающую часть или фрагмент, и/или легкую цепь или ее антигенсвязывающий фрагмент, внедряют в клетки млекопитающих-хозяев, антитела получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного, чтобы позволить экспрессию антитела, или фрагмента, или цепи в клетках-хозяевах или секрецию в культуральную среду, в которой растили клеток-хозяев.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты и цепи иммуноглобулина можно извлечь из культуральной среды, применяя стандартные способы очистки белка. Кроме того, экспрессию антител и их антигенсвязывающих фрагментов и цепей иммуноглобулина согласно настоящему изобретению (или других полученных из них молекул) линиями клеток-продуцентов можно повысить, применяя множество известных методик. Например, система экспрессии гена глутаминсинтетазы (система GS) представляет собой обычный подход для повышения экспрессии при некоторых условиях. Система GS обсуждается целиком или частично в рамках Европейских патентов № 0216846, 0256055, и 0323997 и 0338841. Таким образом, в одном варианте реализации настоящего изобретения в клетках млекопитающих-хозяев (например, CHO) отсутствует ген глутаминсинтетазы, и их растят в отсутствие глутамин в среде, при этом, тем не менее, полинуклеотид, кодирующий цепь иммуноглобулина, содержит ген глутаминсинтетазы, который дополняет отсутствующий ген в клетке-хозяине.

В объем настоящего изобретения входят способы очистки антитела против SIRP α или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, включающие введение образца, содержащего антитело или фрагмент, в среду для очистки (например, катионообменную среду, анионообменную среду, среду гидрофобного обмена, аффинную среду для очистки (например, белок-A, белок-G, белок-A/G, белок-L)) и либо сбор очищенного антитела или фрагмента из фракции фильтрата указанного образца, который не связывается со средой; либо отбрасывание фракции фильтрата и элюирование связанного антитела или фрагмента из среды и сбор элюата. В одном варианте реализации настоящего изобретения среда находится в колонке, на которую наносят образец. В одном варианте реализации настоящего изобретения способ очистки осуществляют после рекомбинантной экспрессии антитела или фрагмента в клетке-хозяине, например, когда клетку-хозяина сначала лизируют и необязательно лизат очищают от нерастворимых материалов перед очисткой на среде.

Обычно, гликопротеины, полученные в конкретной линии клеток или трансгенном животном, будут иметь паттерн гликозилирования, свойственный для гликопротеинов, полученных в данной линии

клеток или трансгенном животном. Следовательно, конкретный паттерн гликозилирования антитела будет зависеть от конкретной линии клеток или трансгенного животного, применяемых для получения антитела. Тем не менее, все антитела, кодируемые молекулами нуклеиновых кислот, предложенными в данном изобретении, или включающие последовательности аминокислот, предложенные в данном изобретении, входят в объем настоящего изобретения независимо от паттерна гликозилирования, который может быть у указанных антител. Аналогично, в конкретных вариантах реализации антитела с паттерном гликозилирования, включающим только нефукозилированные N-гликаны, могут быть предпочтительными, так как было показано, что данные антитела обычно проявляют большую эффективность, чем их фукозилированные аналоги как *in vitro*, так и *in vivo* (см., например, Shinkawa и др., J. Biol. Chem. 278: 3466-3473 (2003); патенты США № 6946292 и 7214775). Данные антитела с нефукозилированными N-гликанами, вероятно, не будут иммуногенными, так как их углеводные структуры являются нормальным компонентом в популяции, которая присутствует в IgG сыворотки человека.

В объем настоящего изобретения входят биспецифические и бифункциональные антитела и антигенсвязывающие фрагменты со специфичностью связывания с SIRP α и другим антигеном, таким как, например, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD30, CD33, CD38, CD44, CD52, CD56, CD70, CD96, CD97, CD99, CD117, CD123, c-Met, CEA, EGFR, EpCAM, HER2, HER3, PSMA, PTHR2, мезотелин, PD-1, PD-L1, TIM3, и способы их применения. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, содержащее две различные пары тяжелой/легкой цепей и два различных сайта связывания. Биспецифические антитела можно получить с помощью различных способов, включая слияние гибридом или соединение фрагментов Fab'. См., например, Songsivilai, и др., (1990) Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321, Kostelny, и др., (1992) J Immunol. 148:1547-1553. Кроме того, биспецифические антитела можно получить в виде "диател" (Holliger, и др., (1993) PNAS USA 90:6444-6448) или "Janusin" (Traunecker, и др., (1991) EMBOJ. 10:3655-3659 и Traunecker, и др., (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7:51-52). В объем настоящего изобретения входят "дуотела", которые представляют собой биспецифические антитела с нормальными структурами IgG (Labrijn и др., 2013, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110 (13): 5145-5150).

В объем настоящего изобретения дополнительно входят антигенсвязывающие SIRP α фрагменты антител против SIRP α , описанных в данном изобретении. Фрагменты антитела включают фрагменты F(ab)₂, которые можно получить путем ферментативного расщепления IgG, например, пепсином. Фрагменты Fab можно получить, например, путем восстановления F(ab)₂ с помощью дитиотреитола или меркаптоэтиламина.

Иммуноглобулины можно распределить по различным классам в зависимости от последовательностей аминокислот константного домена их тяжелых цепей. В некоторых вариантах реализации различные константные домены можно присоединить к гуманизированным областям V_L и V_H, полученным из CDR, предложенных в данном изобретении. Существует по меньшей мере пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и несколько из них можно дополнительно подразделить на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4; IgA1 и IgA2. В объем настоящего изобретения входят антитела и антигенсвязывающие фрагменты любого из данных классов или подклассов антител.

В одном варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи, например, человеческую константную область, такую как человеческая константная область тяжелой цепи γ 1, γ 2, γ 3 или γ 4 или ее вариант. В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область легкой цепи, например, человеческую константную область легкой цепи, такую как область легкой цепи лямбда или каппа человека или ее вариант. В качестве примера, но не ограничения, человеческая константная область тяжелой цепи может представлять собой γ 4 и человеческая константная область легкой цепи может представлять собой каппа. В альтернативном варианте реализации Fc-область антитела представляет собой γ 4 с мутацией Ser228Pro (Schuurman, J и др., Mol. Immunol. 38: 1-8, 2001).

В одном варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи подтипа IgG1. В одном варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи подтипа IgG2. В одном варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи подтипа IgG4.

Конструирование антител.

Дополнительно включены варианты реализации, в которых антитела против SIRP α и их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой сконструированные антитела с введенными модификациями в каркасных остатках внутри вариабельных доменов антитела, например, чтобы улучшить свойства антитела или фрагмента. Обычно, такие модификации каркаса вводят, чтобы снизить иммуногенность антитела или фрагмента. Это обычно осуществляют путем замены не относящихся к CDR остатков в вариабельных доменах (т.е. каркасных остатков) в исходном (например, из грызуна) антителе или фрагменте на аналогичные остатки из иммунного репертуара вида, в котором антитело будут применять, например, на человеческие остатки в случае лекарств для человека. Такое антитело или фрагмент называют

"гуманизированным" антителом или фрагментом. В некоторых случаях необходимо повысить аффинность или изменить специфичность сконструированного (например, гуманизированного) антитела. Один подход состоит в мутировании одного или более каркасных остатков на соответствующую зародышевую последовательность. В частности, антитело или фрагмент, который подвергли соматической мутации, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от зародышевой последовательности, из которой получено антитело. Такие остатки можно идентифицировать путем сравнения последовательностей каркаса антитела или фрагмента с зародышевыми последовательностями, из которых получено антитело или фрагмент. Другой подход состоит в возвращении к исходному остатку (например, грызуна) в одном или более положениях сконструированного (например, гуманизированного) антитела, например, чтобы восстановить аффинность связывания, которая могла быть утрачена в процессе замены каркасных остатков (см., например, патент США № 5693762, патент США № 5585089 и патент США № 5530101).

В некоторых вариантах реализации антитела против SIRP α и их антигенсвязывающие фрагменты сконструированы (например, гуманизированы), чтобы они содержали модификации в каркасе и/или участках CDR для улучшения их свойств. Такие сконструированные изменения могут быть основаны на молекулярном моделировании. Можно сконструировать молекулярную модель варибельной области последовательности исходного (не относящегося к человеку) антитела, чтобы понять структурные особенности антитела, и использовать ее для определения потенциальных областей на антителе, которые могут взаимодействовать с антигеном. Общеизвестные участки CDR основаны на выравнивании последовательностей иммуноглобулинов и идентификации варибельных областей. Kabat и др., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. Kabat, и др.; Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэриленд; 5^{ое} изд.; публикация NIH № 91-3242; Kabat (1978) *Adv. Prot. Chem.* 32:1-75; Kabat и др., (1977) *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616. Chothia и коллеги тщательно исследовали конформации петель в кристаллических структурах антител и предположили наличие гиперварибельных петель. Chothia, и др., (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917 или Chothia, и др., (1989) *Nature* 342:878-883. Существуют вариации между участками, классифицируемыми как "CDR" и как "гиперварибельные петли". В более поздних исследованиях (Raghunathan и др., (2012) *J. Mol. Recog.* 25, 3, 103-113) анализировали несколько кристаллических комплексов антитело-антиген и наблюдали, что антигенсвязывающие области в антителах не обязательно строго соответствуют остаткам "CDR" или "гиперварибельным" петлям. Молекулярную модель варибельной области не относящегося к человеку антитела можно использовать в качестве опорной при выборе участков, которые потенциально могут связываться с антигеном. На практике потенциальные антигенсвязывающие области, выявленные на основании модели, отличаются от обычных "CDR" или "гиперварибельных" петель. Для молекулярного моделирования можно применять коммерчески доступное научное программное обеспечение, такое как Discovery Studio (BIOVIA, Dassault Systems)). Человеческие каркасные остатки можно выбрать на основании лучшего совпадения с не относящейся к человеку последовательностью как в каркасных областях, так и в участках CDR. Для FR4 (каркаса 4) в VH сравнивают участки VJ зародышевых последовательностей человека с соответствующими не относящимися к человеку участками. В случае FR4 (каркаса 4) в VL сравнивают участки J-каппа и J-лямбда зародышевых последовательностей человека с соответствующими не относящимися к человеку участками. После обнаружения подходящих каркасов человека CDR прививают на выбранные каркасы человека. В некоторых случаях некоторые остатки на границе VL-VH можно сохранить такими, как в не относящейся к человеку (исходной) последовательности. Молекулярные модели также можно применять для идентификации остатков, которые потенциально могут изменять конформации CDR и, следовательно, связывание с антигеном. В некоторых случаях, данные остатки сохраняют такими, как в не относящейся к человеку (исходной) последовательности. Молекулярные модели также можно применять, чтобы определить выставленные в растворитель аминокислоты, которые могут привести к нежелательным эффектам, таким как гликозилирование, дезаминирование и окисление. Фильтры возможности разработки можно ввести ранее на этапе разработки, чтобы исключить/минимизировать такие потенциальные проблемы.

Другой тип модификации каркаса включает мутирование одного или более остатков внутри каркасной области, или даже внутри одного или более участков CDR, чтобы удалить Т-клеточные эпитопы и тем самым снизить потенциальную иммуногенность антитела. Данный подход также называют "деиммунизацией", и он описан более подробно в патенте США № 7125689.

В конкретных вариантах реализации потребуется заменить некоторые аминокислоты, содержащиеся выставленные боковые цепи, на другие аминокислотные остатки, чтобы обеспечить большую химическую стабильность конечного антитела, чтобы избежать дезаминирования или изомеризации. Дезаминирование аспарагина может происходить в последовательностях NG, DG, NG, NS, NA, NT, QG или QS и приводить к образованию остатка изоаспарагиновой кислоты, который вводит изгиб в полипептидную цепь и снижает ее стабильность (эффект изоаспарагиновой кислоты). Изомеризация может происходить в последовательностях DG, DS, DA или DT. В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему описанию не содержат сайты дезаминирования или изомеризма аспарагина.

Например, остаток аспарагина (Asn) можно заменить на Gln или Ala, чтобы уменьшить возможность образования изоаспартата в каких-либо последовательностях Asn-Gly, особенно внутри CDR. Сходная проблема может происходить в последовательности Asp-Gly. Reissner и Aswad (2003) *Cell. Mol.*

Life Sci. 60:1281. Образование изоаспартата может ослаблять или полностью подавлять связывание антитела с целевым антигеном. См. Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731 в 734. В одном варианте реализации аспарагин заменяют на глутамин (Gln). Также может потребоваться изменить аминокислоту, расположенную рядом с остатком аспарагина (Asn) или глутамина (Gln), чтобы снизить вероятность дезаминирования, которое происходит с большей частотой, когда малые аминокислоты встречаются рядом с аспарагином или глутамином. См., Bischoff & Kolbe (1994) J. Chromatog. 662:261. Кроме того, любые остатки метионина (обычно выставленные в растворитель Met) в CDR можно заменить на Lys, Leu, Ala или Phe или другие аминокислоты, чтобы уменьшить вероятность окисления серы в метионине, что может уменьшить аффинность связывания антигена, а также способствует молекулярной гетерогенности в конечном препарате антитела. Id. Кроме того, чтобы предотвратить или минимизировать потенциально расщепляющиеся пептидные связи Asn-Pro, может быть желательным изменить любые комбинации Asn-Pro, обнаруженные в CDR, на Gln-Pro, Ala-Pro или Asn-Al. Антитела с такими заменами затем подвергают скринингу, чтобы удостовериться в том, что замены не снижают аффинность или специфичность антитела по отношению к SIRP α , или другую желательную биологическую активность до неприемлемых уровней.

Таблица 2
Типичные стабилизирующие CDR варианты

Остаток CDR	Стабилизирующий вариант последовательности
Asn-Gly (N-G)	Gln-Gly, Ala-Gly, или Asn-Ala (Q-G), (A-G) или (N-A)
Asp-Gly (D-G)	Glu-Gly, Ala-Gly или Asp-Ala (E-G), (A-G) или (D-A)
Met (M)	Lys, Leu, Ala, или Phe (K), (L), (A) или (F)
Asn (N)	Gln или Ala (Q) или (A)
Asn-Pro (N-P)	Gln-Pro, Ala-Pro или Asn-Ala (Q-P), (A-P) или (N-A)

Другой тип модификации каркаса включает мутирование одного или более остатков внутри каркасных областей, чтобы предотвратить агрегацию. Риск агрегации антитела можно оценить, применяя пространственную склонность к агрегации. См., Chennamsetty, N et al. (2010) J. Phys. Chem. 114, 6614-6624. В указанном способе необходимо рассчитать поверхность, доступную растворителю (ПДР), для каждого атома. Показатель молекулярной агрегации затем рассчитывают как сумму всех показателей для атомов. Для данного радиуса и размера молекулы это приблизительный критерий ее совокупной склонности к агрегации. Остатки с высоким показателем агрегации заменяют на остатки с более низким показателем (например, более гидрофильные аминокислоты).

Конструирование Fc-области антител.

Антитела (например, гуманизированные антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, также можно сконструировать таким образом, чтобы они содержали модификации внутри Fc-области, как правило, чтобы изменить одно или более свойств антитела, таких как время полувыведения в сыворотке крови, фиксация комплемента, связывание с Fc-рецептором и/или эффекторная функция (например, антиген-зависимая опосредованная клетками цитотоксичность). Более того, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, можно химически модифицировать (например, к антителу можно присоединить одну или более химических молекул) или модифицировать, чтобы изменить их гликозилирование, чтобы снова изменить одно или более свойств антитела или фрагмента. Каждый из данных вариантов реализации более подробно описан ниже. Нумерация остатков в Fc-области соответствует EU-индексу по Кабату.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, также включают антитела и фрагменты с модифицированными (или заблокированными) Fc-областями, чтобы получить измененные эффекторные функции. См., например, патент США номер 5624821; WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702. Такие модификации можно использовать для усиления или подавления различных реакций иммунной системы с возможными полезными эффектами для диагностики и терапии. Изменения Fc-области включают изменения аминокислот (замены, делеции и вставки), гликозилирование или дегликозилирование, и добавление множества Fc-областей. Изменения Fc также могут изменить время полувыведения антител в терапевтических антителах, позволяя менее частое введение дозы и, следовательно, большее удобство и применение меньшего количества материала. См. Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731 на стр. 734-35.

В одном варианте реализации антитела или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настояще-

му изобретению представляет собой антитело или фрагмент изоформа IgG4, содержащий мутацию серина на пролин в положении, соответствующем положению 228 (S228P; EU-индекс; SEQ ID NO: 66) в шарнирной области константной области тяжелой цепи. Сообщали, что данная мутация нарушает гетерогенность дисульфидных мостиков между тяжелыми цепями в шарнирной области (Angal и др. (1993). *Mol. Immunol.* 30:105-108; положение 241 на основании системы нумерации по Кабату).

В одном варианте реализации настоящего изобретения шарнирная область СН1 модифицирована таким образом, что количество остатков цистеина в шарнирной области увеличено или уменьшено. Данный подход дополнительно описан в патенте США № 5677425. Количество остатков цистеина в шарнирной области СН1 изменяют, например, чтобы облегчить сборку легкой и тяжелой цепей или чтобы повысить или снизить стабильность антитела.

В другом варианте реализации шарнирную область Fc антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению мутируют, чтобы уменьшить биологическое время полувыведения антитела или фрагмента. В частности, одну или более мутаций аминокислот вводят в поверхность раздела между доменами C_H2-C_H3 шарнирного фрагмента Fc, так что ослабляется связывание антитела или фрагмента со стафилококковым белком А (SpA) по сравнению со связыванием SpA нативным шарнирным доменом Fc. Данный подход более подробно описан в патенте США № 6165745.

В другом варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению модифицируют, чтобы увеличить его биологическое время полувыведения. Возможны различные подходы. Например, можно ввести одну или более из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375. В качестве альтернативы, чтобы увеличить его биологическое время полувыведения, антитело можно изменить внутри области СН1 или CL, чтобы оно содержало эпитоп связывания рецептора реутилизации, полученный из двух петель домена C_H2 Fc-области IgG, как описано в патентах США № 5869046 и 6121022.

В других дополнительных вариантах реализации Fc-область изменяют путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка на отличный аминокислотный остаток, чтобы изменить эффекторную(ые) функцию(и) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, можно заменить на отличный аминокислотный остаток, так что у антитела изменится аффинность к эффекторному лиганду и сохранится способность связывать антиген исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменена, может представлять собой, например, Fc-рецептор или компонент компонента C1. Данный подход более подробно описан в патентах США № 5624821 и 5648260.

В другом примере одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322, можно заменить на отличный аминокислотный остаток, так что у антитела изменится связывание C1q и/или уменьшится или нарушится комплемент-зависимая цитотоксичность (КЗЦ). Данный подход более подробно описан в патенте США № 6194551.

В другом примере один или более аминокислотных остатков в положениях аминокислот 231 и 239 изменены, чтобы тем самым изменить способность антитела фиксировать комплемент. Данный подход описан дополнительно в публикации PCT WO 94/29351.

Белки согласно настоящему изобретению, которые предпочтительно представляют собой антитела и наиболее предпочтительно антитела IgG или их фрагменты, могут обладать измененными (например, по сравнению с немодифицированным антителом) свойствами связывания FcγR (примеры свойств связывания включают, но не ограничены перечисленными: специфичность связывания, равновесную константу диссоциации (K_D), скорости диссоциации и ассоциации (k_{off} и k_{on}, соответственно), аффинность и/или авидность связывания), и некоторые изменения более или менее желательны. В данной области известно, что равновесную константу диссоциации (K_D) определяют как k_{off}/k_{on}, и K_a представляет собой величину, обратную K_D.

Аффинности и свойства связывания Fc-области с ее лигандом можно определить с помощью различных способов анализа *in vitro* (анализов на основе биохимии или иммунологии), известных в данной области для определения взаимодействий Fc-FcγR, т.е. специфического связывания Fc-области с FcγR, включая, но не ограничиваясь равновесными способами (например, твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA) или радиоиммуноанализом (RIA)), или кинетическими анализами (например, анализом BIACORE®, Octet® или KinExa®), и другими способами, такими как непрямые анализы связывания, анализы конкурентного ингибирования, резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), электрофорез и хроматография в геле (например, гель-фильтрация). В данных и других способах может использоваться метка на одном или более исследуемых компонентах и/или могут использоваться различные способы детектирования, включая, но не ограничиваясь перечисленными: хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки.

В некоторых вариантах реализации белки согласно настоящему изобретению связываются с одним или более FcγR человека, выбранными из группы, состоящей из FcγRI, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA-F158 и FcγRIIIA-V158, с аффинностью, по меньшей мере в 10 раз, предпочтительно по меньшей мере в 30 раз и более предпочтительно по меньшей мере в 100 раз меньшей, чем эквивалентный белок, содержащий Fc-

область константного домена тяжелой цепи IgG1 человека дикого типа (SEQ ID NO: 119) или Fc-область константного домена тяжелой цепи IgG4 человека дикого типа (SEQ ID NO: 66).

В различных вариантах реализации белки согласно настоящему изобретению содержат Fc-область иммуноглобулина, содержащую область C2 иммуноглобулина и область C3 иммуноглобулина и шарнирную область иммуноглобулина. В качестве примера, Fc-область иммуноглобулина может представлять собой Fc-область IgG, Fc-область IgE или Fc-область IgA. В некоторых предпочтительных вариантах реализации указанный белок содержит две Fc-области иммуноглобулина, каждая Fc-область иммуноглобулина содержит область C2 иммуноглобулина и область C3 иммуноглобулина и шарнирную область иммуноглобулина, при этом шарнирная область одной из Fc-областей иммуноглобулина связана с шарнирной областью другой Fc-области иммуноглобулина с образованием димерной структуры Fc. В наиболее предпочтительном случае такой белок представляет собой человеческий или гуманизированный белок IgG.

В некоторых вариантах реализации белки согласно настоящему изобретению включают мутированную Fc-область IgG4, и предпочтительно белок представляет собой IgG, содержащий две мутированные Fc-области IgG4, образующие димерную структуру Fc. В качестве примера, мутированная Fc-область IgG4 может содержать одну из мутаций, или комбинаций мутаций, перечисленных в табл. 3. Система нумерации константной области, используемая в данной таблице, соответствует EU-индексу, описанному в Kabat и др. (1991, публикация NIH 91-3242, Национальная служба технической информации, Спрингфилд, Вирджиния). В таблице первая буква и число представляет собой немодифицированную аминокислоту и ее положение и вторая буква представляет замещающую аминокислоту в указанном положении. Для тех ячеек, которые содержат комбинации более чем одной мутации, каждая мутация в указанной комбинации отделена символом "/".

Таблица 3

N297Q	L235E	N297Q/L235E
F234A	Q268A	F234A/L235A/G237A/P238A
F234A/L235A/ΔG236 /G237A/P238A	F234A/L235A/G237A /P238A/Q268A	F234A/L235A/ΔG236/G237A /P238A/Q268A
F234A/L235A	L235E/P329G	L235A/G237A/E318A
F234A/L235A/G237A /P238S	F234A/L235A/ΔG236 /G237A/P238S	F234A/L235A/G237A /P238S/Q268A
F234A/L235A/ΔG236 /G237A/P238S/Q268A		

В некоторых вариантах реализации белки согласно настоящему изобретению включают мутированную Fc-область IgG1, и предпочтительно белок представляет собой IgG, содержащий две мутированные Fc-области IgG1, образующие димерную структуру Fc. В качестве примера, мутированная Fc-область IgG1 может содержать одну из мутаций, перечисленных в табл. 4. Система нумерации константной области, используемая в данной таблице, соответствует EU-индексу, описанному в Kabat и др. (1991, публикация NIH 91-3242, Национальная служба технической информации, Спрингфилд, Вирджиния). В таблице первая буква и число представляет собой немодифицированную аминокислоту и ее положение и вторая буква представляет замещающую аминокислоту в указанном положении.

Таблица 4

K222Y	P232K	A231K
E233N	E233Q	E233R
E233S	E233T	E233H
E233A	E233V	E233L
E233F	E233M	E233Y
E233W	E233G	L234D
L234E	L234N	L234Q
L234T	L234H	L234F
L234K	L234R	L234S
L234A	L234M	L234V
L235E	L235T	L235F
L235K	L235R	L235A
L235M	L235W	L235N
L235Q	L235H	L235V
G236A	G236N	G236R
G236H	G236L	G236F
G236P	G237A	G237E
G237N	G237Q	G237K
G237R	G237S	G237T
G237H	G237L	G237I
G237F	G237M	G237Y
G237P	P238K	P238N
P238R	P238S	P238T
P238Y	P238G	P238A
S239A	S239N	S239F
S239K	S239R	S239V
S239W	S239P	S239H
S239Y	D249H	V240A
F241W	F241L	F243W
F243L	F243E	P244H
P245A	P247V	P247G
V253I	V263I	V263T
V263M	V264D	V264E
V264K	V264F	V264M
V264H	V264W	V264G
V264Q	V264A	V264L
D265A	D265E	D265Q
D265S	D265H	D265V
D265L	D265F	D265M
D265Y	D265N	D265G

043743

V266T	V266M	V266A
S267G	S267H	S267N
S267P	S267R	S267T
S267F	S267W	E269A
E269K	E269S	E269V
E269F	E269I	E269M
E269W	E269H	E269T
E269L	E269N	E269Y
E269R	E269P	E269G
D270A	D270N	D270E
D270Q	D270T	D270H
D270R	D270S	D270L
D270I	D270F	D270W
D270P	D270G	P271H
P271Q	P271K	P271R
P271S	P271V	P271F
P271W	D280L	D280W
D280P	E293F	E294A
E293Y	E294K	E294R
E294S	E294V	E294L
E294F	Q295A	Q295W
Q295P	Q295G	Y296E
Y296Q	Y296D	Y296N
Y296S	Y296T	Y296L
Y296I	Y296A	Y296V
Y296M	N297S	N297D
N297Q	N297A	S298T
S298N	S298K	S298R
T299A	T299H	T299D
T299E	T299N	T299Q
T299K	T299R	T299I
T299F	T299M	T299Y
T299W	T299S	T299V
T299P	T299G	Y300E
Y300K	Y300R	Y300S
Y300P	Y300W	V303A
V303D	W313F	E318A
E318V	E318Q	E318H
E318L	E318Y	K320A
K322A	K322E	N325A

N325V	N325H	N325K
N325Y	N325W	N325P
N325G	N325Q	N325D
N325E	N325L	N325I
A327Q	A327E	A327N
A327L	A327I	A327F
A327W	L328N	L328F
L328H	L328R	L328T
L328V	L328I	L328P
L328M	L328E	L328A
P329A	P329F	P329D
P329N	P329Q	P329K
P329S	P329T	P329H
P329V	P329L	P329M
P329Y	P329W	P329G
P329R	A330L	A330R
A330P	A330T	A330V
A330F	A330H	P331A
P331S	P331N	P331E
I332K	I332N	I332Q
I332T	I332H	I332Y
I332A	I332R	E333N
E333R	I336E	I336Y
S337H		

В некоторых вариантах реализации мутированная Fc-область IgG1 может содержать одну из комбинаций мутаций, перечисленных в табл. 5. Система нумерации константной области, используемая в данной таблице, соответствует EU-индексу, описанному в Kabat и др. (1991, публикация NIH 91-3242, Национальная служба технической информации, Спрингфилд, Вирджиния). В таблице первая буква и число представляет собой немодифицированную аминокислоту и ее положение и вторая буква представляет замещающую аминокислоту в указанном положении. Для каждой из комбинаций более чем одной мутации каждая мутация в указанной комбинации отделена символом "/" и делеции обозначены символом "Δ".

Таблица 5

C220S/C226S/C229S/P238S	C226S/C229S/E233P/L234V/ L235A	E233P/L234V/L235A
E233P/L234V/L235A/ΔG236	E233P/L234V/L235A/ΔG236/ A327G/A330S/P331S	L234A/L235A
L235A/G237A	L235A/G237A/E318S/K320S/ K322S	L235A/G237A/P331A
L234F/L235E	L234F/L235E/D265A	L234F/L235E/D265A/

		N297Q/P331S
L234F/L235E/N297Q	L234F/L235E/P329G	L234F/L235A/K322Q/ M252Y/S254T/T256E
L234F/L235Q/K322Q/M252Y/ S254T/T256E	L234F/L235Q/P331G/M252Y/ S254T/T256E	G236R/L328R
S239D/D265I/N297D/I332E	S239D/D265L/N297D/I332E	S239D/D265F/N297D/ I332E
S239D/D265Y/N297D/I332E	S239D/D265T/N297D/I332E	S239D/N297D/A330Y/ I332E
S239D/F241S/F243H/V262T/V26 4T/N297D/K326E/I332E	V264E/N297D/I332E	D265A/P331S
D265A/N297Q	N297D/D265Y/T299L/I332E	N297D/D265Y/I332E
N297D/I332E/Y296D	N297D/I332E	N297D/I332E/Y296E
N297D/I332E/Y296N	N297D/I332E/Y296Q	N297D/I332E/Y296H
N297D/I332E/Y296T	N297D/I332E/T299V	N297D/I332E/T299I
N297D/I332E/T299L	N297D/I332E/T299F	N297D/I332E/T299H
N297D/I332E/T299E	N297D/I332E/A330Y	N297D/I332E/S298A/ A330Y
N297E/D265F/I332E	N297E/I332E	F241E/F243R/V262E/ V264R
F241E/F243Q/V262T/V264E	F241L/F243L/V262I/V264I	F241W/F243W
F241W/F243W/V262A/V264A	F241L/V262I	F243L/V262I/V264W
F241Y/F243Y/V262T/V264T	F241E/F243R/V262E/V264R	F241E/F243Q/V262T/V264E
F241R/F243Q/V262T/V264R	F241E/F243Y/V262T/V264R	P244H/P245A/P247V
F241E/F243R/V262E/V264R/I332 E	F241E/F243Y/V262T/V264R	F241E/F243Y/V262T/ V264R/I332E
S239E/D265G	S239E/D265N	S239E/D265Q
M252Y/S254T/T256E	S267Q/A327S	S267L/A327S
N297S/I332E	S239N/I332N	S239N/I332Q
S239Q/I332N	S239Q/I332Q	S298N/Y300S
S298N/T299A/Y300S	N297Q/S298N/Y300S	E318S/K320S/K322S
E318S/K320S/K322S/P311A	L328E/I332E	L328N/I332E
L234A/L235A/G237A/P238A /H268A/A330S/P331S	L234A/L235A/G237A/P238S/H26 8A/A330S/P331S	L234A/L235A/G237A/P238A/H26 8A/A330S/P331S
L328Q/I332E	L328H/I332E	

В некоторых вариантах реализации белки согласно настоящему изобретению содержат Fc-область IgG2 дикого типа или мутированную Fc-область IgG2, и предпочтительно белок представляет собой IgG, содержащий две дикого типа или мутированные Fc-области IgG2 для образования димерной структуры Fc. Мутированная Fc-область IgG2 может содержать одну из мутаций или комбинаций мутаций, перечисленных в табл. 6. Система нумерации константной области, используемая в данной таблице, соответствует EU-индексу, описанному в Kabat и др. (1991, публикация NIH 91-3242, Национальная служба технической информации, Спрингфилд, Вирджиния). В таблице первая буква и число представляет собой немодифицированную аминокислоту и ее положение и вторая буква представляет замещающую аминокислоту в указанном положении. Для тех ячеек, которые содержат комбинации более чем одной мутации, каждая мутация в указанной комбинации отделена символом "/".

Таблица 6

V234A	G237A	A235E/G237A
V234A/A235E/G237A	V234A/G237A	V234A/G237A/P238S
H268Q/V309L/A330S/P331S	V234A/G237A/H268A/V309L/ A330S/P331S	V234A/G237A/H268Q/V309L/ /A330S/P331S
V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S	P233S/V234A/G237A/P238S	P233S/V234A/G237A/H268A/ V309L/A330S/P331S
P233S/V234A/G237A/H268Q/V309L/A330S/P331S	P233S/V234A/G237A/P238S/ H268A/V309L/A330S/P331S	

Получение антител с модифицированным гликозилированием.

В еще одном варианте реализации антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению содержат конкретный паттерн гликозилирования. Например, можно получить афукозилированное или агликозилированное антитело или фрагмент (т.е. в антителе отсутствует фукоза или гликозилирование, соответственно). Паттерн гликозилирования антитела или фрагмента можно изменить, чтобы, например, повысить аффинность или авидность антитела или фрагмента к антигену SIRP α . Такие модификации можно осуществить, например, путем изменения одного или более сайтов гликозилирования внутри последовательности антитела или фрагмента. Например, можно осуществить одну или более замен аминокислот, которые приведут к удалению одного или более сайтов гликозилирования каркаса вариабельной области, чтобы тем самым предотвратить гликозилирование в данном сайте. Такое дегликозилирование может повысить аффинность или авидность антитела или фрагмента к антигену. См., например, патенты США № 5714350 и 6350861.

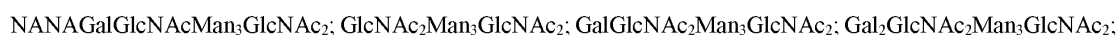
Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, могут дополнительно включать антитела, полученные в клетках-хозяевах из низших эукариот, в частности, клетки-хозяева из грибов, таких как дрожжи и мицелиальные грибы, подвергали генетической инженерии, чтобы получить гликопротеины с паттернами гликозилирования, подобными таковым у млекопитающего или человека (см., например, Choi и др., (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 5022-5027; Hamilton и др., (2003) Science 301: 1244-1246; Hamilton и др., (2006) Science 313: 1441-1443; Nett и др., Yeast 28(3):237-52 (2011); Hamilton и др., Curr Opin Biotechnol. 18(5): 387-92 (2007)). Особым преимуществом данных генетически модифицированных клеток-хозяев над применяемыми в настоящее время линиями клеток млекопитающего является возможность контролировать профиль гликозилирования гликопротеинов, которые получены в указанных клетках, так что можно получить композиции гликопротеинов, в которых преобладает конкретная структура N-гликанов (см., например, патент США № 7029872 и патент США № 7449308). Данные генетически модифицированные клетки-хозяева применяли для получения антител, которые преимущественно содержат конкретные структуры N-гликанов (см., например, Li и др., (2006) Nat. Biotechnol. 24: 210-215).

В конкретных вариантах реализации антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, дополнительно включают те, которые получены в клетках-хозяевах из низших эукариот и которые содержат фукозилированные и нефукозилированные гибридные и сложные N-гликаны, включая разделенные и многоантенные виды, включая, но не ограничиваясь такими N-гликанами, как GlcNAc₍₁₋₄₎Man₃GlcNAc₂; Gal₍₁₋₄₎GlcNAc₍₁₋₄₎Man₃GlcNAc₂; NANA₍₁₋₄₎Gal₍₁₋₄₎GlcNAc₍₁₋₄₎Man₃GlcNAc₂.

В конкретных вариантах реализации антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в данном изобретении, могут включать антитела или фрагменты, содержащие по меньшей мере один гибридный N-гликан, выбранный из группы, состоящей из GlcNAcMan₅GlcNAc₂; GalGlcNAcMan₅GlcNAc₂; и NANAGlcNAcMan₅GlcNAc₂.

В конкретных аспектах гибридный N-гликан является преобладающим видом N-гликана в композиции.

В конкретных вариантах реализации антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в данном изобретении, включают антитела и фрагменты, содержащие по меньшей мере один сложный N-гликан, выбранный из группы, состоящей из

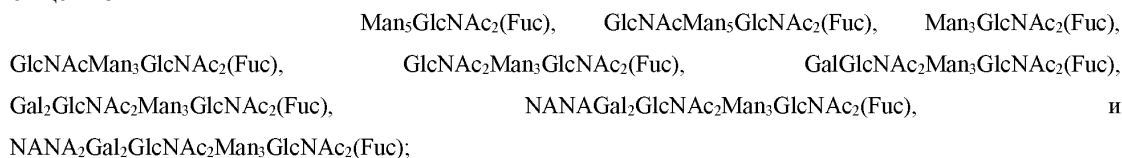


В конкретных аспектах сложный N-гликан является преобладающим видом N-гликана в составе. В дополнительных аспектах сложный N-гликан представляет собой конкретный вид N-гликана, который содержит в составе приблизительно 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% сложных N-гликанов. В одном варианте реализации антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в данном изобретении, включают сложные N-гликаны, в которых по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% сложных N-гликанов включают структуру NANAGal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂, при этом данная структура афукозилирована. Такие структуры можно получить, например, в сконструированных

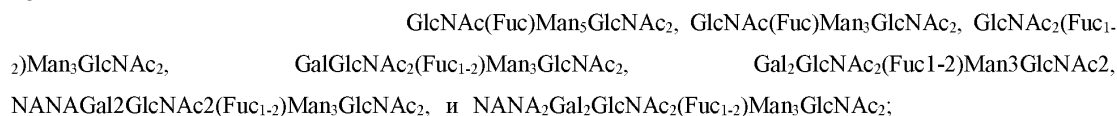
клетках-хозяевах *Pichia pastoris*.

В конкретных вариантах реализации N-гликан фукозилирован. Как правило, фукоза находится в $\alpha 1,3$ -связи с GlcNAc на восстанавливающем конце N-гликана, в $\alpha 1,6$ -связи с GlcNAc на восстанавливающем конце N-гликана, в $\alpha 1,2$ -связи с Gal на невосстанавливающем конце N-гликана, в $\alpha 1,3$ -связи с GlcNAc на невосстанавливающем конце N-гликана, или в $\alpha 1,4$ -связи с GlcNAc на невосстанавливающем конце N-гликана.

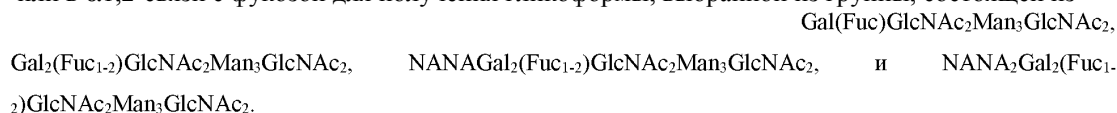
Следовательно, в конкретных из описанных выше аспектов композиций гликопротеинов гликоформа находится в $\alpha 1,3$ -связи или $\alpha 1,6$ -связи с фукозой для получения гликоформы, выбранной из группы, состоящей из



в $\alpha 1,3$ -связи или $\alpha 1,4$ -связи с фукозой для получения гликоформы, выбранной из группы, состоящей из



или в $\alpha 1,2$ -связи с фукозой для получения гликоформы, выбранной из группы, состоящей из



В дополнительных аспектах антитела (например, гуманизированные антитела) или их антигенсвязывающие фрагменты содержат N-гликаны с высоким содержанием маннозы, включая, но не ограничиваясь перечисленными: $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$, или N-гликаны, которые состоят из структуры N-гликана $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$.

В дополнительных к описанным выше аспектам сложные N-гликаны дополнительно включают фукозилированные и нефукозилированные разделенные и многоантенные виды.

В данном изобретении термины "N-гликан" и "гликоформа" используют взаимозаменяемо, и они относятся к N-связанному олигосахариду, например, такому, который присоединен с помощью аспарагин-N-ацетилглюкозаминовой связи к остатку аспарагина полипептида. N-связанные гликопротеины содержат остаток N-ацетилглюкозамина, связанный с азотом амида остатка аспарагина в белке. Преобладающие сахара, обнаруженные на гликопротеинах, представляют собой глюкозу, галактозу, маннозу, фукозу, N-ацетилгалактозамин (GalNAc), N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) и сиаловую кислоту (например, N-ацетилнейраминную кислоту (NANA)). Процессинг сахарных групп происходит котрансляционно в просвете эндоплазматического ретикулума (ЭР) и продолжается посттрансляционно в аппарате Гольджи для N-связанных гликопротеинов.

N-гликаны содержат общую пентасахаридную сердцевину $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ("Man" относится к маннозе; "Glc" относится к глюкозе и "NAc" относится к N-ацетилю; GlcNAc относится к N-ацетилглюкозамину). Обычно, в структурах N-гликанов невосстанавливающий конец находится слева и восстанавливающий конец находится справа. Восстанавливающий конец N-гликана представляет собой конец, который присоединен к остатку Asn, содержащему сайт гликозилирования на белке. N-гликаны отличаются по количеству ветвей (антенн), содержащих периферические сахара (например, GlcNAc, галактозу, фукозу и сиаловую кислоту), которые добавлены в сердцевинную структуру $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ("Man3"), которую также называют "триманнозной сердцевиной", "пентасахаридной сердцевиной" или "пауциманнозной сердцевиной". N-гликаны классифицируют в соответствии с их разветвленными составляющими (например, высокоманнозные, сложные или гибридные). "Высокоманнозный" тип N-гликана содержит пять или более остатков маннозы. "Сложный" тип N-гликана обычно содержит по меньшей мере один GlcNAc, присоединенный к 1,3-маннозному плечу, и по меньшей мере один GlcNAc, присоединенный к 1,6-маннозному плечу "триманнозной" сердцевины. Сложные N-гликаны также могут содержать остатки галактозы ("Gal") или N-ацетилгалактозамина ("GalNAc"), которые необязательно модифицированы сиаловой кислотой или ее производными (например, "NANA" или "NeuAc", где "Neu" относится к нейраминной кислоте и "Ac" относится к ацетилю). Сложные N-гликаны также могут содержать внутрицепочечные замены, включающие "разделяющий" GlcNAc и сердцевинную фукозу ("Fuc"). Сложные N-гликаны также могут содержать множество антенн на "триманнозной сердцевины", их часто называют "многоантенными гликанами". "Гибридный" N-гликан содержит по меньшей мере один GlcNAc на конце 1,3-маннозного плеча триманнозной сердцевины и ноль или более манноз на 1,6-маннозном плече триманнозной сердцевины. Различные N-гликаны также называют "гликоформами".

По отношению к сложным N-гликанам термины "G-2", "G-1", "G0", "G1", "G2", "A1" и "A2" означают следующее. "G-2" относится к структуре N-гликана, которую можно охарактеризовать как $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; термин "G-1" относится к структуре N-гликана, которую можно охарактеризовать как $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$; термин "G0" относится к структуре N-гликана, которую можно охарактеризовать как $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; термин "G1" относится к структуре N-гликана, которую можно охарактеризовать как $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; термин "G2" относится к структуре N-гликана, которую можно охарактеризовать как $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; термин "A1" относится к структуре N-гликана, которую можно охарактеризовать как $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; и термин "A2" относится к структуре N-гликана, которую можно охарактеризовать как $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$.

Если не указано иначе, то термины G-2", "G-1", "G0", "G1", "G2", "A1" и "A2" относятся к видам N-гликана, в которых отсутствует фукоза, присоединенная к остатку GlcNAc на восстанавливающем конце N-гликана. Когда термин содержит "F", "F" указывает на то, что данный вид N-гликана содержит остаток фукозы на остатке GlcNAc на восстанавливающем конце N-гликана. Например, все обозначения G0F, G1F, G2F, A1F и A2F указывают на то, что N-гликан дополнительно содержит остаток фукозы, присоединенный к остатку GlcNAc на восстанавливающем конце N-гликана. Низшие эукариоты, такие как дрожжи и мицелиальные грибы, обычно не продуцируют N-гликаны, которые продуцируют фукозу.

В отношении многоантенных N-гликанов, термин "многоантенный N-гликан" относится к N-гликанам, которые дополнительно содержат остаток GlcNAc на остатке маннозы, составляющем невосстанавливающий конец 1,6 плеча или 1,3 плеча N-гликана, или остаток GlcNAc на каждом из остатков маннозы, составляющих невосстанавливающий конец 1,6 плеча и 1,3 плеча N-гликана. Таким образом, многоантенные N-гликаны можно охарактеризовать формулами $\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ или $\text{NANA}_{(1-4)}\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$.

Термин "1-4" относится к 1, 2, 3 или 4 остаткам.

В отношении разделенных N-гликанов, термин "разделенный N-гликан" относится к N-гликанам, в которых остаток GlcNAc связан с остатком маннозы на восстанавливающем конце N-гликана. Разделенный N-гликан можно охарактеризовать формулой $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, в которой каждый остаток маннозы связан на своем невосстанавливающем конце с остатком GlcNAc. Напротив, если многоантенный N-гликан обозначается $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, то данная формула указывает на то, что два остатка GlcNAc связаны с остатком маннозы на невосстанавливающем конце одного из двух плеч N-гликанов и один остаток GlcNAc связан с остатком маннозы на невосстанавливающем конце другого плеча N-гликана.

В некоторых вариантах реализации белки согласно настоящему изобретению содержат агликозилированную Fc-область. В качестве примера, Fc-область IgG1 можно агликозилировать путем делеции или замены остатка N297.

Физические свойства антител.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, могут дополнительно содержать один или более сайтов гликозилирования в варибельной области либо легкой, либо тяжелой цепи иммуноглобулина. Такие сайты гликозилирования могут приводить к повышенной иммуногенности антитела или фрагмента или к изменению pK антитела вследствие измененного связывания с антигеном (Marshall и др. (1972) *Appl Rev Biochem* 41:673-702; Gala и Morrison (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick и др. (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh и др. (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura и др. (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Известно, что гликозилирование происходит в мотиве, содержащем последовательность N-X-S/T.

У каждого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента будет уникальная изоэлектрическая точка (pI), которая, как правило, попадает в диапазон pH между 6 и 9,5. pI для антитела IgG1 обычно попадает в диапазон pH 7 - 9,5 и pI для антитела IgG4 обычно попадает в диапазон pH 6-8.

Каждому антителу или антигенсвязывающему фрагменту свойственна температура плавления, при этом более высокая температура плавления свидетельствует о большей общей стабильности *in vivo* (Krishnamurthy R и Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Обычно, T_{M1} (температура начала разворачивания) может быть большей чем 60°C, большей чем 65°C или большей чем 70°C. Точку плавления антитела или фрагмента можно измерить, применяя дифференциальную сканирующую калориметрию (Chen и др. (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando и др. (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) или круговой дихроизм (Murray и др. (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

В дополнительном варианте реализации выбирают антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые быстро не деградируют. Деградацию антитела или фрагмента можно измерить, применяя капиллярный электрофорез (КЭ) и МАЛДИ-МС (Alexander AJ и Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

В дополнительном варианте реализации выбирают антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые обладают минимальной склонностью к агрегации, которая может приводить к запуску нежела-

тельного иммунного ответа и/или измененным или неблагоприятным фармакокинетическим свойствам. Как правило, приемлемыми являются антитела и фрагменты с агрегацией 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее или 5% или менее. Агрегацию можно измерить с помощью нескольких методик, включая эксклюзионную хроматографию (ЭХГ), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и рассеяние света.

Конъюгаты антител.

Антитела против SIRP α и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, также можно конъюгировать с химической молекулой. Химическая молекула может представлять собой, среди прочего, полимер, меченый радиоактивной меткой нуклеотид или цитотоксический фактор. В конкретных вариантах реализации химическая молекула представляет собой полимер, который увеличивает время полувыведения антитела или фрагмента в организме субъекта. Подходящие полимеры включают, но не ограничены гидрофильными полимерами, которые включают, но не ограничены полиэтиленгликолем (ПЭГ) (например, ПЭГ с молекулярной массой 2, 5, 10, 12, 20, 30 или 40 кДа), декстраном и монометоксиполиэтиленгликолем (мПЭГ). Lee и др. (1999) (Bioconj. Chem. 10:973-981) описывает конъюгированные с ПЭГ одноцепочечные антитела. Wen и др. (2001) (Bioconj. Chem. 12:545-553) описывают конъюгирование антител с ПЭГ, который присоединен к хелатору радиометаллов (диэтилентриаминпентауксусной кислоте (ДТПА)).

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, также могут быть конъюгированы с метками, такими как ^{99}Tc , ^{90}Y , ^{111}In , ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , ^{131}I , ^{11}C , ^{15}O , ^{13}N , ^{18}F , ^{35}S , ^{51}Cr , ^{57}To , ^{226}Ra , ^{60}Co , ^{59}Fe , ^{57}Se , ^{152}Eu , ^{67}Cu , ^{217}Ci , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , ^{234}Th , и ^{40}K , ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{52}Tl и ^{56}Fe .

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, также могут быть пегилированы, например, чтобы повысить их биологическое время полувыведения (например, в сыворотке). Для того чтобы пегилировать антитело или фрагмент, указанное антитело или фрагмент обычно приводят в реакцию с реакционноспособной формой полиэтиленгликоля (ПЭГ), такой как реакционноспособный эфир или альдегидное производное ПЭГ, при условиях, в которых одна или более групп ПЭГ присоединяются к антителу или фрагменту антитела. В конкретных вариантах реализации пегилирование осуществляют посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования реакционноспособной молекулой ПЭГ (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). В данном изобретении предполагают, что в объем термина "полиэтиленгликоль" входят любые формы ПЭГ, которые применяли для дериватизации других белков, такие как моно-(C₁-C₁₀)-алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. В некоторых вариантах реализации антитело или фрагмент, который нужно пегилировать, представляет собой агликозилированное антитело или фрагмент. Способы пегилирования белков известны в данной области, и их можно применять для антител согласно настоящему изобретению. См., например, ЕО 0154316 и ЕР 0401384.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, также могут быть конъюгированы с флуоресцентными или хемилюминесцентными метками, включая флуорофоры, такие как хелаты редкоземельных металлов, флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, изотиоцианат, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, орто-фталевый альдегид, флуорескамин, ^{152}Eu , дансил, умбеллиферон, люциферин, люминоловую метку, изолюминоловую метку, метку ароматического эфира акридиния, имидазоловую метку, метку соли акридиния, метку оксалатного сложного эфира, эквориновую метку, 2,3-дигидрофталазиндионы, биотин/авидин, спиновые метки и стабильные свободные радикалы.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению также могут быть конъюгированы с цитотоксическим фактором, таким как дифтерийный токсин, А-цепь экзотоксина *Pseudomonas aeruginosa*, А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки и соединения из *Aleuritesfordii* (например, жирные кислоты), диантиновые белки, белки РАРI, РАРII и РАР-S из *Phytoiassa americana*, ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaria officinalis*, митогеллин, рестицин, феномицин и еномицин.

Можно применять любой способ, известный в данной области, для конъюгирования антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению с различными молекулами, включая способы, описанные у Hunter и др., (1962) *Nature* 144:945; David и др., (1974) *Biochemistry* 13:1014; Pain и др., (1981) *J. Immunol. Meth.* 40:219; и Nygren, I, (1982) *Histochem. and Cytochem.* 30:407. Способы конъюгирования антител и их фрагментов стандартны и очень хорошо известны в данной области.

Терапевтические применения антител против SIRP α .

Дополнительно предложены способы лечения субъектов, включая субъекта, представляющего собой человека, нуждающихся в лечении, с помощью выделенных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном изобретении. В одном варианте реализации настоящего изобретения такой субъект страдает от инфекции или инфекционного заболевания.

В другом варианте реализации настоящего изобретения такой субъект страдает от рака. В одном варианте реализации рак представляет собой, например, остеосаркому, рабдомиосаркому, нейробластому, рак почки, лейкоз, переходно-клеточный рак почки, рак мочевого пузыря, рак Вильмса, рак яични-

ков, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак кости, рак легких (например, немелкоклеточный рак легкого), рак желудка, колоректальный рак, рак шейки матки, синовиальную саркому, рак головы и шеи, плоскоклеточную карциному, множественную миелому, почечно-клеточный рак, ретинобластому, гепатобластому, печеночно-клеточную карциному, меланому, рабдоидную опухоль почки, саркому Юинга, хондросаркому, рак головного мозга, глиобластому, менингиому, аденому гипофиза, вестибулярную шванному, примитивную нейроэктодермальную опухоль, медуллобластому, астроцитому, анапластическую астроцитому, олигодендроглиому, эпендимому, папиллому хориоидного сплетения, истинную полицитемию, тромбоцитемию, идиопатический миелофиброз, саркому мягких тканей, рак щитовидной железы, рак эндометрия, карциноидный рак или рак печени, рак молочной железы или рак желудка. В одном варианте реализации настоящего изобретения рак представляет собой метастатический рак, например, из описанных выше видов.

Раки, от которых можно лечить антителами или антигенсвязывающими фрагментами, композициями и способами согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничены перечисленными видами рака: саркома (ангиосаркома, фибросаркома, рабдомиосаркома, липосаркома), миксома, рабдомиома, фиброма, липома и тератома; легкое: бронхогенная карцинома (плоскоклеточная, недифференцированная мелкоклеточная, недифференцированная крупноклеточная, аденокарцинома), альвеолярная (бронхиолярная) карцинома, бронхиальная аденома, саркома, лимфома, хондроматозная гамартома, мезотелиома; желудочно-кишечный тракт: пищевод (плоскоклеточная карцинома, аденокарцинома, лейомиосаркома, лимфома), желудок (карцинома, лимфома, лейомиосаркома), поджелудочная железа (протоковая аденокарцинома, инсулинома, глюкагонома, гастринома, карциноидные опухоли, випома), тонкий кишечник (аденокарцинома, лимфома, карциноидные опухоли, саркома Капоши, лейомиома, гемангиома, липома, нейрофиброма, фиброма), толстый кишечник (аденокарцинома, тубулярная аденома, ворсинчатая аденома, гамартома, лейомиома), колоректальный рак; уrogenитальный тракт: почка (аденокарцинома, опухоль Вильмса (нефробластома), лимфома, лейкоз), мочевого пузыря и уретра (плоскоклеточная карцинома, переходо-клеточная карцинома, аденокарцинома), предстательная железа (аденокарцинома, саркома), яичко (семинома, тератома, эмбриональная карцинома, тератокарцинома, хориокарцинома, саркома, карцинома из интерстициальных клеток, фиброма, фиброаденома, аденоматоидные опухоли, липома); печень: гепатома (печеночно-клеточная карцинома), холангиокарцинома, гепатобластома, ангиосаркома, печеночно-клеточная аденома, гемангиома; кость: остеогенная саркома (остеосаркома), фибросаркома, злокачественная фиброзная гистиоцитома, хондросаркома, саркома Юинга, злокачественная лимфома (ретикулоклеточная саркома), множественная миелома, злокачественная гигантоклеточная опухоль хордома, остеохондром (костно-хрящевые экзостозы), доброкачественная хондрома, хондробластома, хондромиксофиброма, остеонд-остеома и гигантоклеточные опухоли; нервная система: череп (остеома, гемангиома, гранулема, ксантома, деформирующий остит), оболочки головного мозга (менингиома, менингиосаркома, глиоматоз), головной мозг (астроцитому, медуллобластому, глиому, эпендимому, герминому (пинеалому), многоформная глиобластома, олигодендроглиома, шваннома, ретинобластома, врожденные опухоли), нейрофиброма спинного мозга, менингиома, глиома, саркома); гинекологические: матка (карцинома эндометрия), шейка матки (карцинома шейки матки, предопухольная дисплазия шейки матки), яичники (карцинома яичника (серозная цистаденокарцинома, мукоидная цистаденокарцинома, недифференцированная карцинома), гранулелеточная опухоль, опухоли из клеток Сертоли-Лейдига, дисгерминома, злокачественная тератома), вульва (плоскоклеточная карцинома, внутриэпителиальная карцинома, аденокарцинома, фибросаркома, меланома), влагалище (светлоклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома, ботриоидная саркома (эмбриональная рабдомиосаркома), фаллопиевы трубы (карцинома), молочная железа; гематологические: кровь (миелоидный лейкоз (острый и хронический), острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, миелолиферативные заболевания, множественная миелома, миелодиспластический синдром), болезнь Ходжкина, неходжкинская лимфома (злокачественная лимфома); кожа: злокачественная меланома, базально-клеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома, саркома Капоши, родимые пятна, диспластические невусы, липома, ангиома, дерматофиброма, келоиды, псориаз; и надпочечные железы: нейробластома. Таким образом, термин "раковая клетка" в данном изобретении включает клетку, пораженную любым из указанных выше состояний.

В одном варианте реализации рака, от которых можно лечить антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, описанными в данном изобретении, композициями и способами согласно настоящему изобретению включают, но не ограничены перечисленными: рак молочной железы, рак желудка, пищевода рак, карциному гастроэзофагеального соединения, колоректальный рак, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, остеосаркому, нейробластому, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак эндометрия, рак яичников, рак легких, плоскоклеточную карциному, меланому, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, мелкоклеточный рак легких, рак почки, почечноклеточную карциному, рак щитовидной железы, многоформную глиобластому, рак фаллопиевых труб, перитонеальный рак, ангиосаркому, печеночно-клеточную карциному, хориокарциному, саркому мягких тканей, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоцитарный лейкоз, неходжкинскую лимфому, В-клеточную неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лим-

фому, лимфому из клеток мантийной зоны, миелодиспластический синдром, острый миелоцитарный лейкоз, Т-клеточную лимфому, лимфому из клеток-естественных киллеров, внеузловую лимфому из клеток маргинальной зоны, острый лимфоцитарный лейкоз, множественную миелому.

В одном варианте реализации антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, можно применять для лечения инфекций и инфекционных заболеваний. В данном изобретении термин "инфекция" относится к любому состоянию в по меньшей мере одной клетке организма (т.е. субъекта), которая инфицирована инфекционным агентом (например, у субъекта наблюдается инфекция внутриклеточным патогеном, например, хроническая инфекция внутриклеточным патогеном). В данном изобретении термин "инфекционный агент" относится к чужеродному биологическому объекту (т.е. патогену), который индуцирует экспрессию CD47 (например, повышенную экспрессию CD47) в по меньшей мере одной клетке инфицированного организма. Например, инфекционные агенты включают, но не ограничены бактериями, вирусами, простейшими и грибами.

Внутриклеточные патогены представляют особый интерес. Инфекционные заболевания представляют собой расстройства, вызванные инфекционными агентами. Некоторые инфекционные агенты не вызывают известных симптомов или заболевания при некоторых условиях, но потенциально могут вызывать симптомы или заболевание при измененных условиях. Заявленные способы можно применять для лечения хронических инфекций патогенами, например, включая, но не ограничиваясь вирусными инфекциями, например, ретровирусом, лентивирусом, гепаднавирусом, вирусами герпеса, поксвирусами, вирусами папилломы человека и т.д.; внутриклеточными бактериальными инфекциями, например,

Mycobacteria, Chlamydomphila, Ehrlichia, Rickettsia, Brucella, Legionella, Francisella, Listeria, Coxiella, Neisseria,

Salmonella, родом *Yersinia, Helicobacter pylori*

и т.д.; и внутриклеточными простейшими патогенами, например, родом *Plasmodium*, родом *Trypanosoma*, родом *Lambliа*, родом *Toxoplasma*, родом *Leishmania* и т.д.

В некотором варианте реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены способы лечения субъектов с применением антитела против SIRP α или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, в которых указанный субъект страдает от вирусной инфекции. В одном варианте реализации вирусная инфекция представляет собой инфекцию вирусом, выбранным из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гепатита (А, В или С), вируса герпеса (например, вируса варицелла-зостер (ВЗВ), вируса простого герпеса (ВПГ-1), вируса гепатита А (ВГА-6), ВПГ-II и цитомегаловируса (ЦМВ), вируса Эпштейна-Барр), аденовируса, вируса гриппа, флавивирусов, эховируса, риновируса, вируса Коксаки, коронавируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса свинки, ротавируса, вируса кори, вируса краснухи, парвовируса, вируса коровьей оспы, Т-лимфотропного вируса человека (вируса HTLV), вируса денге, вируса папилломы, вируса моллюска, полиовируса, вируса бешенства, вируса Джона Каннингема (вируса JC) или вируса арбовирусного энцефалита.

В некотором варианте реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены способы лечения субъектов с применением антитела против SIRP α или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, в которых указанный субъект страдает от бактериальной инфекции. В одном варианте реализации бактериальная инфекция представляет собой инфекцию бактериями, выбранными из группы, состоящей из хламидий, риккетсиальных бактерий, микобактерий, стафилококков, стрептококков, пневмококков, менингококков и гонококков, клебсиеллы, протеуса, серратии, псевдомонад,

Legionella,

Corynebacterium diphtheriae, Salmonella, бацилл, *Vibrio cholerae, Clostridium tetan, Clostridium botulinum,*

Bacillus anthracis, Yersinia pestis, Mycobacterium leprae, Mycobacterium lepromatosis и *Borriella.*

В некотором варианте реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены способы лечения субъектов с применением антитела против SIRP α или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, в которых указанный субъект страдает от грибковой инфекции. В одном варианте реализации грибковая инфекция представляет собой инфекцию грибом, выбранным из группы, состоящей из

Candida (albicans, krusei, glabrata, tropicalis и т.д.), *Cryptococcus neoformans, Aspergillus*

(fumigatus, niger и т.д.), рода *Mucorales (mucor, absidia, rhizopus), Sporothrix schenkii, Blastomyces dermatitidis,*

Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis и *Histoplasma capsulatum.*

В некотором варианте реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены способы лечения субъектов с применением антитела против SIRP α или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, в которых указанный субъект страдает от паразитарной инфекции. В одном варианте реализации паразитарная инфекция представляет собой инфекцию паразитом, выбранным из группы, состоящей из

Entamoeba histolytica, Balantidium coli, Naegleria fowleri, Acanthamoeba, Giardia lamblia, Cryptosporidium, Pneumocystis carinii, Plasmodium vivax, Babesia microti, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania donovani, Toxoplasma gondii и *Nippostrongylus brasiliensis*.

"Субъект" может представлять собой млекопитающее, такое как человек, собака, кошка, лошадь, корова, мышь, крыса, обезьяна (например, яванский макак, например, *Macaca fascicularis*) или кролик. В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения субъект представляет собой человека.

Термин "в сочетании с" указывает на то, что компоненты, которые вводят в способ согласно настоящему изобретению (например, антитело против SIRP α (например, гуманизированное антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент вместе с противораковым агентом), можно включить в состав одной композиции для одновременной доставки или включить в состав отдельных двух или более композиций (например, набора). Каждый компонент можно вводить субъекту в момент времени, отличный от времени введения другого компонента; например, каждое введение можно осуществить неодновременно (например, отдельно или последовательно) с несколькими интервалами в течение данного периода времени. Более того, отдельные компоненты можно вводить субъекту одним и тем же или различными путями.

В конкретных вариантах реализации антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, можно применять отдельно или в сочетании с другими дополнительными терапевтическими агентами и/или терапевтическими процедурами для лечения или предотвращения любого заболевания, такого как рак, например, как обсуждалось в данном изобретении, у субъекта, нуждающегося в таком лечении или предотвращении. Композиции, например, фармацевтические композиции, содержащие фармацевтически приемлемый носитель, содержащие такие антитела и фрагменты в сочетании с дополнительными терапевтическими агентами также входят в объем настоящего изобретения.

Следовательно, в соответствии с настоящим изобретением предложен способ лечения рака у субъекта, представляющего собой человека, включающий введение указанному субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном изобретении, необязательно в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом или терапевтической процедурой. В соответствии с настоящим изобретением также предложен способ лечения инфекции или инфекционного заболевания у субъекта, представляющего собой человека, включающий введение указанному субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном изобретении, необязательно в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом или терапевтической процедурой. В соответствии с настоящим изобретением также предложен способ повышения активности иммунной клетки, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном изобретении. В одном варианте реализации указанный способ применяют для: лечения рака, лечения инфекции или инфекционного заболевания или в качестве адъюванта вакцины.

В конкретных вариантах реализации антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, можно применять отдельно или в сочетании с противоопухолевыми вакцинами. Примеры противоопухолевых вакцин включают, но не ограничены перечисленными: вакцины против рака, вызванного инфекцией вирусом папилломы человека (ВПЧ), такие как гардасил®, гардасил 9® и церварикс®; вакцины, которые предотвращают рак печени, вызванный вирусом гепатита В, такие как энджерикс-В® и рекомбивакс HB®; терапию онколитическими вирусами, которые запускают иммунный ответ, такими как имлигик®; ДНК-вакцины, такие как вакцина на основе плазмидной ДНК Synchotrope MA2M и ZYC101; ДНК-вакцина, специфичная к маммаглобину-А (см. *Clinical Cancer Res.* 2014 20(23):5964-75); вакцины на основе вектора, такие как PSA-TRICOM (проствак), PANVAC-VF, вакцины на основе *Listeria monocytogenes* (см., например, *Therapeutic Advances in Vaccines*, 2014, 2(5) 137-148), вакцины на основе листерий (листерии, экспрессирующие одну или более вакцин от рака, такие как листерии-мезотелин (например, CRS-207), ADXS-HPV, аксалимоген филолисбак, листерии-HER2/Neu, листерии-EGFRvIII), Adeno-CEA; аллогенные вакцины, такие как GVAX, BLP-25 (против муцина 1 вируса Анкара), белагенпуматуцел-L, TG4010, вакцина с аналогом эпидермального фактора роста CIMAvax, NY-ESO, GM.CD40L-CCL21; аутологичные вакцины, такие как: Adeno-CD40L, BCG, INGN-225, вакцины на основе дендритных клеток, такие как провенж® (сипулеуцел-Т), rF-CEA-MUC1-TRICOM (панвак-DC); антигенные вакцины, такие как MUC-1 (стимувакс), NY-ESO-1, GP-100, MAGE-A3 (ген А3, кодирующий антиген меланомы), INGN-225 (см. *Pharmacology & Therapeutics* 153 (2015) 1-9).

Сигналы "съешь меня" можно увеличить с помощью цитотоксических методов лечения, таких как лучевая терапия или лечение химиотерапевтическими агентами, включая, но не ограничиваясь перечисленными агентами: антрациклины (доксорубин, эпирубин, даунорубин, идарубин, митоксантрон), оксалиплатин, бортезомиб, циклофосфамид, блеомицин, вориносат, паклитаксел, 5-фторурацил, цитарабин, преднизолон, доцетаксел, митомицин С, топотекал/камптотецин, этопозид, золедроновая кислота, метотрексат, ибрутиниб, афлиберцепт, бевацизумаб, торемифен, винбластин, винкрестин, иделагисиб, меркаптопурин, талидомид, сорафениб. Таким образом, в некоторых вариантах реализации антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, можно применять в со-

четании с химиотерапевтическими агентами, в сочетании с лучевой терапией и т.д. В конкретных вариантах реализации антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, можно применять отдельно или в сочетании с таргетной терапией. Примеры таргетной терапии включают: гормональную терапию, терапию ингибиторами передачи сигнала (например, ингибиторами EGFR, такими как цетуксимаб (эрбитукс) и эрлотиниб (тарцева)); ингибиторами CD20 (например, ритуксимабом (ритуксан) и офатумумабом (арзерра)); ингибиторами CD38 (например, даратумумабом (дарзалекс)); ингибиторами CD52 (например, алемтузумабом (кэмпас)); ингибиторами HER2 (например, трастузумабом (герцептин) и пертузумабом (перьета)); ингибиторами BCR-ABL (такими как иматиниб (гливек) и дазатиниб (спрайсел)); ингибиторами ALK (такими как кризотиниб (ксалкори) и церитиниб (зикадия)); ингибиторами BRAF (такими как вемурафениб (зелбораф) и дабрафениб (тафинлар)), модуляторами экспрессии генов (например, децитабином (дакоген) и вориностатом (золинза)), индукторами апоптоза (например, бортезомибом (велкейд) и карфилзомибом (кипролис)), ингибиторами ангиогенеза (например, бевацизумабом (авастин) и рамуцирумабом (цирамза)), иммуномодуляторными имидсодержащими лекарственными средствами (например, талидомидом, леналидомидом, помалидомидом и апремиластом), моноклональными антителами, присоединенными к токсинами (например, брентуксимабом ведотин (адцетрис) и адо-трастузумабом эмтанзин (кадсила)).

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, предпочтительно могут найти применение в сочетании с таргетной терапией, в которой антитела используются, чтобы опосредовать АЗКЦ/АЗКФ. Доступны функциональные биоанализы, чтобы проанализировать механизм действия лекарственного антитела и отличить АЗКФ как механизм действия от АЗКЦ. В качестве примера, в анализе антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) обычно используют нормальные мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека или эффекторские клетки, выделенные из них. Вариативность анализа можно снизить, используя выбранные группы доноров с определенными вариациями числа копий гена (CNV) или генотипами Fcγ-рецептора IIa (FcγRIIa/CD32a), IIIa (FcγRIIIa/CD16a) или IIIb (FcγRIIIb/CD16b), такими как FcγRIIIa-158 V/V по сравнению с V/F или F/F, FcγRIIIa-131 H/H по сравнению с H/R или R/R, и полиморфными вариантами FcγRIIIb-NA1 и -NA2. В качестве альтернативы, эффекторские клетки, такие как МКПК, полученные из МКПК клетки-естественные киллеры (NK), гранулоциты, моноциты, полученные из моноцитов макрофаги или дендритные клетки (ДК) можно заменить на экспрессирующую FcγRIIIa линию клеток (например, сконструированные NK92). Уничтожение клеток-мишеней можно оценить путем измерения высвобождения специфических зондов из предварительно меченых клеток-мишеней, применяя ⁵¹хром (Cr⁵¹) или флуоресцентные красители, такие как кальцеин-ацетоксиметил (кальцеин-АМ), карбоксифлуоресцеинсукцинимидиловый эфир (CFSE), 2',7'-бис-(2-карбоксиэтил)-5-(и-6)-карбоксифлуоресцеин (BCECF), европий (Eu) или йодид пропидия (PI), или путем измерения высвобождения цитозольных ферментов, таких как лактатдегидрогеназа (ЛДГ), или высвобождения нуклеозидтрифосфата (АТФ).

Наоборот, антителозависимый опосредованный клетками фагоцитоз (АЗКФ) можно оценить путем измерения разрушения клеток-мишеней путем фагоцитоза, опосредованного гранулоцитами, моноцитами, дендритными клетками или макрофагами. В анализе АЗКФ используют полученные из МКПК клетки или миелоидные линии клеток, такие как клетки HL-60, THP-1 и U937, дифференцированные в макрофаги или гранулоциты. Стимулы, которые широко используют для индукции дифференцировки в макрофаги моноцитарных линий клеток, включают форбол-12-миристинат-13-ацетат (ФМА), 1,25-дигидроксивитамин D3 (VD3) и ретиноевую кислоту (РК). Также известно, что РК индуцирует конечную дифференцировку в гранулоциты, например, клетку HL-60. Фагоцитоз клеток-мишеней можно оценить путем отслеживания интернализации эффекторными клетками специфических зондов из клеток-мишеней, предварительно меченых флуоресцентными красителями, такими как краситель пролиферации клеток eFluor450, CFSE и pH-чувствительные красители, включая pHrodo и CyрHer5E. Фагоцитоз измеряют по увеличению количества флуоресцентно меченых эффекторных клеток, применяя проточную цитометрию или флуоресцентную микроскопию. Также доступны анализы "репортерного гена" для оценки АЗКФ. Для того чтобы измерить функцию АЗКФ в анализе репортерного гена, клетки-мишени сначала инкубируют с титрованным интересующим антителом. После связывания антитела с распознаваемой мишенью на поверхности целевой клетки добавляют сконструированные эффекторные клетки Jurkat. Если произошла активация пути АЗКФ, то клетки Jurkat продуцируют продукт люциферазы путем экспрессии репортерного гена NFAT-RE-luc2. Затем измеряют активность люциферазы после периода индукции в течение 4-24 ч после добавления реагента для анализа люциферазы. Дозозависимую ответную реакцию в анализе в микротитрационном планшете можно использовать для количественного определения относительной биологической активности терапевтического антитела по сравнению с кривой зависимости доза-эффект подходящего эталонного объекта.

В конкретных вариантах реализации антитела против SIRPα или их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с противораковым терапевтическим агентом или иммуномодуляторным лекарственным средством, таким как ингибитор иммуномодуляторного рецептора, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично

связывается с указанным рецептором.

В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело против SIRP α или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению находится в сочетании с одним или более из: агониста (например, агонистического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или растворимого гибридного белка) белка рецептора TNF, иммуноглобулин-подобного белка, рецептора цитокина, интегрина, активирующих лимфоциты сигнальных молекул (белков SLAM), активирующего рецептора NK-клеток, Toll-подобного рецептора, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (TACTILE), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), SLAM7, BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, PAG/Cbp, CD19a и лиганда, который специфично связывается с CD83; или ингибитора CD47, PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, CEACAM (например, CEACAM-1, -3 и/или -5), VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1,IDO, TDO, CD160 и/или TGFR-бета.

В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело против SIRP α или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению находится в сочетании с одним или более циклическими динуклеотидами или другими агонистами сигнального пути STING. STING (стимулятор генов интерферона, также известный как TMEM173, MITA, ERIS и MPYS) представляет собой трансмембранный белок, локализованный в ЭР, который претерпевает изменение конформации в ответ на непосредственное связывание циклических динуклеотидов (ЦДН), приводящее к последующему сигнальному каскаду, включающему активацию TBK1, фосфорилирование IRF-3 и продукцию IFN- β и других цитокинов. Сигнальный путь STING в антигенпредставляющих клетках содержащего опухоль хозяина участвует в индукции спонтанного ответа CD8⁺ Т-клеток на антигены опухолевого происхождения. Активация данного пути и последующая продукция IFN- β по имеющимся сведениям также способствует противоопухолевому действию облучения. Агонисты STING и их применения описаны, например, в US20060040887, US20080286296, US20120041057, US20140205653, WO2014179335, WO 2014179760, US20150056224, WO 2015185565, WO 2016096174, WO 2016145102, WO 2017011444, WO 2017027645, WO 2017027646, WO 2017123657, WO 2017123669, WO 2017175147, WO 2017175156, WO 2018045204, WO 2018009648, WO 2018006652, WO 2018013887, WO 2018013908, US20180002369, US20180092937 и US20180093964.

В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело против SIRP α или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению находится в сочетании с одним или более из: антитела против CD47, антитела против PD-1 (например, ниволумаба, пембролизумаба), антитела против PDL1, антитела против TIGIT, антитела против APRIL, антитела против CTLA4, антитела против CS1 (например, элотузумаба), антитела против KIR2DL1/2/3 (например, лирилуумаба), антитела против CD137 (например, урелумаба), антитела против GITR (например, TRX518), антитела против PD-L1 (например, BMS-936559, MSB0010718C или MPDL3280A), антитела против PD-L2, антитела против ILT1, антитела против ILT2, антитела против ILT3, антитела против ILT4, антитела против ILT5, антитела против ILT6, антитела против ILT7, антитела против ILT8, антитела против CD40, антитела против OX40, антитела против ICOS, антитела против KIR2DL1, антитела против KIR2DL2/3, антитела против KIR2DL4, антитела против KIR2DL5A, антитела против KIR2DL5B, антитела против KIR3DL1, антитела против KIR3DL2, антитела против KIR3DL3, антитела против NKG2A, антитела против NKG2C, антитела против NKG2E, антитела против 4-1BB (например, PF-05082566), антитела против TSLP, антитела против IL-10, IL-10 или пегилированного IL-10, или любого низкомолекулярного органического ингибитора таких мишеней.

В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело против SIRP α или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению находится в сочетании с антителом против CD20 (например, ритуксимабом, офатумумабом, окрелизумабом, обинутузумабом, окаратузумабом, ублитуксимабом, велтузумабом, ибритумомабом тиуксетан, тозитумомабом, BVX-20, SCT-400 или PRO131921).

В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело против SIRP α или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению находится в сочетании с антителом против CD38 (например, даратумумабом, изатуксимабом или MOR202).

В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело против SIRP α или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению находится в сочетании с антителом против EGFR (например, цетуксимабом, CetuGEX, панитумумабом, нимотузумабом, депатуксизумабом или AFM-21).

В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело против SIRP α или его антигенсвяз-

В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело против SIRP α или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению находится в сочетании с одним или более из ингибиторов (например, малой органической молекулой или антителом или его антигенсвязывающим фрагментом), таких как ингибитор MTOR (мишени рапамицина в клетках млекопитающих), цитотоксический агент, агент на основе платины, ингибитор EGFR, ингибитор VEGF, стабилизатор микротрубочек, таксан, ингибитор CD20, ингибитор CD52, ингибитор CD30, ингибитор RANK (рецептора активатора ядерного фактора каппа В), ингибитор RANKL (лиганда рецептора активатора ядерного фактора каппа В), ингибитор ERK, ингибитор MAP-киназы, ингибитор АКТ, ингибитор MEK, ингибитор PI3K, ингибитор HER1, ингибитор HER2, ингибитор HER3, ингибитор HER4, ингибитор Bcl2, ингибитор CD22, ингибитор CD79b, ингибитор ErbB2 или ингибитор фарнезилпротеинтрансферазы.

В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело против SIRP α или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению находится в сочетании с любым одним или более из следующих агентов: 13-цис-ретиноевая кислота, 3-[5-(метилсульфонилпиперадинметил)индолил]хинолон, 4-гидрокситамоксифен, 5-дезоксинуридин, 5'-дезоксис-5-фторуридин, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, 7-гидрокситауроспорин, А-443654, абиратеронацетат, абраксан, АВТ-578, аколбифен, ADS-100380, ALT-110, алтретамин, амифостин, аминоклутетимид, амрубицин, амсакрин, анагрелид, анастрозол, ангиостатин, AP-23573, ARQ-197, арзоксифен, AS-252424, AS-605240, аспарагиназа, АТ-9263, атрасентан, акситиниб, AZD1152, вакцина против бациллы Кальмета-Герена (БЦЖ), батабулин, ВС-210, бесодутокс, бевацизумаб, бикалутамид, Bio111, BIO140, блеомицин, BMS-214662, BMS-247550, BMS-275291, BMS-310705, бортезомиб, бусерелин, бусульфан, кальцитриол, камптотецин, канертиниб, капецитабин, карбоплатин, кармустин, СС8490, цедираниб, CG-1521, CG-781, хламидоцин, хлорамбуцил, хлортоксин, циленгитид, циметидин, цисплатин, кладрибин, клодронат, COL-3, CP-724714, циклофосфамид, ципротерон, ципротеронацетат, цитарабин, цитозинарабинозид, дакарбазин, дацинонат, дактиномицин, далотузумаб, данусертиб, дазатаниб, даунорубин, декатаниб, дегуелин, денилейкин, дезоксикоформицин, депсипептид, диарилпропионитрил, диэтилстильбэстрол, дифтитокс, доцетаксел, довитиниб, доксорубин, дролоксифен, эдотекарин, меченый итрием-90 эдотреотид, эдотреотид, ЕКВ-569, EMD121974, эндостатин, энзалутамид, энзастаурин, эпирубицин, эпитилон В, ERA-923, эрбитукс, эрлотиниб, эстрадиол, эстрамустин, этопозид, эверолимус, эксестан, фиклатузумаб, финастерид, флавопиридол, флоксуридин, флударабин, флуорокортизон, флуоксиместерон, флутамид, схема лечения FOLFOX, фулвезтрант, галетерон, гефитиниб, гемцитабин, гиматекан, гозерелин, гозерелина ацетат, госсипол, GSK461364, GSK690693, HMR-3339, гидроксипрогестеронапроат, гидроксимочевина, IC87114, идарубин, идоксифен, ифосфамид, М862, иматиниб, IMC-1C11, INCB24360, INO1001, интерферон, интерлейкин-12, ипилимумаб, иринотекан, JNJ-16241199, кетоназол, KRX-0402, талидомид, леналидомид, помалидомид, апремиласт, лапатиниб, лазофоксифен, летрозол, лейковорин, лейпролид, лейпролид ацетат, левамизол, липосома entrapped паклитаксел, ломустин, лонафарниб, лукантон, LY292223, LY292696, LY293646, LY293684, LY294002, LY317615, маримастат, мехлоретамин, медроксипрогестеронацетат, мегестролацетат, мелфалан, меркаптопурин, месна, метотрексат, митрамицин, митомицин, митотан, митоксантрон, тозасертиб, MLN8054, неовастат, нератиниб, неурadiaб, нилотиниб, нилутамид, нолатрексид, NVP-BE235, облимерсен, октреотид, офатумумаб, ореговомаб, ортеронел, оксалиплатин, паклитаксел, палбоциклиб, памидронат, панитумумаб, пазопаниб, PD0325901, PD184352, ПЭГ-интерферон, пеметрексед, пентостатин, перифозин, фенилаланинмустард, PI-103, пиктилисиб, PK-75, пипендоксифен, PKI-166, пликамицин, порфирин, преднизон, прокарбазин, прогестин, PX-866, R-763, ралоксифен, ралитрексид, разоксин, ридафоролимус, ритуксимаб, ромидепсин, RTA744, рубитекан, скриптаид, Sdx102, селициклиб, селуметиниб, семаксаниб, SF1126, сиролимус, SN36093, сорафениб, спиронолактон, скваламин, SR13668, стрептозоцин, SU6668, субероиланилидгидроксамовая кислота, сунитиниб, синтетический эстроген, талампанель, талимоген лагерпарепвек, тамоксифен, темозоломид, темсиролимус, тенипозид, тесмилифен, тестостерон, тетрандрин, TGX-221, талидомид, тиогуанин, тиотепа, тремелимумаб, типифарниб, тивозаниб, TKI-258, TLK286, топотекан, торемифена цитрат, трабектедин, трастузумаб, третиноин, трихостатин А, трицирибинфосфата моногидрат, трипторелина памоат, TSE-424, урациловый иприт, вальпроевая кислота, валрубицин, вандетаниб, ваталаниб, ловушка VEGF (VEGF Trap), винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин, витаксин, витеспан, вориностат, VX-745, ворманнин, Xr311, занолимумаб, ZK186619, ZK-304709, ZM336372, ZSTK474.

Неограничивающие примеры подходящих противораковых агентов для применения в комбинации с антителом против SIRP α или его антигенсвязывающим фрагментом согласно настоящему изобретению включают цитостатические агенты, иммуномодулирующие лекарственные средства на основе имидов, цитотоксические агенты, агенты для таргетной терапии (малые молекулы, биологические агенты, мiPНК и микроPНК) против рака и неопластических заболеваний,

- 1) антиметаболиты (такие как метотрексат, 5-фторурацил, гемцитабин, флударабин, капецитабин),
- 2) алкилирующие агенты, такие как темозоломид, циклофосфамид,
- 3) взаимодействующие с ДНК и повреждающие ДНК агенты, такие как цисплатин, оксалиплатин, доксорубин,

- 4) ионизирующее облучение, такое как лучевая терапия,
- 5) ингибиторы топоизомеразы II, такие как этопозид, доксорубин,
- 6) ингибиторы топоизомеразы I, такие как иринотекан, топотекан,
- 7) взаимодействующие с тубулином агенты, такие как паклитаксел, доцетаксел, абраксан, эпотилоны,
- 8) ингибиторы белка веретена деления кинезина,
- 9) ингибиторы контрольных точек сборки веретена деления,
- 10) ингибиторы поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP), такие как олапариб, МК-4827 и велипариб,
- 11) ингибиторы матриксной металлопротеиназы (ММП),
- 12) ингибиторы протеаз, такие как ингибиторы катепсина D и катепсина К,
- 13) ингибиторы протеасом или убиквитинилирования, такие как бортезомиб,
- 14) активатор мутантного p53 для восстановления активности p53 дикого типа,
- 15) аденовирусный p53
- 16) ингибиторы Bcl-2, такие как АВТ-263,
- 17) модуляторы белков теплового шока (БТШ), такие как гелданамидин и 17-ААГ,
- 18) ингибиторы гистоновых дезацетилаз (HDAС), такие как вориностат (SANA),
- 19) агенты, модулирующие половые гормоны,
 - a. антиэстрогены, такие как тамоксифен, фулвестрант,
 - b. селективные модуляторы рецептора эстрогенов (SERM), такие как ралоксифен,
 - c. антиандрогены, такие как бикалутамид, флутамид,
 - d. агонисты рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (РФЛГ), такие как лейпролид,
 - e. ингибиторы 5 α -редуктазы, такие как финастерид,
 - f. лиаза цитохрома P450 C17 (CYP450c17, также называемая 17 α C);
 - g. ингибиторы ароматазы, такие как летрозол, анастрозол, эксеместан,
- 20) ингибиторы киназы EGFR, такие как gefитиниб, эрлотиниб, лапатиниб,
- 21) двойные ингибиторы erbB1 и erbB2, такие как лапатиниб,
- 22) ингибиторы киназ, направленных на множество мишеней (серин/треониновых и/или тирозинкиназ),
 - a. ингибиторы киназы ABL - иматиниб, нилотиниб, дазатиниб,
 - b. ингибиторы VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR, KDR, FLT, c-Kit, Tie2, Raf, MEK и ERK, такие как сунитиниб, сорафениб, вандетаниб, пазопаниб, PLX-4032, акситиниб, PTK787, GSK-1120212,
 - c. ингибиторы Polo-подобной киназы,
 - d. ингибиторы киназы Aurora,
 - e. ингибитор JAK,
 - f. ингибиторы киназы c-MET,
 - g. ингибиторы циклин-зависимых киназ, такие как ингибитор CDK1 и CDK2 динациклиб SCH 727965 (см. Parry и др., Molecular Cancer Therapeutics 9 (8): 2344-53 (2010)) и ингибиторы CDK4/6, такие как рибоциклиб, палбоциклиб, абемациклиб и трилациклиб,
 - h. ингибиторы PI3K и mTOR, такие как GDC-0941, BEZ-235, BKM-120 и AZD-8055,
 - i. рапамицин и его аналоги, такие как темсиролимуc, эверолимуc и дефоролимуc,
- 23) и другие противораковые (также известные как антинеопластические) агенты включают, но не ограничены перечисленными: ара-С, адриамицин, цитоксан, карбоплатин, урациловый иприт, хлорметин, ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипоброман, триэтиленмеламин, триэтилендиофосфорамин, бусульфан, кармуcтин, ломуcтин, стрептозоцин, дакарбазин, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, фосфат флударабина, пентостатин, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин, навельбин, блеомицин, дактиномицин, даунорубин, доксорубин, эпирубицин, тенипозид, цитарабин, пеметрексед, идарубин, митрамицин, дезоксикоформицин, митомицин-С, L-аспарагиназу, тенипозид, этинилэстрадиол, диэтилстильбэстрол, тестостерон, преднизон, флуоксиместерон, дромостанолон пропионат, тестолактон, мегестрола ацетат, метилпреднизолон, метилтестостерон, преднизолон, триамцинолон, хлортрианизен, гидроксипрогестерон, аминоклутетимид, эстрамуcтин, флутамида медроксипрогестеронацетат, торемифен, гозерелин, карбоплатин, гидроксимочевину, амсакрин, прокарбазин, митотан, митоксантрон, левамизол, дроллоксафин, гексаметилмеламин, бексксар, зевалин, трисеннокс, профимер, тиотепа, алтретамин, доксил, онтак, депоцит, аранесп, нейпоген, нуласта, кепиванс.
- 24) ингибиторы фарнезилпротеинтрансферазы, такие как SARASAR™(4-[2-[4-[(11R)-3,10-дибром-8-хлор-6, 11-дигидро-5H-бензо[5,6]циклогепта[1,2-b]пиридин-11-ил]-1-пиперидинил]-2-оксоэтил]-пиперидинкарбоксамид, типифарниб,
- 25) интерфероны, такие как интрон А, ПегИнтрон,
- 26) антитела против erbB1, такие как цетуксимаб, панитумумаб,
- 27) антитела против erbB2, такие как трастузумаб,
- 28) антитела против CD52, такие как алемтузумаб,
- 29) антитела против CD20, такие как ритуксимаб,

- 30) антитела против CD33, такие как гемтузумаба озогамидин,
 31) антитела против VEGF, такие как авастин,
 32) лиганды TRIAL, такие как лексатумумаб, мапатумумаб и AMG-655,
 33) антитела против CTLA-4, такие как ипилимумаб,
 34) антитела против CTA1, CEA, CD5, CD19, CD22, CD30, CD44, CD44V6, CD55, CD56, EpCAM, FAP, МНСII, HGF, IL-6, MUC1, PSMA, TAL6, TAG-72, TRAILR, VEGFR, IGF-2, FGF,
 35) антитела против IGF-1R, такие как далотузумаб (МК-0646) и робатумумаб (SCH 717454).

Термин "модуляторы рецептора эстрогенов" относится к соединениям, которые препятствуют или ингибируют связывание эстрогена с рецептором независимо от механизма. Примеры модуляторов рецептора эстрогенов включают, но не ограничены перечисленными: тамоксифен, ралоксифен, идоксифен, LY353381, LY117081, торемифен, фулвестрант, 4-[7-(2,2-диметил-1-оксопропокси-4-метил-2-[4-[2-(1-пиперидинил)этокси]фенил]-2Н-1-бензопиран-3-ил]-фенил-2,2-диметилпропаноат, 4,4'-дигидроксibenзофенон-2,4-динитрофенил-гидразон и SH646.

Термин "модуляторы рецептора андрогенов" относится к соединениям, которые препятствуют или ингибируют связывание андрогенов с рецептором независимо от механизма. Примеры модуляторов рецептора андрогенов включают финастерид и другие ингибиторы 5 α -редуктазы, нилутамид, флутамид, бикалутамид, лиарозол и абиратерона ацетат.

Термин "модуляторы рецептора ретиноидов" относится к соединениям, которые препятствуют или ингибируют связывание ретиноидов с рецептором независимо от механизма. Примеры таких модуляторов рецептора ретиноидов включают бексаротен, третиноин, 13-цис-ретиноевую кислоту, 9-цис-ретиноевую кислоту, α -дифторметилорнитин, ILX23-7553, транс-N-(4'-гидроксифенил)ретинамид и N-4-карбоксихенилретинамид.

"Цитотоксические/цитостатические агенты" относятся к соединениям, которые индуцируют гибель клеток или ингибируют пролиферацию клеток, главным образом, путем непосредственного препятствования функционированию клетки, или ингибируют или препятствуют митозу клетки, включая алкилирующие агенты, факторы некроза опухоли, интеркаляторы, активируемые гипоксией соединения, ингибиторы микротрубочек/стабилизирующие микротрубочки агенты, ингибиторы митотических кинезинов, ингибиторы гистоновых дезацетилаз, ингибиторы киназ, участвующих в продвижении по митотическому делению, ингибиторы киназ, участвующих в путях передачи сигналов фактора роста и цитокинов, анти-метаболиты, модификаторы биологического ответа, гормональные/антигормональные терапевтические агенты, гематопэтические факторы роста, агенты для таргетной терапии на основе моноклональных антител, ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы протеасомы, ингибиторы убиквитинлигазы и ингибиторы киназы аутофага.

Примеры цитотоксических/цитостатических агентов включают, но не ограничены перечисленными: координационные соединения платины, сертенеф, кахектин, ифосфамид, тазонермин, лонидамин, карбоплатин, алтретамин, преднимустин, дибромдулцитол, ранимустин, фотемустин, недаплатин, оксалиплатин, темозоломид, гептаплатин, эстрамустин, импросульфантиозилат, трюфосфамид, нимустин, диброспидия хлорид, пумитепа, лобаплатин, сатраплатин, профиромицин, цисплатин, ирофулвен, дексифосфамид, цис-аминдихлор(2-метилпиридин)платину, бензилгуанин, глүфосфамид, GPX100, (транс, транс, транс)-бис-мю-(гексан-1,6-диамин)-мю-[диамин-платина(II)]бис[диамин(хлор)платина(II)]тетрахлорид, диаризидинилспермин, триоксид мышьяка, 1-(11-додециламино-10-гидроксиундецил)-3,7-диметилксантин, зорубицин, идарубицин, даунорубицин, бизантрин, митоксантрон, пирарубицин, пинафид, валрубицин, амрубицин, антинеопластон, 3'-деамино-3'-морфолино-13-деоксо-10-гидроксикарминомицин, аннамидин, галарубицин, элинафид, MEN10755, 4-деметокси-3-деамино-3-азиридинил-4-метилсульфонил-даунорубицин (см. WO 00/50032).

Примером активируемого гипоксией соединения является тирапазамин.

Примеры ингибиторов протеасом включают, но не ограничены перечисленными: лактактин и MLN-341 (велкейд).

Примеры ингибиторов микротрубочек/стабилизирующих микротрубочки агентов обычно включают таксаны. Конкретные соединения включают паклитаксел (таксол®), виндезина сульфат, 3',4'-дидегидро-4'-дезоксид-8'-норвинкалейкобластин, доцетаксол (таксотер®), ризоксин, доластатин, мивобулин изетионат, ауристатин, цемадотин, RPR109881, BMS184476, винфлуниин, криптофицин, 2,3,4,5,6-пентафтор-N-(3-фтор-4-метоксифенил)бензолсульфонамид, ангидровинбластин, N,N-диметил-L-валил-L-валил-N-метил-L-валил-L-пролил-L-пролин-трет-бутиламид, TDX258, эпотилоны (см., например, патенты США № 6284781 и 6288237) и BMS188797.

Некоторые примеры ингибиторов топоизомеразы представляют собой топотекан, гикаптамин, иринотекан, рубитекан, 6-этоксипропионил-3',4'-О-экзо-бензилиден-чартреузин, 9-метокси-N,N-диметил-5-нитропиразоло[3,4,5-k1]акридин-2-(6H) пропанамин, 1-амино-9-этил-5-фтор-2,3-дигидро-9-гидрокси-4-метил-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':b,7]-индолизино[1,2-b]хинолин-10,13(9H,15H)дион, луртотекан, 7-[2-(N-изопропиламино)этил]-(20S)камптотецин, BNP1350, BNPI1100, BN80915, BN80942, этопозида фосфат, тенипозид, собузоксан, 2'-диметиламино-2'-дезоксизтопозид, GL331, N-[2-(диметиламино)этил]-

9-гидрокси-5,6-диметил-6Н-пиридо[4,3-*b*]карбазол-1-карбоксамид, асулакрин, (5а,5аВ,8аа,9b)-9-[2-[N-[2-(диметиламино)этил]-N-метиламино]этил]-5-[4-гидроокси-3,5-диметоксифенил]-5,5а,6,8,8а,9-гексогидрофуоро(3',4':6,7)нафто(2,3-*d*)-1,3-диоксол-6-он, 2,3-(метилendioкси)-5-метил-7-гидрокси-8-метоксибензо[с]-фенантридиний, 6,9-бис[(2-аминоэтил)амино]бензо[*g*]изохинолин-5,10-дион, 5-(3-аминопропиламино)-7,10-дигидрокси-2-(2-гидроксиэтиламинометил)-6Н-пиразоло[4,5,1-*de*]акридин-6-он, N-[1-[2(диэтиламино)этиламино]-7-метокси-9-оксо-9Н-тиоксантен-4-илметил]формамид, N-(2-(диметиламино)этил)акридин-4-карбоксамид, 6-[[2-(диметиламино)этил]амино]-3-гидрокси-7Н-индено[2,1-*c*]хинолин-7-он и димесна.

Примеры ингибиторов митотических кинезинов и, в частности, митотического кинезина KSP человека описаны в публикациях WO03/039460, WO03/050064, WO03/050122, WO03/049527, WO03/049679, WO03/049678, WO04/039774, WO03/079973, WO03/099211, WO03/105855, WO03/106417, WO04/037171, WO04/058148, WO04/058700, WO04/126699, WO05/018638, WO05/019206, WO05/019205, WO05/018547, WO05/017190, US2005/0176776. В некотором варианте реализации ингибиторы митотических кинезинов включают, но не ограничены перечисленными: ингибиторы KSP, ингибиторы MKLP1, ингибиторы CENP-E, ингибиторы MCKA и ингибиторы Rab6-KIFL.

Примеры "ингибиторов гистоновых дезацетилаз" включают, но не ограничены перечисленными: SAHA, TSA, оксамфлатин, PXD101, MG98 и скриптаид. Дополнительное описание других ингибиторов гистоновых дезацетилаз можно найти в следующей рукописи: Miller, T.A. и др. *J. Med. Chem.* 46(24):5097-5116(2003).

"Ингибиторы киназ, участвующих в продвижении по митотическому делению" включают, но не ограничены перечисленными: ингибиторы киназы аутога, ингибиторы подобных Polo киназ (PLK; в частности, ингибиторы PLK-1), ингибиторы bub-1 и ингибиторы bub-R1. Примером "ингибитора киназы аутога" является VX-680.

"Антипролиферативные агенты" включают антисмысловые РНК- и ДНК-олигонуклеотиды, такие как G3139, ODN698, RVASKRAS, GEM231 и INX3001, и антиметаболиты, такие как эноцитабин, кармофур, тегафур, пентостатин, доксифлуридин, триметрексат, флударабин, капецитабин, галоцитабин, цитарабин оксфосфат, фостеабин натрия гидрат, ралтитрексид, палтитрексид, эмитефур, тиазофуридин, децитабин, нолатрексид, пеметрексед, нелзарабин, 2'-дезоксиде-2'-метилиденцитидин, 2'-фторметилден-2'-дезоксидецитидин, N-[5-(2,3-дигидробензофурил)сульфонил]-N'-(3,4-дихлорфенил)мочевина, N6-[4-дезоксиде-4-[N2-[2(E),4(E)-тетрадекадиеноил]глициламино]-L-глицеро-В-L-манногептопиранозил]аденин, аплидин, эктеинасцидин, троксацитабин, 4-[2-амино-4-оксо-4,6,7,8-тетрагидро-3Н-пиримидино[5,4-*b*][1,4]тиазин-6-ил-(S)-этил]-2,5-тиеноил-L-глутаминовая кислота, аминокперин, 5-флуороурацил, аланозин, 11-ацетил-8-(карбамоилоксиметил)-4-формил-6-метокси-14-окса-1,11-диазатетрацикло(7,4,1,0,0)-тетрадека-2,4,6-триен-9-иловый сложный эфир уксусной кислоты, свайнсонин, лометрексол, дексразоксан, метиониназа, 2'-циано-2'-дезоксиде-N4-пальмитоил-1-В-D-арабинофуранозила цитозин, 3-аминопиридин-2-карбоксальдегидтиосемикарбазон и трастузумаб.

Примеры агентов для таргетной терапии на основе моноклональных антител включают такие терапевтические агенты, в которых цитотоксические агенты или радиоактивные изотопы присоединены к моноклональному антителу, специфичному к раковой клетке или специфичному к целевой клетке. Примеры включают бекскасар.

"Ингибитор пренилпротеинтрансферазы" относится к соединению, которое ингибирует любой один или любую комбинацию ферментов пренилпротеинтрансфераз, включая фарнезилпротеинтрансферазу (ФПТазу), геранилгеранилпротеинтрансферазу типа I (ГПТазу-I) и геранилгеранилпротеинтрансферазу типа II (ГПТазу-II, также называемую Rab-ГПТазой).

Примеры ингибиторов пренилпротеинтрансфераз можно найти в следующих публикациях и патентах: WO 96/30343, WO 97/18813, WO 97/21701, WO 97/23478, WO 97/38665, WO 98/28980, WO 98/29119, WO 95/32987, патенте США № 5420245, патенте США № 5523430, патенте США № 5532359, патенте США № 5510510, патенте США № 5589485, патенте США № 5602098, публикации европейского патента 0618221, публикации европейского патента 0675112, публикации европейского патента 0 604 181, публикации европейского патента 0 696 593, WO 94/19357, WO 95/08542, WO 95/11917, WO 95/12612, WO 95/12572, WO 95/10514, патенте США № 5661152, WO 95/10515, WO 95/10516, WO 95/24612, WO 95/34535, WO 95/25086, WO 96/05529, WO 96/06138, WO 96/06193, WO 96/16443, WO 96/21701, WO 96/21456, WO 96/22278, WO 96/24611, WO 96/24612, WO 96/05168, WO 96/05169, WO 96/00736, патенте США № 5571792, WO 96/17861, WO 96/33159, WO 96/34850, WO 96/34851, WO 96/30017, WO 96/30018, WO 96/30362, WO 96/30363, WO 96/31111, WO 96/31477, WO 96/31478, WO 96/31501, WO 97/00252, WO 97/03047, WO 97/03050, WO 97/04785, WO 97/02920, WO 97/17070, WO 97/23478, WO 97/26246, WO 97/30053, WO 97/44350, WO 98/02436 и патенте США № 5532359. Для примера роли ингибитора пренилпротеинтрансферазы в ангиогенезе см. European J. of Cancer, том 35, № 9, с. 1394-1401 (1999).

Термин "ингибиторы ангиогенеза" относится к соединениям, которые ингибируют образование новых кровеносных сосудов независимо от механизма. Примеры ингибиторов ангиогенеза включают, но не ограничены перечисленными: ингибиторы тирозинкиназы, такие как ингибиторы тирозинкиназных рецепторов Flt-1 (VEGFR1) и Flk-1/KDR (VEGFR2), ингибиторы эпидермальных факторов роста, факторов

роста фибробластов или тромбоцитов, ингибиторы MMP (матриксной металлопротеиназы), блокатор интегрин, интерферон- α , интерлейкин-12, полисульфат пентозана, ингибиторы циклооксигеназы, включая нестероидные противовоспалительные средства (НПВП), такие как аспирин и ибупрофен, а также селективные ингибиторы циклооксигеназы-2, такие как цефекоксиб и рофекоксиб (PNAS, том 89, с. 7384 (1992); JNCI, том 69, с. 475 (1982); Arch. Ophthalmol, том 108, с. 573 (1990); Anal Rec, том 238, с. 68 (1994); FEBS Letters, том 372, с. 83 (1995); Clin. Orthop. том 313, с. 76 (1995); J. Mol. Endocrinol, том 16, с. 107 (1996); Jpn. J. Pharmacol, том 75, с. 105 (1997); Cancer Res., том 57, с. 1625 (1997); Cell, том 93, с. 705 (1998); Intl. J. Mol. Med., том 2, с. 715 (1998); J. Biol. Chem., том 274, с. 9116 (1999)), стероидные противовоспалительные средства (такие как кортикостероиды, минералокортикоиды, дексаметазон, преднизон, преднизолон, метилпред, бетаметазон), карбоксиамидотриазол, комбретастин А-4, скваламин, 6-О-хлорацетилкарбонилфумагиллол, талидомид, ангиостатин, тропонин-1, антагонисты ангиотензина II (см. Fernandez и др., J. Lab. Clin. Med. 105: 141-145 (1985)) и антитела к VEGF (см. Nature Biotechnology, том 17, с. 963-968 (October 1999); Kim и др., Nature, 362, 841-844 (1993); WO 00/44777 и WO 00/61186).

Другие примеры ингибиторов ангиогенеза включают, но не ограничены перечисленными: эндостатин, украин, ранпирназу, IM862, 5-метокси-4-[2-метил-3-(3-метил-2-бутенил)оксиранил]-1-оксаспиро[2,5]окт-6-ил(хлорацетил)карбамат, ацетилдинаналин, 5-амино-1-[[3,5-дихлор-4-(4-хлорбензоил)фенил]метил]-1Н-1,2,3-триазол-4-карбоксамид, SM101, скваламин, комбретастин, RP14610, NX31838, сульфатизированный маннопентаозфосфат, 7,7-(карбонил-бис[имино-N-метил-4,2-пирролокарбонилимино[N-метил-4,2-пиррол]карбонилимино]-бис-(1,3-нафталиндисульфат) и 3-[(2,4-диметилпиррол-5-ил)метилен]-2-индолинон (SU5416).

Другие терапевтические агенты, которые модулируют или ингибируют ангиогенез и также могут применяться в комбинации с соединениями согласно настоящему изобретению, включают агенты, которые модулируют или ингибируют системы свертывания крови и фибринолиза (обзор см. в Clin. Chem. La. Med. 38:679-692 (2000)). Примеры таких агентов, которые модулируют или ингибируют пути свертывания крови и фибринолиза, включают, но не ограничены перечисленными: гепарин (см. Thromb. Haemost. 80:10-23 (1998)), низкомолекулярные гепарины и ингибиторы карбоксипептидазы U (также известные как ингибиторы активного ингибитора активируемого тромбином фибринолиза [ТАF1а]) (см. Thrombosis Res. 101:329-354 (2001)). Ингибиторы ТАF1а были описаны в заявках США, серийный номер 60/310927 (поданной 8 августа 2001 г.) и 60/349925 (поданной 18 января 2002 г.)

"Агенты, которые препятствуют контрольным точкам клеточного цикла", относятся к соединениям, которые ингибируют протеинкиназы, которые передают сигналы контрольных точек клеточного цикла, тем самым сенсibiliзуя раковую клетку к повреждающим ДНК агентам. Такие агенты включают ингибиторы киназ ATR, ATM, CHK1 и CHK2 и ингибиторы киназ cdk и cdc, и, в частности, примерами таких агентов служат 7-гидроксистауроспорин, флавопиридол, CYC202 (Cyclacel) и BMS-387032.

"Агенты, которые препятствуют рецепторным тирозинкиназам (RTK)", относятся к соединениям, которые ингибируют RTK и, следовательно, механизмы, вовлеченные в онкогенез и прогрессирование опухоли. Такие агенты включают ингибиторы c-Kit, Eph, PDGF, Flt3 и c-Met. Дополнительные агенты включают ингибиторы RTK, описанные у Bume-Jensen и Hunter, Nature, 411:355-365, 2001.

"Ингибиторы пути передачи сигнала пролиферации клеток и выживаемости" относятся к соединениям, которые ингибируют сигнальные каскады от рецепторов на поверхности клетки. Такие агенты включают ингибиторы серин/треонинкиназ (включая, но не ограничиваясь ингибиторами Akt, такими как описанные в WO 02/083064, WO 02/083139, WO 02/083140, US 2004-0116432, WO 02/083138, US 2004-0102360, WO 03/086404, WO 03/086279, WO 03/086394, WO 03/084473, WO 03/086403, WO 2004/041162, WO 2004/096131, WO 2004/096129, WO 2004/096135, WO 2004/096130, WO 2005/100356, WO 2005/100344, US 2005/029941, US 2005/44294, US 2005/43361, 60/734188, 60/652737, 60/670469), ингибиторами киназы Raf (например, PLX-4032), ингибиторами MEK (например, Argy-162, RO-4987655 и GSK-1120212), ингибиторами mTOR (например, AZD-8055, BEZ-235 и эверолимусом) и ингибиторами PI3K (например, GDC-0941, BKM-120).

Используемый выше термин "блокаторы интегрин" относится к соединениям, которые селективно антагонизируют, ингибируют или противодействуют связыванию физиологического лиганда с интегрином $\alpha_v\beta_3$, к соединениям, которые избирательно антагонизируют, ингибируют или противодействуют связыванию физиологического лиганда с интегрином $\alpha_v\beta_3$, к соединениям, которые антагонизируют, ингибируют или противодействуют связыванию физиологического лиганда как с интегрином $\alpha_v\beta_3$, так и с интегрином $\alpha_v\beta_5$, и к соединениям, которые антагонизируют, ингибируют или противодействуют активности конкретного(ых) интегрин(ов), экспрессированного(ых) на эндотелиальных клетках капилляра. Термин также относится к антагонистам интегрин $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, и $\alpha_6\beta_4$. Термин также относится к антагонистам любой комбинации интегрин $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ и $\alpha_6\beta_4$.

Некоторые конкретные примеры ингибиторов тирозинкиназы включают N-(трифторметилфенил)-5-метилизоксазол-4-карбоксамид, 3-[(2,4-диметилпиррол-5-ил)метилденил]индолин-2-он, 17-(аллиламино)-17-деметоксигелданамицин, 4-(3-хлор-4-фторфениламино)-7-метокси-6-[3-(4-

морфолинил)пропоксил]хиназолин, N-(3-этинилфенил)-6,7-бис(2-метоксиэтокси)-4-хиназолинамин, BIBX1382, 2,3,9,10,11,12-гексагидро-10-(гидроксиметил)-10-гидрокси-9-метил-9,12-эпокси-1H-диндоло[1,2,3-fg:3',2',1'-k1]пирроло[3,4-i][1,6]бензодиазоцин-1-он, SH268, генистеин, STI571, CEP2563, 4-(3-хлорфениламино)-5,6-диметил-7H-пирроло[2,3-d]пиримидинметан сульфат, 4-(3-бром-4-гидроксифенил)амино-6,7-диметоксихиназолин, 4-(4'-гидроксифенил)амино-6,7-диметоксихиназолин, SU6668, STI571A, N-4-хлорфенил-4-(4-пиридилметил)-1-фталазинамин NEMD121974.

Комбинации заявленных в настоящей заявке антител или антигенсвязывающих фрагментов с агонистами PPAR- γ (т.е. PPAR-гамма) и агонистами PPAR- δ (т.е. PPAR-дельта) могут быть полезны для лечения некоторых злокачественных новообразований. PPAR- γ и PPAR- δ представляют собой ядерные рецепторы γ и δ , активируемые пролифераторами пероксисом. Экспрессия PPAR- γ на эндотелиальных клетках и их участие в ангиогенезе было описано в литературе (см. J. Cardiovasc. Pharmacol. 1998; 31: 909-913; J. Biol. Chem. 1999; 274: 9116-9121; Invest. Ophthalmol Vis. Sci. 2000; 41: 2309-2317). Совсем недавно, было показано, что агонисты PPAR- γ ингибируют ангиогенный ответ на VEGF in vitro: малеат как троглитазона, так и росиглитазона ингибирует развитие неоваскуляризации сетчатки у мышей (Arch. Ophthalmol. 2001; 119: 709-717). Примеры агонистов PPAR- γ и агонистов PPAR- γ/α включают, но не ограничены перечисленными: линпарзу®, рукапариб®, талазопариб®, нирапариб, велипариб®, тиазолидиндионы (такие как DRF2725, CS-011, троглитазон, росиглитазон и пиоглитазон), фенофибрат, гемфиброзил, клофибрат, GW2570, SB219994, AR-H039242, JTT-501, MCC-555, GW2331, GW409544, NN2344, KRP297, NP0110, DRF4158, NN622, GI262570, PNU182716, DRF552926, 2-[(5,7-дипропил-3-трифторметил-1,2-бензизоксазол-6-ил)окси]-2-метилпропионовую кислоту и 2(R)-7-(3-(2-хлор-4-(4-фторфенокси)фенокси)пропокси)-2-этилхроман-2-карбоновую кислоту.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению также могут быть полезны для лечения или предотвращения рака молочной железы в комбинации с ингибиторами ароматазы. Примеры ингибиторов ароматазы включают, но не ограничены перечисленными: анастрозол, летрозол и экземестан.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению также может быть полезен для лечения рака в комбинации со следующими химиотерапевтическими агентами: абареликс (пленаксис депо®); альдеслейкин (прокин®); альдеслейкин (пролейкин®); алемтузумаб (кэмпас®); алитретиноин (панретин®); аллопуринол (зилоприм®); алтретамин (гексален®); амифостин (этиол®); анастрозол (аримидекс®); триоксид мышьяка (тризенокс®); аспарагиназа (элспар®); азациитидин (вайдаза®); бендамустина гидрохлорид (треанда®); бевацизумаб (авастин®); капсулы бексаротен (таргретин®); гель бексаротен (таргретин®); блеомицин (бленоксан®); бортезомиб (велкейд®); брэфельдин А; бусульфан внутривенный (бусульфекс®); бусульфан пероральный (милеран®); калустерон (метосарб®); капецитабин (кселода®); карбоплатин (параплатин®); кармустин (BCNU®, ViCNU®); кармустин (глиадел®); кармустин с полифепросаном 20, имплантат (глиадел вафер®); целекоксиб (целебрекс®); цетуксимаб (эрбитукс®); хлорамбуцил (лейкеран®); цисплатин (платинол®); кладрибин (леустатин®, 2-CdA®); клофарабин (клолар®); циклофосфамид (цитоксан®, неозар®); циклофосфамид (цитоксан инъекционный®); циклофосфамид (цитоксан таблетка®); цитарабин (цитозар-U®); цитарабин липосомальный (депоцит®); дакарбазин (DTIC-дом®); дактиномицин, актиномицин D (космеген®); далтепарин натрия инъекционный (фрагмин®); даратумумаб (дарзалекс®); дарбэпозтин альфа (аранесп®); дазатиниб (спрайсел®); даунорубицин липосомальный (даунозом®); даунорубицин, дауномицин (даунорубицин®); даунорубицин, дауномицин (церубидин®); дегареликс (фирмагон®); денилейкин дифтитокс (онтак®); дексразоксан (зинекард®); дексразоксана гидрохлорид (тотект®); дидемнин В; 17-DMAG; доцетаксел (таксотер®); доксорубицин (адриамицин PFS®); доксорубицин (адриамицин®, рубекс®); доксорубицин (адриамицин PFS инъекционный®); доксорубицин липосомальный (доксил®); дромостанолон пропионат (дромостанолон®); дромостанолон пропионат (мастерон инъекционный®); экулизумаб инъекционный (солирис®); раствор Эллиота В (раствор ЭллиотаВ®); элтромбопаг (промакта®); эпирубицин (эленс®); эпоэтин альфа (эпоген®); эрлотиниб (тарцева®); эстрамустин (эмцит®); этинилэстрадиол, этопозида фосфат (этопозид®); этопозид, VP-16 (вепезид®); эверолимус таблетки (афинитор®); экземестан (аромазин®); ферумокситол (ферагем инъекционный®); филграстим (нейпоген®); флоксуридин (интраартериальный) (FUDR®); флударабин (флудара®); фторурацил, 5-FU (адруцил®); фулвестрант (фазлодекс®); гефитиниб (пресса®); гелданамицин, гемцитабин (гемзар®); гемтузумаб озогомицин (мило-тарг®); гозерелин ацетат (золадекс имплантат®); гозерелина ацетат (золадекс®); гистрелина ацетат (гистрелин имплантат®); гидроксимочевина (гидреа®); ибритумомаб тиуксетан (зевалин®); идарубицин (идамицин®); ифосфамид (IFEX®); иматиниба мезилат (гливек®); интерферон альфа 2a (роферон А®); интерферон альфа-2b (интрон А®); йобенгуан I 123 инъекционный (адревью®); иринотекан (камптозар®); иксабепилон (иксемпра®); лапатиниб таблетки (тайкерб®); леналидомид (ревлид®); летрозол (фемара®); лейковорин (велковорин®, лейковорин®); лейпролида ацетат (элигард®); левамизол (эргамизол®); ломустин, CCNU (СееBU®); мехлорэтамин, азотистый иприт (мустарген®); мегестро-

ла ацетат (мегейс®); мелфалан, L-РАМ (алкеран®); меркаптопурин, 6-МР (пуринтол®); месна (меснекс®); месна (меснекс табс®); метотрексат (метотрексат®); метоксален (увадекс®); 8-метоксипсорален; митомицин С (мутамицин®); митотан (лизодрен®); митоксантрон (новантрон®); митрамицин; нандролон фенилпропионат (дураболин-50®); неларабин (арранон®); нилотиниб (тасигна®); нофетумомаб (верлума®); офатумумаб (арзерра®); опрелвекин (ньюмега®); оксалиплатин (элоксатин®); паклитаксел (паксен®); паклитаксел (таксол®); связанные с белком частицы паклитаксела (абраксан®); палифермин (кепиванс®); памидронат (аредиа®); панитумумаб (вектибикс®); пазопаниб таблетки (вотриент®); пегадемаза (адаген (пегадемаза бычья)®); пэгаспаргаза (онкаспар®); пэгфилграстим (неуласта®); пеметрексед динатрия (алимта®); пентостатин (нипент®); пипоброман (верцит®); плериксафор (мозобаил®); пликамицин, митрамицин (митрацин®); порфимер натрия (фотофрин®); пралатрексат инъекционный (фолотин®); прокарбазин (матулан®); хинакрин (атабрин®); рапамицин; расбуриказа (элитек®); ралоксифена гидрохлорид (эвиста®); ритуксимаб (ритуксан®); ромидепсин (истодакс®); ромиплостим (энплейт®); сарграмостим (лейкин®); сарграмостим (прокин®); сорафениб (нексавар®); стрептозоцин (заносар®); сунитиниба малеат (сугент®); тальк (склерозол®); тамоксифен (нолвадекс®); темозоломид (темодар®); темсиролимус (торизел®); тенипозид, VM-26 (вумон®); тестолактон (теслак®); тиогуанин, 6-TG (тиогуанин®); тиопурин; тиотепа (тиоплекс®); топотекан (гикамтин®); торемифен (фарестон®); тозитумомаб (бексксар®); тозитумомаб-131, тозитумомаб (бексксар®); трансретиноевая кислота; трастузумаб (герцептин®); третиноин, АТРА (весаноид®); триэтиленмеламин; урациловый иприт (урациловый иприт капсулы®); валрубицин (валстар®); винбластин (велбан®); винкристин (онковин®); винорелбин (навельбин®); вориностат (золинза®); вортманнин и золедронаат (зомета®).

В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело против SIRP α или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению находится в сочетании с одним или более противорвотными средствами, включая, но не ограничиваясь перечисленными: казопитант (GlaxoSmithKline), нетупитант (MGI-Helsinn) и другие антагонисты рецептора NK-1, палоносетрон (реализуемый как Алокси от MGI Pharma), апрепитант (реализуемый как эменд от Merck & Co.; Рауэй, Нью-Джерси), дифенгидрамин (реализуемый как бенадрил® от Pfizer; Нью-Йорк, Нью-Йорк), гидроксизин (реализуемый как атаракс® от Pfizer; Нью-Йорк, Нью-Йорк), метоклопрамид (реализуемый как реглан® от AN Robins Co; Ричмонд, Виргиния), лоразепам (реализуемый как ативан® от Wyeth; Мадисон, Нью-Джерси), алпразолам (реализуемый как ксанакс® от Pfizer; Нью-Йорк, Нью-Йорк), галоперидол (реализуемый как галдол® от Ortho-McNeil; Паритан, Нью-Джерси), дроперидол (инапсин®), дронабинол (реализуемый как маринол® от Solvay Pharmaceuticals, Inc.; Мариетта, Джорджия), дексаметазон (реализуемый как декадрон® от Merck & Co.; Рауэй, Нью-Джерси), метилпреднизолон (реализуемый как медрол® от Pfizer; Нью-Йорк, Нью-Йорк), прохлорперазин (реализуемый как компазин® от Glaxosmithkline; Парк Исследовательский треугольник, Северная Каролина), гранисетрон (реализуемый как китрил® от Hoffmann-La Roche Inc.; Натли, Нью-Джерси), ондансетрон (реализуемый как зофран® от Glaxosmithkline; Парк Исследовательский треугольник, Северная Каролина), доласетрон (реализуемый как анземет® от Sanofi-Aventis; Нью-Йорк, Нью-Йорк), трописетрон (реализуемый как навобан® от Novartis; Ист Ганновер, Нью-Джерси).

Другие побочные действия от лечения рака включают недостаточность красных и белых клеток крови. Соответственно, в одном варианте реализации настоящего изобретения антитело против SIRP α или его антигенсвязывающий фрагмент находится в сочетании с агентом, который лечит или предотвращает такую недостаточность, таким как, например, филграстим, ПЭГ-филграстим, эритропоэтин, эпоэтин альфа или дарбэпоэтин альфа.

В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело против SIRP α или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению вводят в сочетании с противораковой лучевой терапией. Например, в одном варианте реализации настоящего изобретения лучевая терапия представляет собой дистанционную лучевую терапию (ЕВТ): способ доставки пучка рентгеновских лучей высоких энергий в местонахождение опухоли. Луч генерируют снаружи пациента (например, с помощью линейного ускорителя) и направляют в очаг опухоли. Данные рентгеновские лучи могут уничтожить раковые клетки, и тщательное планирование лечения позволяет сберечь окружающие нормальные ткани. Никакие радиоактивные источники не помещают внутрь организма пациента. В одном варианте реализации настоящего изобретения лучевая терапия представляет собой протонную лучевую терапию: тип конформной терапии, при которой больную ткань бомбардируют протонами вместо рентгеновских лучей. В одном варианте реализации настоящего изобретения лучевая терапия представляет собой конформную дистанционную лучевую терапию: процедуру, в которой применяют передовую технологию, чтобы адаптировать лучевую терапию для структур тела индивида. В одном варианте реализации настоящего изобретения лучевая терапия представляет собой брахитерапию: временное помещение радиоактивных материалов внутрь организма, обычно используемое для доставки дополнительной дозы - или очаговой

дозы - радиации в данную область.

В одном варианте реализации настоящего изобретения хирургическая процедура, которую проводят в сочетании с антителом против SIRP α или его антигенсвязывающим фрагментом, представляет собой хирургическую туморэктомию.

Применения в экспериментах и для диагностики.

Антитела против SIRP α и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, можно применять в качестве агентов для аффинной очистки. В данном процессе антитела против SIRP α и их антигенсвязывающие фрагменты иммобилизуют на твердой фазе, такой как смола из сефадекса, стекла или агарозы или фильтровальная бумага, применяя способы, хорошо известные в данной области. Иммобилизованное антитело или фрагмент приводят в контакт с образцом, содержащим белок SIRP α (или его фрагмент), который нужно очистить, и после этого подложку промывают подходящим растворителем, который удалит по существу весь содержащийся в образце материал, кроме белка SIRP α , который связан с иммобилизованным антителом или фрагментом. Наконец, подложку промывают растворителем, который элюирует связанный SIRP α (например, белком А). Такие иммобилизованные антитела и фрагменты входят в объем настоящего изобретения.

Дополнительно предложены антигены для получения вторичных антител, которые пригодны, например, для проведения анализов вестерн-блот и других иммуноанализов, которые обсуждаются в данном изобретении.

Антитела против SIRP α (например, гуманизированные антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты также могут быть полезны в диагностических анализах для выявления белка SIRP α , например, обнаружения его экспрессии в определенных клетках, тканях или сыворотке, например, в миелоидных клетках, таких как моноциты, макрофаги, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы и дендритные клетки. Такие диагностические способы могут быть полезны для диагностики различных заболеваний.

В объем настоящего изобретения входит анализ ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), включающий применение антитела против SIRP α или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном изобретении.

Например, такой способ включает следующие этапы:

(a) покрыть субстрат (например, поверхность лунки микротитрационного планшета, например, пластикового планшета) антителом против SIRP α или его антигенсвязывающим фрагментом;

(b) нанести образец, в котором необходимо исследовать присутствие SIRP α , на субстрат;

(c) промыть планшет, чтобы удалить несвязанный материал из образца;

(d) нанести меченые детектируемой меткой антитела (например, связанные с ферментом антитела), которые также специфичны к антигену SIRP α ;

(e) промыть субстрат, чтобы удалить несвязанные меченые антитела;

(f) если меченые антитела связаны с ферментом, то нанести химическое вещество, которое фермент превращает в флуоресцентный сигнал; и

(g) детектировать присутствие меченого антитела.

Обнаружение метки, связанной с субстратом, свидетельствует о присутствии белка SIRP α .

В дополнительном варианте реализации меченое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент помечен пероксидазой, которая реагирует с АБТС (например, 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислотой)) или 3,3',5,5'-тетраметилбензидином, чтобы вызвать изменение цвета, которое можно детектировать. В качестве альтернативы меченое антитело или фрагмент помечено детектируемым радиоактивным изотопом (например, ³H), который можно детектировать с помощью сцинтилляционного счетчика в присутствии сцинтиллятора.

Антитело против SIRP α или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению можно применять в процедуре вестерн-блоттинга или белкового иммуноблоттинга. Такая процедура входит в объем настоящего изобретения и включает, например:

(1) необязательный перенос белков из образца, в котором необходимо исследовать присутствие SIRP α (например, из электрофоретического разделения в ПААГ или ПААГ/ДСН белков в образце), на мембрану или другой твердый субстрат, применяя способ, известный в данной области (например, полусухой блоттинг или блоттинг в резервуаре (Tank-блоттинг)); приведение в контакт мембраны или другого твердого субстрата, в котором необходимо исследовать присутствие связанного SIRP α или его фрагмента, с антителом против SIRP α или его антигенсвязывающим фрагментом согласно настоящему изобретению.

(2) промывку мембраны один или несколько раз, чтобы удалить не связанное антитело против SIRP α или его фрагмент и другие не связанные вещества; и

(3) детектирование связанного антитела против SIRP α или его фрагмента.

Такая мембрана может быть в виде нитроцеллюлозной мембраны или мембраны на основе винила (например, поливинилиденфторида (ПВДФ)), на которую перенесли белки, в которых необходимо исследовать присутствие SIRP α , из неденатурирующего ПААГ (электрофорез в полиакриламидном геле)

или ПААГ/ДСН (электрофорез в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия) (например, после электрофоретического разделения в геле). Перед приведением в контакт мембраны с антителом против SIRP α или его фрагментом, указанную мембрану необязательно блокируют, например, обезжиренным сухим молоком или тому подобным, чтобы связать сайты неспецифического связывания белков на мембране.

Детектирование связанного антитела или фрагмента свидетельствует о том, что белок SIRP α присутствует на мембране или субстрате и в образце. Детектирование связанного антитела или фрагмента можно осуществить путем связывания указанного антитела или фрагмента со вторичным антителом (антителом против иммуноглобулинов), которое помечено детектируемой меткой, а затем обнаружения присутствия вторичного антитела.

Антитела против SIRP α и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, также можно применять для иммуногистохимии. Такой способ входит в объем настоящего изобретения и включает, например,

(1) приведение в контакт клетки (например, образца, содержащего миелоидные клетки, такие как моноциты, макрофаги, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы и дендритные клетки), в которой необходимо проверить присутствие белка SIRP α , с антителом против SIRP α или его антигенсвязывающим фрагментом согласно настоящему изобретению; и

(2) обнаружение антитела или фрагмента на клетке или в клетке.

Если сами антитело или фрагмент помечены детектируемой меткой, то их можно детектировать напрямую. В качестве альтернативы, антитело или фрагмент может быть связано меченым детектируемой меткой вторичным антителом, которое детектируют.

Некоторые антитела против SIRP α и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, также можно применять для визуализации опухоли *in vivo*. Такой способ может включать инъекцию меченого радиоактивной меткой антитела против SIRP α или его антигенсвязывающего фрагмента в организм пациента, в котором необходимо проверить присутствие опухоли, ассоциированной с экспрессией SIRP α (например, которая экспрессирует SIRP α , например, на поверхности опухолевой клетки), с последующей радионуклидной визуализацией организма пациента, чтобы детектировать присутствие меченого антитела или фрагмента, например, в локусах, содержащих высокую концентрацию антитела или фрагмента, которые связаны с опухолью. Обнаружение локусов свидетельствует о присутствии SIRP α^+ опухоли и опухолевых клеток.

Методики визуализации включают визуализацию ОФЭКТ (однофотонная эмиссионная компьютерная томография) или визуализацию ПЭТ (позитронно-эмиссионная томография). Метки включают, например, йод-123 (^{123}I) и технеций-99т ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), например, в сочетании с визуализацией ОФЭКТ или ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O или ^{18}F , например, в сочетании с визуализацией ПЭТ, или индий-III (см., например, Gordon и др., (2005) *International Rev. Neurobiol.* 67:385-440).

Фармацевтические композиции и введение.

Для получения фармацевтических или стерильных композиций антител против SIRP α и антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным веществом. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences и U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания (1984).

Составы терапевтических и диагностических агентов можно получить путем смешивания с приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами, например, в форме лиофилизированных порошков, кашеи, водных растворов или суспензий (см., например, Hardman и др. (2001) Goodman и Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, Нью-Йорк, Нью-Йорк; Genaro (2000) Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams, и Wilkins, Нью-Йорк, Нью-Йорк; Avis и др. (ред.) (1993) *Pharmaceutical dosage forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, Нью-Йорк; Lieberman и др. (ред.) (1990) *Pharmaceutical dosage forms: Tablets*, Marcel Dekker, Нью-Йорк; Lieberman и др. (ред.) (1990) *Pharmaceutical dosage forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, Нью-Йорк; Weiner и Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., Нью-Йорк, Нью-Йорк).

Токсичность и терапевтическую эффективность антител согласно настоящему изобретению, которые вводят отдельно или в комбинации с другим терапевтическим агентом, можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур в культурах клеток или экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Отношение доз токсического и терапевтического действия представляет собой терапевтический индекс (LD₅₀/ED₅₀). Результаты, полученные в данных анализах культур клеток и исследованиях на животных, можно применять для определения диапазона дозировок для применения у человека. Дозировка таких соединений предпочтительно находится внутри диапазона концентраций в кровотоке, который включает ED₅₀ без токсичности или с небольшой токсичностью. Дозировка может изменяться внутри данного диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и пути введения.

В дополнительном варианте реализации дополнительный терапевтический агент вводят субъекту в сочетании с антителом против SIRP α или его антигенсвязывающим фрагментом согласно настоящему изобретению в соответствии с Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; 57^{ое} издание (1 ноября 2002 г.)).

Способ введения можно варьировать. Пути введения включают пероральный, ректальный, трансмукозальный, интестинальный, парентеральный; внутримышечный, подкожный, внутривенный, интрамедуллярный, интратекальный, напрямую внутрь желудочка, внутривенный, интраперитонеальный, интраназальный, внутриглазной, ингаляционный, инсуффляционный, топический, кожный, трансдермальный или интраартериальный.

В конкретных вариантах реализации антитела против SIRP α или их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению можно вводить инвазивным путем, например, путем инъекции. В дополнительных вариантах реализации настоящего изобретения антитело против SIRP α или его антигенсвязывающий фрагмент, или содержащую его фармацевтическую композицию, вводят внутривенно, подкожно, внутримышечно, интраартериально, внутрь опухоли или посредством ингаляции, аэрозольной доставки. Введение неинвазивными путями (например, перорально; например, в пилюле, капсуле или таблетке) также входит в объем настоящего изобретения.

В соответствии с настоящим изобретением предложен сосуд (например, пластиковый или стеклянный флакон, например, с крышкой или хромотографической колонкой, полый иглой или цилиндром шприца), содержащий любое из антител или антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению или содержащую их фармацевтическую композицию. В соответствии с настоящим изобретением также предложено устройство для инъекции, содержащее любое из антител или антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению или содержащую их фармацевтическую композицию. Устройство для инъекции представляет собой устройство, которое вводит вещество в организм пациента парентеральным путем, например, внутримышечным, подкожным или внутривенным. Например, устройство для инъекции может представлять собой шприц (например, предварительно наполненный фармацевтической композицией, такой как автоматический инжектор), который, например, включает цилиндр или трубу для удерживания жидкости, которую будут вводить путем инъекции (например, антитела или фрагмента или содержащей их фармацевтической композиции), иглу для прокалывания кожи и/или кровеносных сосудов для инъекции указанной жидкости; и поршень для выталкивания жидкости из цилиндра и через канал иглы. В одном варианте реализации настоящего изобретения устройство для инъекции, которое содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению или содержащую их фармацевтическую композицию, представляет собой устройство для внутривенной (в/в) инъекции. Такое устройство содержит антитело или фрагмент или содержащую их фармацевтическую композицию в катетере или троакаре/игле, которую можно присоединить к пробирке, которую можно присоединить к пакету или резервуару для удерживания жидкости (например, солевого раствора; или раствора Рингера с лактатом, содержащего NaCl, лактат натрия, KCl, CaCl₂ и необязательно содержащего глюкозу), которую вводят в организм пациента через катетер или троакар/иглу. Антитело или фрагмент или содержащую их фармацевтическую композицию можно, в одном варианте реализации настоящего изобретения, ввести в устройство, после того как троакар и катетер ввели в вену субъекта и троакар удалили из вставленного катетера. В/в устройство, например, можно ввести в периферическую вену (например, в кисти или руке); в верхнюю полую вену или нижнюю полую вену, или внутри правого предсердия (например, центральный в/в катетер); или в подключичную, внутреннюю яремную или бедренную вену и, например, продвинуть по направлению к сердцу, пока оно не достигнет верхней полый вены или правого предсердия (например, центральный венозный катетер). В одном варианте реализации настоящего изобретения устройство для инъекции представляет собой автоматический инжектор; безыгольный инжектор или внешний инфузионный насос. В безыгольном инжекторе используют узкую струю жидкости под высоким давлением, которая проникает в эпидермис, чтобы ввести антитело или фрагмент или содержащую его фармацевтическую композицию в организм пациента. Внешние инфузионные насосы представляют собой медицинские устройства, которые доставляют антитело или фрагмент или содержащую его фармацевтическую композицию в организм пациента в контролируемых количествах. Внешние инфузионные насосы могут иметь электрический или механический привод. Различные насосы работают различными способами, например, шприцевой насос удерживает жидкость в резервуаре шприца, и подвижный поршень контролирует доставку жидкости, эластомерный насос удерживает жидкость в растяжимом баллонном резервуаре, и давление от эластичных стенок баллона совершает доставку жидкости. В перистальтическом насосе набор роликов передавливает гибкие трубки, проталкивая жидкость вперед. В многоканальном насосе жидкости можно доставлять из множества резервуаров при множестве скоростей.

Фармацевтические композиции, описанные в данном изобретении, также можно вводить с помощью безыгольного устройства для подкожной инъекции, такого как устройства, описанные в патентах США № 6620135; 6096002; 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Такие безыгольные устройства, содержащие указанную фармацевтическую композицию, также входят в объем

настоящего изобретения. Фармацевтические композиции, описанные в данном изобретении, также можно вводить путем инфузии. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей для введения фармацевтических композиций включают имплантаты и модули, описанные в: патенте США № 4487603, в котором описан имплантируемый микроинфузионный насос для дозирования лекарственного средства с контролируемой скоростью; патент США № 4447233, в котором описан инфузионный насос для доставки лекарственного средства с определенной скоростью инфузии; патент США № 4447224, в котором описано имплантируемое инфузионное устройство с регулируемым расходом для непрерывной доставки лекарственного средства; патент США № 4439196, в котором описана осмотическая система доставки лекарственного средства, содержащая многокамерные отделения. Многие другие такие имплантаты, системы доставки и модули хорошо известны специалистам в данной области, и те из них, которые содержат фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, входят в объем настоящего изобретения.

В качестве альтернативы, можно вводить антитело против SIRP α или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению местным, а не системным путем, например, посредством инъекции антитела или фрагмента непосредственно в опухоль. Более того, можно вводить антитело или фрагмент в направленной системе доставки лекарственного средства, например, в липосоме, покрытой тканеспецифическим антителом, нацеленным, например, на опухоль. Указанные липосомы будут нацелены и селективно поглощены пораженной тканью. Такие способы и липосомы входят в объем настоящего изобретения.

Схема введения зависит от нескольких факторов, включая скорость метаболизма в сыворотке или ткани терапевтического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, тяжесть симптомов, иммуногенность терапевтического антитела и доступность клеток-мишеней в биологической среде. Предпочтительно, схема введения позволяет доставить достаточное количество терапевтического антитела или фрагмента, чтобы добиться улучшения целевого болезненного состояния, в то же время минимизируя нежелательные побочные действия. Соответственно, количество доставленного биологического агента отчасти зависит от конкретного терапевтического антитела и тяжести состояния, которое лечат. Доступно руководство по выбору подходящих доз терапевтических антител или их фрагментов (см., например, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Оксфордшир, Великобритания; Kresina (ред.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, Нью-Йорк, Нью-Йорк; Bach (ред.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, Нью-Йорк, Нью-Йорк; Baert и др. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom и др. (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon и др. (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz и др. (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh и др. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky и др. (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602).

Подходящую дозу определяет практикующий врач, например, используя параметры или факторы, которые, как известно или предполагается в данной области, влияют на лечение. Как правило, введение дозы начинают с количества, немного меньшего, чем оптимальная доза, а затем повышают с небольшим шагом до тех пор, пока не добьются желательного или оптимального эффекта в соотношении с какими-либо негативными побочными действиями. Важные диагностические критерии включают симптомы, например, воспаления или уровень выработанных воспалительных цитокинов. Обычно, желательно, чтобы биологический агент, который будут применять, был получен из того же вида, что и животное, направленное на лечение, что позволяет минимизировать какой-либо иммунный ответ на реагент. В случае субъекта, представляющего собой человека, например, могут быть желательны гуманизированные и полностью человеческие антитела.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном изобретении, можно вводить путем непрерывной инфузии, или дозами, которые вводят, например, ежедневно, 1-7 раз в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в два месяца, один раз в квартал, один раз в полгода, раз в год и т.д. Дозы можно вводить, например, внутривенно, подкожно, топически, перорально, назально, ректально, внутримышечно, внутричерепально, интраспинально или посредством ингаляции. Суммарная еженедельная доза, как правило, составляет по меньшей мере 0,05 мкг/кг массы тела, если брать шире, по меньшей мере 0,2, 0,5, 1, 10, 100 мкг/кг, 0,25, 1,0, 2,0 мг/кг, 5,0 мг/мл, 10, 25, 50 мг/кг или более (см., например, Yang и др. (2003) *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herald и др. (2002) *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu и др. (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67: 451-456; Portielji и др. (20003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 151-144). Дозы также можно вводить, чтобы добиться заранее установленной целевой концентрации антитела против SIRP α в сыворотке субъекта, например, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 мкг/мл или более. В других вариантах реализации антитело против SIRP α согласно настоящему изобретению вводят, например, подкожно или внутривенно, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в 4 недели, один раз в месяц, один раз в два месяца или один раз в квартал в количестве 10, 20, 50, 80, 100, 200, 500, 1000 или 2500 мг/субъекта.

В данном изобретении термин "эффективное количество" относится к количеству антитела против SIRP α или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, которое при введе-

нии отдельно или в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом в клетку, ткань или субъекта эффективно индуцирует измеримое улучшение одного или более симптомов заболевания, например, рака, или течения рака. Эффективная доза дополнительно относится к такому количеству антитела или его фрагмента, которого достаточно, чтобы привести к по меньшей мере частичному снижению выраженности симптомов, например, уменьшению размеров или исчезновению опухоли, отсутствию роста опухоли, увеличению времени выживания. В отношении отдельного активного ингредиента, который вводят отдельно, эффективная доза относится к данному ингредиенту отдельно. В отношении комбинации, эффективная доза относится к объединенным количествам активных ингредиентов, которые приводят к терапевтическому эффекту, которые вводят либо в комбинации, либо последовательно, либо одновременно. Эффективное количество терапевтического средства будет приводить к улучшению диагностического критерия или параметра по меньшей мере на 10%; обычно по меньшей мере на 20%; предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 30%; более предпочтительно по меньшей мере на 40%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 50%. Эффективное количество также может приводить к улучшению субъективного критерия в случаях, когда субъективные критерии используют для оценки тяжести заболевания.

Наборы.

Дополнительно предложены наборы, содержащие один или более компонентов, которые включают, но не ограничены антителом против SIRP α или антигенсвязывающим фрагментом, обсуждаемыми в данном изобретении, в сочетании с одним или более дополнительными компонентами, включая, но не ограничиваясь фармацевтически приемлемым носителем и/или терапевтическим агентом, обсуждаемыми в данном изобретении. Антитело или фрагмент и/или терапевтический агент можно включить в состав беспримесной композиции или комбинировать с фармацевтически приемлемым носителем в фармацевтической композиции.

В одном варианте реализации набор содержит антитело против SIRP α или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению или содержащую его фармацевтическую композицию в одном контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе) и/или терапевтический агент и содержащую его фармацевтическую композицию в другом контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе).

В другом варианте реализации набор содержит комбинацию согласно настоящему изобретению, включающую антитело против SIRP α или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем, необязательно в комбинации с одним или более терапевтическими агентами, включенными в один состав, необязательно в фармацевтической композиции в одном общем контейнере.

Если набор содержит фармацевтическую композицию для парентерального введения субъекту, то набор может содержать устройство для осуществления такого введения. Например, набор может содержать одну или более игл для подкожных инъекций или другие устройства для инъекций, которые обсуждались выше.

Набор может содержать листок-вкладыш, содержащий информацию, касающуюся фармацевтических композиций и лекарственных форм в наборе. Как правило, такая информация помогает пациентам и врачам эффективно и безопасно применять заявленные фармацевтические композиции и лекарственные формы. Например, во вкладыше могут быть указаны следующие сведения, касающиеся комбинации согласно настоящему изобретению: фармакокинетика, фармакодинамика, клинические исследования, параметры эффективности, показания и применение, противопоказания, предупреждения, предостережения, нежелательные реакции, передозировка, правильная дозировка и введение, как их поставлять, правильные условия хранения, ссылки на источники, информация о производителе/дистрибьюторе и информация о патентах.

Набор может также содержать второй терапевтический агент, например, один или более из следующих агентов: антитело против CD47, антитело против APRIL, антитело против PD-1 (например, ниволумаб, пембролизумаб, антитело против PDL1, антитело против TIGIT, антитело против CTLA4, антитело против CS1 (например, элотузумаб), антитело против KIR2DL1/2/3 (например, лирилумаб), антитело против CD137 (например, урелумаб), антитело против GITR (например, TRX518), антитело против PD-L1 (например, BMS-936559, MSB0010718C или MPDL3280A), антитело против PD-L2, антитело против ILT1, антитело против ILT2, антитело против ILT3, антитело против ILT4, антитело против ILT5, антитело против ILT6, антитело против ILT7, антитело против ILT8, антитело против CD40, антитело против OX40, антитело против ICOS, антитело против KIR2DL1, антитело против KIR2DL2/3, антитело против KIR2DL4, антитело против KIR2DL5A, антитело против KIR2DL5B, антитело против KIR3DL1, антитело против KIR3DL2, антитело против KIR3DL3, антитело против NKG2A, антитело против NKG2C, антитело против NKG2E, антитело против 4-1BB (например, PF-05082566), антитело против TSLP, антитело против IL-10, IL-10 или пегилированный IL-10, или любой низкомолекулярный органический ингибитор таких мишеней; антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из следующих антигенов: AMHR2, AXL, BCMA, CA IX, CD4,

CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD37, CD38, CD40, CD52, CD98, CSF1R, GD2, CCR4, CS1, EpCam, EGFR, EGFRvIII, эндоглин, EPHA2, EphA3, FGFR2b, рецептор фолиевой кислоты альфа, фукозил-GM1, HER2, HER3, IL1RAP, антиген миеломы-каппа, MS4A1, рецептор пролактина, TA-MUC1 и PSMA; ритуксимаб, ублитуксимаб, маргетуксимаб, IMGN-529, SCT400, велтузумаб, обинтузумаб, ADCT-502, Hul4.18K322A, Hu3F8, динутуксимаб, трастузумаб, цетуксимаб, ритуксимаб-RLI, с.60C3-RLI, Hul4.18-IL2, KM2812, AFM13 и (CD20)₂×CD16, эрлотиниб (тарцева), даратумумаб, алемтузумаб, пертузумаб, брентуксимаб, элотузумаб, ибритумомаб, ифаботузумаб, фарлетузумаб, отлертузумаб, каротуксимаб, эпратузумаб, инебилизумаб, лумретузумаб, 4G7SDIE, AFM21, AFM22, LY-3022855, SNDX-6352, AFM-13, BI-836826, BMS-986012, BVX-20, могамулизумаб, ChiLob-7/4, лейкотуксимаб, изатуксимаб, DS-8895, FPA144, GM102, GSK-2857916, IGN523, IT1208, ADC-1013, CAN-04, XOMA-213, PankoMab-GEX, chKM-4927, IGN003, IGN004, IGN005, MDX-1097, MOR202, MOR-208, опортузумаб, энситуксимаб, ведотин (адцетрис), ибритумомаб тиуксетан, ABBV-838, HuMax-AXL-ADC, и адо-трастузумаб эмтанзин (кадсила); лучевая терапия или химиотерапевтические агенты включая, но не ограничиваясь перечисленными: антрациклины (доксорубин, эпирубин, даунорубин, идарубин, митоксантрон), оксалиплатин, бортезомиб, циклофосфамид, блеомицин, вориностат, паклитаксел, 5-фторурацил, цитарабин, преднизолон, доцетаксел, митомицин С, топотекан/камптотецин, этопозид, золедроновую кислоту, метотрексат, ибрутиниб, афлиберцепт, бевацизумаб, торемифен, винбластин, винкристин, иделалисиб, меркаптопурин, талидомид, сорафениб; циклический динуклеотид или другой агонист сигнального пути STING; и т.д.

Наборы для детектирования и терапевтические наборы.

Для удобства, антитело против SIRP α или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению могут быть предложены в наборе, т.е. в упакованной комбинации реагентов в заранее определенных количествах с инструкциями по проведению диагностического анализа или детектирования. Если антитело или фрагмент помечены ферментом, то набор будет содержать субстраты и кофакторы, необходимые для данного фермента (например, субстрат-предшественник, который образует детектируемый хромофор или флуорофор). Кроме того, можно включить в набор другие вспомогательные вещества, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или лизирующий буфер) и тому подобные вещества. Относительные количества различных реагентов могут изменяться в широком диапазоне, чтобы обеспечить концентрации в растворе реагентов, которые по существу оптимизируют чувствительность анализа. В частности, реагенты могут быть предложены в виде сухих порошков, обычно лиофилизированных, содержащих вспомогательные вещества, которые при растворении позволят получить раствор с подходящей концентрацией реагентов.

Также предложены реагенты и наборы для диагностики или детектирования, содержащие один или более таких реагентов для применения в различных анализах детектирования, включая, например, иммуноанализы, такие как ELISA (сэндвич-типа или конкурентный формат). Компоненты набора можно предварительно присоединить к твердой подложке или можно нанести на поверхность твердой подложки в процессе использования набора. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения средства выработки сигнала могут быть поставлены заранее связанными с антителом или фрагментом согласно настоящему изобретению, или может потребоваться их комбинирование с одним или более компонентами, например, буферами, конъюгатами антитело-фермент, субстратами ферментов или тому подобными компонентами, перед применением. Наборы также могут содержать дополнительные реагенты, например, блокирующие реагенты для уменьшения неспецифического связывания с поверхностью твердой фазы, реагенты для промывки, субстраты ферментов и тому подобные реагенты. Поверхность твердой фазы может быть представлена в виде пробирки, гранулы, микротитрационного планшета, микросферы или других материалов, подходящих для иммобилизации белков, пептидов или полипептидов. В конкретных аспектах фермент, который катализирует образование хемилюминесцентного или хромогенного продукта или восстановление хемилюминесцентного или хромогенного субстрата представляет собой компонент средств выработки сигнала. Такие ферменты хорошо известны в данной области. Наборы могут содержать любой из захватывающих агентов и детектирующих реагентов, описанных в данном изобретении. Необязательно набор также может содержать инструкции по осуществлению способов согласно настоящему изобретению.

Также предложен набор, содержащий антитело против SIRP α (например, гуманизованное антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент, упакованный в контейнер, такой как флакон или бутылка, и дополнительно содержащий этикетку, прикрепленную к контейнеру или упакованную вместе с контейнером, на указанной этикетке описано содержимое контейнера и приведены указания и/или инструкции по применению содержимого контейнера для лечения одного или более болезненных состояний, описанных в данном изобретении.

В одном аспекте набор предназначен для лечения рака и содержит антитело против SIRP α (например, гуманизованное антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент и дополнительный терапевтический агент или вакцину. Набор необязательно может дополнительно содержать шприц для парентерального, например, внутривенного введения. В другом аспекте набор содержит антитело против SIRP α

(например, гуманизированное антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент и этикетку, прикрепленную к контейнеру или упакованную вместе с контейнером, описывающую применение антитела или его фрагмента вместе с вакциной или дополнительным терапевтическим агентом. В другом дополнительном аспекте набор содержит вакцину или дополнительный терапевтический агент и этикетку, прикрепленную к контейнеру или упакованную вместе с контейнером, описывающую применение вакцины или дополнительного терапевтического агента вместе с антителом против SIRP α или его фрагментом. В некоторых вариантах реализации антитело против SIRP α и вакцина или дополнительный терапевтический агент находятся в отдельных флаконах или объединены в одной фармацевтической композиции.

Выше в разделе комбинированной терапии обсуждалось, что для совместного введения двух терапевтических агентов не требуется, чтобы указанные агенты вводили в одно и то же время или одним и тем же путем, при условии, что периоды времени, когда указанные агенты оказывают свое терапевтическое действие, перекрываются. Одновременное или последовательное введение входит в объем настоящего изобретения, как и введение в различные дни или недели.

Также можно подготовить терапевтические наборы и наборы для детектирования, описанные в данном изобретении, которые содержат по меньшей мере один из следующих компонентов: антитело, пептид, антигенсвязывающий фрагмент или полинуклеотид, описанные в данном изобретении, - и инструкции по применению композиции в качестве детектирующего реагента или терапевтического агента. Контейнеры для применения в таких наборах обычно могут включать по меньшей мере один флакон, пробирку, колбу, бутылку, шприц или другой подходящий контейнер, в который можно поместить одну или более детектирующих и/или терапевтических композиций, и предпочтительно подходящим образом разделить на аликвоты. Если также предложен второй терапевтический агент, то набор также может содержать второй отличный контейнер, в который можно поместить данную вторую детектирующую и/или терапевтическую композицию. В качестве альтернативы, множество соединений можно получить в одной фармацевтической композиции и можно упаковать в один контейнер, такой как флакон, колба, шприц, бутылка или другой подходящий один контейнер. Наборы, описанные в данном изобретении, также обычно будут содержать средства для удерживания флакона(ов) рядом друг с другом для коммерческой продажи, такие как, например, изготовленные литьем под давлением или выдувным формованием пластиковые контейнеры, в которых удерживается(ются) желатинный(е) флакон(ы). Если в наборе содержится радиоактивная метка, хромогенная метка, флуорогенная метка или другой тип детектируемой метки или средств обнаружения, то вводящий метку агент либо может быть предложен в том же контейнере, что и сама детектирующая или терапевтическая композиция, либо, в качестве альтернативы, может быть помещен во второй отличный контейнер, в который данную вторую композицию можно поместить и подходящим образом разделить на аликвоты. В качестве альтернативы, детектирующий реагент и метку можно получить в одном контейнере, и, в большинстве случаев, набор также обычно будет содержать средства для удерживания флакона(ов) рядом друг с другом для коммерческой продажи и/или удобной упаковки и доставки.

Также предложено устройство или аппарат для осуществления способов детектирования или мониторинга, описанных в данном изобретении. Такое устройство может включать камеру или пробирку, в которую можно внести образец, систему для работы с жидкостью, возможно включающую клапаны или насосы, чтобы направлять поток образца по устройству, необязательно фильтры для выделения плазмы или сыворотки из крови, камеры для смешивания для добавления захватывающих агентов или детектирующих реагентов и необязательно детектирующее устройство для обнаружения количества детектируемой метки, связанной с иммунокомплексом захватывающего агента. Поток образца может быть пассивным (например, под действием капиллярных, гидростатических или других сил, которые не требуют дополнительных манипуляций со стороны устройства после нанесения образца) или активным (например, под действием приложенной силы, созданной механическими насосами, электроосмотическими насосами, центробежной силы или повышенного давления воздуха), или осуществляться комбинацией активных и пассивных сил.

В дополнительных вариантах реализации также предложен процессор, машиночитаемая память и процедура, которая хранится в машиночитаемой памяти и пригодна для выполнения процессором для осуществления любого из способов, описанных в данном изобретении. Примеры подходящих компьютеризованных систем, сред и/или конфигураций включают персональные компьютеры, серверные компьютеры, портативные или переносные устройства, многопроцессорные системы, системы на основе микропроцессора, компьютерные приставки, программируемую бытовую электронику, сетевые ПК, мини-компьютеры, универсальные электронно-вычислительные машины, распределенную вычислительную среду, которые включают любые из описанных выше систем или устройств или любые другие системы, известные в данной области.

SEQ ID NO: 30 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичной указанной последовательности; и

вариабельную область легкой цепи, включающую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 8 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 20 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 22 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 24 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичной указанной последовательности,

SEQ ID NO: 26 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичной указанной последовательности, и

SEQ ID NO: 28 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичной указанной последовательности, и

SEQ ID NO: 32 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичной указанной последовательности.

Вариант реализации 4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту реализации 3, отличающиеся тем, что антитело или его фрагмент обладают следующими свойствами:

связываются с клеткой, экспрессирующей белок SIRP α V1 человека, с EC₅₀ < 10 нМ, предпочтительно < 5 нМ, более предпочтительно < 1,5 нМ, еще более предпочтительно < 1,0 нМ, еще более предпочтительно < 0,5 нМ и наиболее предпочтительно равной приблизительно 0,3 нМ или менее;

связываются с клеткой, экспрессирующей белок SIRP α V2 человека, с EC₅₀ < 10 нМ, предпочтительно < 5 нМ, более предпочтительно < 1,5 нМ, еще более предпочтительно < 1,0 нМ, еще более предпочтительно < 0,5 нМ и наиболее предпочтительно равной приблизительно 0,3 нМ или менее;

не проявляют заметного связывания с белком SIRP β 1 при концентрации антитела 50 нМ, предпочтительно 67 нМ и более предпочтительно 100 нМ; или, в качестве альтернативы, при концентрации, которая в 10 раз больше, предпочтительно в 50 раз больше, более предпочтительно в 100 раз больше и еще более предпочтительно в 200 раз больше, чем EC₅₀ антитела по отношению к SIRP α V1 или SIRP α V2;

ингибируют связывание между SIRP α человека и CD47 с IC₅₀ < 10,0 нМ, более предпочтительно < 5,0 нМ, еще более предпочтительно < 2,5 нМ и наиболее предпочтительно равной приблизительно 1,0 нМ или менее; и

проявляют балл "человечности" T20, равный по меньшей мере 79, и более предпочтительно 85.

Вариант реализации 5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту реализации 1, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одну из следующих комбинаций последовательности тяжелой цепи/последовательности легкой цепи:

SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 90,

SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 92,

SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 94,

SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 96,

SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 98,

SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 100,

SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 90,

SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 92,

SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 94,

SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 96,

SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 98,

SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 100,

SEQ ID NO: 82/SEQ ID NO: 90,

SEQ ID NO: 82/SEQ ID NO: 92,

SEQ ID NO: 82/SEQ ID NO: 94,

SEQ ID NO: 82/SEQ ID NO: 96,

SEQ ID NO: 82/SEQ ID NO: 98,

SEQ ID NO: 82/SEQ ID NO: 100,

SEQ ID NO: 84/SEQ ID NO: 90,

SEQ ID NO: 84/SEQ ID NO: 92,

SEQ ID NO: 84/SEQ ID NO: 94,

SEQ ID NO: 84/SEQ ID NO: 96,

SEQ ID NO: 84/SEQ ID NO: 98,

SEQ ID NO: 84/SEQ ID NO: 100,

SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 90,
 SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 92,
 SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 94,
 SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 96,
 SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 98,
 SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 100,
 SEQ ID NO: 88/SEQ ID NO: 90,
 SEQ ID NO: 88/SEQ ID NO: 92,
 SEQ ID NO: 88/SEQ ID NO: 94,
 SEQ ID NO: 88/SEQ ID NO: 96,
 SEQ ID NO: 88/SEQ ID NO: 98,
 SEQ ID NO: 88/SEQ ID NO: 100,
 SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 20,
 SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 22,
 SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 24,
 SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 26,
 SEQ ID NO: 10/SEQ ID NO: 28,
 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 20,
 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 22,
 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 24,
 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 26,
 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 28,
 SEQ ID NO: 14/SEQ ID NO: 20,
 SEQ ID NO: 14/SEQ ID NO: 22,
 SEQ ID NO: 14/SEQ ID NO: 24,
 SEQ ID NO: 14/SEQ ID NO: 26,
 SEQ ID NO: 14/SEQ ID NO: 28,
 SEQ ID NO: 16/SEQ ID NO: 20,
 SEQ ID NO: 16/SEQ ID NO: 22,
 SEQ ID NO: 16/SEQ ID NO: 24,
 SEQ ID NO: 16/SEQ ID NO: 26,
 SEQ ID NO: 16/SEQ ID NO: 28,
 SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 20,
 SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 22,
 SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 24,
 SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 26,
 SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 28,

или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную соответствующему SEQ ID.

Вариант реализации 6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно одному из вариантов реализации 1-5, отличающиеся тем, что антитело представляет собой интактный IgG.

Вариант реализации 7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно одному из вариантов реализации 1-6, отличающиеся тем, что антитело включает Fc-область IgG2 дикого типа или мутированную Fc-область IgG2.

Вариант реализации 8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно одному из вариантов реализации 1-6, отличающиеся тем, что антитело включает мутированную Fc-область IgG1.

Вариант реализации 9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно одному из вариантов реализации 1-6, отличающиеся тем, что антитело включает мутированную Fc-область IgG4.

Вариант реализации 10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тем же эпитопом SIRP α человека, с которым связывается антитело согласно варианту реализации 5.

Вариант реализации 11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов реализации 1 -10, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент гуманизированы.

Вариант реализации 12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов реализации 1-11, которое представляет собой гуманизированное антитело, которое содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи, при этом каждая тяжелая цепь включает SEQ ID NO: 10 и каждая легкая цепь включает SEQ ID NO: 20.

Вариант реализации 13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов реализации 1-11, которое представляет собой гуманизированное антитело, которое содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи, при этом каждая тяжелая цепь включает SEQ ID NO: 16 и каждая легкая цепь включает SEQ ID NO: 28.

Вариант реализации 14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из ва-

слоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности, последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 17 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности, последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 29 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности, последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 19 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности, последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 21 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности, последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 23 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности, последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 25 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности, последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности, и/или последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 31 или последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности.

Вариант реализации 22. Вектор экспрессии, включающий выделенную нуклеиновую кислоту согласно варианту реализации 20 или 21.

Вариант реализации 23. Вектор экспрессии согласно варианту реализации 22, кодирующий как последовательность тяжелой цепи, так и последовательность легкой цепи антитела против SIRP α , указанные векторы экспрессии содержат следующие комбинации первой последовательности нуклеиновой кислоты/второй последовательности нуклеиновой кислоты, выбранные из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 77/SEQ ID NO: 89,
 SEQ ID NO: 77/SEQ ID NO: 91,
 SEQ ID NO: 77/SEQ ID NO: 93,
 SEQ ID NO: 77/SEQ ID NO: 95,
 SEQ ID NO: 77/SEQ ID NO: 97,
 SEQ ID NO: 77/SEQ ID NO: 99,
 SEQ ID NO: 79/SEQ ID NO: 89,
 SEQ ID NO: 79/SEQ ID NO: 91,
 SEQ ID NO: 79/SEQ ID NO: 93,
 SEQ ID NO: 79/SEQ ID NO: 95,
 SEQ ID NO: 79/SEQ ID NO: 97,
 SEQ ID NO: 79/SEQ ID NO: 99,
 SEQ ID NO: 81/SEQ ID NO: 89,
 SEQ ID NO: 81/SEQ ID NO: 91,
 SEQ ID NO: 81/SEQ ID NO: 93,
 SEQ ID NO: 81/SEQ ID NO: 95,
 SEQ ID NO: 81/SEQ ID NO: 97,
 SEQ ID NO: 81/SEQ ID NO: 99,
 SEQ ID NO: 83/SEQ ID NO: 89,
 SEQ ID NO: 83/SEQ ID NO: 91,
 SEQ ID NO: 83/SEQ ID NO: 93,
 SEQ ID NO: 83/SEQ ID NO: 95,
 SEQ ID NO: 83/SEQ ID NO: 97,
 SEQ ID NO: 83/SEQ ID NO: 99,
 SEQ ID NO: 85/SEQ ID NO: 89,
 SEQ ID NO: 85/SEQ ID NO: 91,
 SEQ ID NO: 85/SEQ ID NO: 93,
 SEQ ID NO: 85/SEQ ID NO: 95,
 SEQ ID NO: 85/SEQ ID NO: 97,
 SEQ ID NO: 85/SEQ ID NO: 99,
 SEQ ID NO: 87/SEQ ID NO: 89,
 SEQ ID NO: 87/SEQ ID NO: 91,
 SEQ ID NO: 87/SEQ ID NO: 93,
 SEQ ID NO: 87/SEQ ID NO: 95,
 SEQ ID NO: 87/SEQ ID NO: 97,
 SEQ ID NO: 87/SEQ ID NO: 99,
 SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 19,
 SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 21,
 SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 23,

SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 25,
 SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 27,
 SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 19,
 SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 21,
 SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 23,
 SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 25,
 SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 27,
 SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 19,
 SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 21,
 SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 23,
 SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 25,
 SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 27,
 SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 19,
 SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 21,
 SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 23,
 SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 25,
 SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 27,
 SEQ ID NO: 17/SEQ ID NO: 19,
 SEQ ID NO: 17/SEQ ID NO: 21,
 SEQ ID NO: 17/SEQ ID NO: 23,
 SEQ ID NO: 17/SEQ ID NO: 25 и
 SEQ ID NO: 17/SEQ ID NO: 27,

или, в каждом случае, последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную соответствующему SEQ ID NO.

Вариант реализации 24. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии согласно варианту реализации 22 или 23.

Вариант реализации 25. Клетка-хозяин согласно варианту реализации 24, которая продуцирует полноразмерное антитело против SIRP α .

Вариант реализации 26. Клетка-хозяин согласно одному из вариантов реализации 24 или 25, которая представляет собой бактериальную клетку, клетку человека, клетку млекопитающего, клетку *Pichia*, клетку растения, клетку HEK293 или клетку яичника китайского хомячка.

Вариант реализации 27. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов реализации 1 -18 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Вариант реализации 28. Композиция согласно варианту реализации 27, дополнительно содержащая второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые индуцируют АЗКЦ и/или АЗКФ, отличающаяся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению повышает опосредованное вторым антителом разрушение клеток.

Вариант реализации 29. Композиция согласно варианту реализации 28, отличающаяся тем, что второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с антигеном, выбранным из группы, состоящей из AMHR2, AXL, BCMA, CA IX, CD4, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD37, CD38, CD40, CD52, CD98, CSF1R, GD2, CCR4, CS1, EpCam, EGFR, EGFRvIII, эндоглина, EPHA2, EphA3, FGFR2b, рецептора фолиевой кислоты альфа, фукозила-GM1, HER2, HER3, IL1RAP, антигена миеломы-каппа, MS4A1, рецептора пролактина, TA-MUC1 и PSMA.

Вариант реализации 30. Композиция согласно варианту реализации 29, отличающаяся тем, что второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из ритуксимаба, ублитуксимаба, маргетуксимаба, IMGN-529, SCT400, велтузумаба, обинутузумаба, ADCT-502, Hul4.18K322A, Hu3F8, динутуксимаба, трастузумаба, цетуксимаба, ритуксимаба-RLI, с.60C3-RLI, Hul4.18-IL2, KM2812, AFM13, (CD20)₂×CD16, эрлотиниба (тарцева), даратумумаба, алетузумаба, пертузумаба, брентуксимаба, элотузумаба, ибритумомаба, ифаботузумаба, фарлетузумаба, отлартузумаба, каротуксимаба, эпратузумаба, инебилизумаба, лумретузумаба, 4G7SDIE, AFM21, AFM22, LY-3022855, SNDX-6352, AFM-13, BI-836826, BMS-986012, BVX-20, могамулизумаба, ChiLob-7/4, лейкотуксимаба, изатуксимаба, DS-8895, FPA144, GM102, GSK-2857916, IGN523, IT1208, ADC-1013, CAN-04, XOMA-213, PankoMab-GEX, chKM-4927, IGN003, IGN004, IGN005, MDX-1097, MOR202, MOR-208, опортузумаба, энситуксимаба, ведотина (адцетрис), ибритумомаба тиуксетана, ABBV-838, HuMax-AXL-ADC и адо-трастузумаба эмтанзина (кадсила).

Вариант реализации 31. Композиция согласно варианту реализации 28, отличающаяся тем, что второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцирует АЗКФ.

Вариант реализации 32. Композиция согласно варианту реализации 31, отличающаяся тем, что второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из ритуксимаба, ублитуксимаба, маргетуксимаба, IMGN-529, SCT400, велтузумаба, обинутузумаба, трастузумаба, цетук-

симаба, алемтузумаба, ибритумомаба, фарлетузумаба, инебилизумаба, лумретузумаба, 4G7SDIE, BMS-986012, BVX-20, могамулизумаба, ChiLob-7/4, GM102, GSK-2857916, PankoMab-GEX, chKM-4927, MDX-1097, MOR202 и MOR-208.

Вариант реализации 33. Композиция согласно варианту реализации 27, дополнительно содержащая один или более агентов, выбранных из группы, состоящей из антитела против CD27, антитела против CD47, антитела против APRIL, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против TIGIT, антитела против CTLA4, антитела против CS1, антитела против KIR2DL1/2/3, антитела против CD137, антитела против GITR, антитела против PD-L2, антитела против ILT1, антитела против ILT2, антитела против ILT3, антитела против ILT4, антитела против ILT5, антитела против ILT6, антитела против ILT7, антитела против ILT8, антитела против CD40, антитела против OX40, антитела против ICOS, антитела против KIR2DL1, антитела против KIR2DL2/3, антитела против KIR2DL4, антитела против KIR2DL5A, антитела против KIR2DL5B, антитела против KIR3DL1, антитела против KIR3DL2, антитела против KIR3DL3, антитела против NKG2A, антитела против NKG2C, антитела против NKG2E, антитела против 4-1BB, антитела против TSLP, антитела против IL-10, IL-10 пегелированного IL-10, агониста (например, агонистического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или растворимого гибридного белка) белка рецептора TNF, иммуноглобулин-подобного белка, рецептора цитокина, интегрина, активирующих лимфоциты сигнальных молекул (белков SLAM), активирующего рецептора NK-клеток, Toll-подобного рецептора, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (TACTILE), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), SLAM7, BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, PAG/Cbp, CD19a, лиганда, который специфично связывается с CD83, ингибитора CD47, ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1, ингибитора PD-L2, ингибитора CTLA4, ингибитора TIM3, ингибитора LAG3, ингибитора CEACAM (например, CEACAM-1, -3 и/или -5), ингибитора VISTA, ингибитора BTLA, ингибитора TIGIT, ингибитора LAIR1, ингибитора IDO, ингибитора TDO, ингибитора CD160, ингибитора TGFR-бета и циклического динуклеотида или другого агониста сигнального пути STING.

Вариант реализации 34. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий: культивирование клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и/или легкую цепь любого из антител или антигенсвязывающих фрагментов согласно вариантам реализации 1-18, при условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида; и необязательно выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки-хозяина и/или культуральной среды.

Вариант реализации 35. Способ обнаружения присутствия пептида SIRP α или его фрагмента в образце, включающий приведение в контакт образца с антителом или его фрагментом согласно любому из вариантов реализации 1 - 18 и детектирование присутствия комплекса между указанным антителом или фрагментом и пептидом; при этом обнаружение указанного комплекса свидетельствует о присутствии пептида SIRP α .

Вариант реализации 36. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов реализации 1-18 или композиция согласно любому из вариантов реализации 21-25 для лечения рака или инфекционного заболевания.

Вариант реализации 37. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно вариантам реализации 1 - 18 или композиция согласно любому из вариантов реализации 27-33 для снижения передачи сигнала SIRP α /CD47 у субъекта, представляющего собой человека.

Вариант реализации 38. Способ лечения рака у субъекта, представляющего собой человека, включающий введение указанному субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из вариантов реализации 1-18, или вектора экспрессии согласно одному из вариантов реализации 22 или 23, или клетки-хозяина согласно одному из вариантов реализации 24 - 26, или композиции согласно одному из вариантов реализации 27 - 33, необязательно в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом или терапевтической процедурой.

Вариант реализации 39. Способ лечения рака у субъекта, представляющего собой человека, включающий:

введение указанному субъекту эффективного количества:

- (i) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые индуцируют АЗКЦ и/или АЗКФ; и
- (ii) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из вариантов реализации 1-18, или вектора экспрессии согласно одному из вариантов реализации 22 или 23, или клетки-хозяина согласно одному из вариантов реализации 24-26, или композиции согласно одному из вариантов реализации 27-33, необязательно в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом или терапевтической процедурой,

при этом введение (ii) повышает разрушение клеток, опосредованное антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые индуцируют АЗКЦ и/или АЗКФ.

Вариант реализации 40. Способ согласно варианту реализации 39, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые индуцируют АЗКЦ и/или АЗКФ, связываются с антигеном, выбранным из группы, состоящей из AMHR2, AXL, BCMA, CA IX, CD4, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD37, CD38, CD40, CD52, CD98, CSF1R, GD2, CCR4, CS1, EpCam, EGFR, EGFRvIII, эндоглина, EPHA2, EphA3, FGFR2b, рецептора фолиевой кислоты альфа, фукозила-GM1, HER2, HER3, IL1RAP, антигена миеломы-каппа, MS4A1, рецептора пролактина, TA-MUC1 и PSMA.

Вариант реализации 41. Способ согласно варианту реализации 40, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые индуцируют АЗКЦ и/или АЗКФ, выбраны из группы, состоящей из ритуксимаба, ублитуксимаба, маргетуксимаба, IMGN-529, SCT400, велтузумаба, обинутузумаба, ADCT-502, Hul4.18K322A, Hu3F8, динутуксимаба, трастузумаба, цетуксимаба, ритуксимаба-RLI, с.60C3-RLI, Hul4.18-IL2, KM2812, AFM13, (CD20)₂×CD16, эрлотиниба (тарцева), даратумумаба, алемтузумаба, пертузумаба, брентуксимаба, элотузумаба, ибритумомаба, ифаботузумаба, фарлетузумаба, отлертузумаба, каротуксимаба, эпратузумаба, инебилизумаба, лумретузумаба, 4G7SDIE, AFM21, AFM22, LY-3022855, SNDX-6352, AFM-13, BI-836826, BMS-986012, BVX-20, могамулизумаба, ChiLob-7/4, лейкотуксимаба, изатуксимаба, DS-8895, FPA144, GM102, GSK-2857916, IGN523, IT1208, ADC-1013, CAN-04, ХОМА-213, PankoMab-GEX, chKM-4927, IGN003, IGN004, IGN005, MDX-1097, MOR202, MOR-208, опортузумаба, энситуксимаба, ведотина (адцетрис), ибритумомаба триуксетана, ABBV-838, HuMax-AXL-ADC и адо-трастузумаба эмтанзина (кадсила).

Вариант реализации 42. Способ согласно варианту реализации 39 или 40, отличающийся тем, что второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцирует АЗКФ.

Вариант реализации 43. Способ согласно варианту реализации 42, отличающийся тем, что второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из ритуксимаба, ублитуксимаба, маргетуксимаба, IMGN-529, SCT400, велтузумаба, обинутузумаба, трастузумаба, цетуксимаба, алемтузумаба, ибритумомаба, фарлетузумаба, инебилизумаба, лумретузумаба, 4G7SDIE, BMS-986012, BVX-20, могамулизумаба, ChiLob-7/4, GM102, GSK-2857916, PankoMab-GEX, chKM-4927, MDX-1097, MOR202 и MOR-208.

Вариант реализации 44. Способ лечения инфекции или инфекционного заболевания у субъекта, представляющего собой человека, включающий введение указанному субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из вариантов реализации 1-18, или вектора экспрессии согласно одному из вариантов реализации 22 или 23, или клетки-хозяина согласно одному из вариантов реализации 24-26, или композиции согласно одному из вариантов реализации 27-33, необязательно в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом или терапевтической процедурой.

Вариант реализации 45. Антитело, обладающее одним или несколькими из следующих свойств:

связывает белок SIRP α V1 человека, имеющий последовательность SEQ ID NO: 34, с EC₅₀ < 1 нМ; проявляет по меньшей мере в 100 раз более высокую EC₅₀ по отношению к SIRP α V1(P74A), имеющему последовательность SEQ ID NO: 62; и проявляет по меньшей мере в 100 раз более высокую EC₅₀ по отношению к белку SIRP β 1 человека, имеющему последовательность SEQ ID NO: 38, предпочтительно измерение проводят с помощью клеточного анализа ELISA;

связывается с клеткой, экспрессирующей белок SIRP α V1 человека, с EC₅₀ < 10 нМ, предпочтительно < 5 нМ, более предпочтительно < 1,5 нМ, еще более предпочтительно < 1,0 нМ, еще более предпочтительно < 0,5 нМ и наиболее предпочтительно равной приблизительно 0,3 нМ или менее;

связывается с клеткой, экспрессирующей белок SIRP α V2 человека, с EC₅₀ < 10 нМ, предпочтительно < 5 нМ, более предпочтительно < 1,5 нМ, еще более предпочтительно < 1,0 нМ, еще более предпочтительно < 0,5 нМ и наиболее предпочтительно равной приблизительно 0,3 нМ или менее;

не проявляет заметного связывания с белком SIRP β 1 при концентрации антитела 50 нМ, предпочтительно 67 нМ и более предпочтительно 100 нМ; или, в качестве альтернативы, при концентрации, которая в 10 раз больше, предпочтительно в 50 раз больше, более предпочтительно в 100 раз больше и еще более предпочтительно в 200 раз больше, чем EC₅₀ антитела по отношению к SIRP α V1 или SIRP α V2;

ингибирует связывание между SIRP α человека и CD47 с IC₅₀ < 10,0 нМ, более предпочтительно < 5,0 нМ, еще более предпочтительно < 2,5 нМ и наиболее предпочтительно равной приблизительно 1,0 нМ или менее; и

проявляет балл "человечности" T20, равный по меньшей мере 79, и более предпочтительно 85.

Вариант реализации 46. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту реализации 45, которые связывают белок SIRP α V1 человека, имеющий последовательность SEQ ID NO: 34, с EC₅₀ < 1 нМ; проявляют по меньшей мере в 100 раз более высокую EC₅₀ по отношению к SIRP α V1(P74A), имеющему последовательность SEQ ID NO: 62; и проявляют по меньшей мере в 100 раз более высокую EC₅₀ по отношению к белку SIRP β 1 человека, имеющему последовательность SEQ ID NO: 38.

Вариант реализации 47. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту реализации 45 или 46, которые содержат одну или две легкие цепи, включающие SEQ ID NO: 20 или последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности, и одну или две тяжелые цепи, включающие SEQ ID NO: 10 или последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности.

Вариант реализации 48. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту реализации 45 или 46, которые содержат одну или две легкие цепи, включающие SEQ ID NO: 28 или последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности, и одну или две тяжелые цепи, включающие SEQ ID NO: 16 или последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности.

Вариант реализации 49. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту реализации 45 или 46, которые содержат одну или две легкие цепи, включающие SEQ ID NO: 20 или последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности, и одну или две тяжелые цепи, включающие SEQ ID NO: 18 или последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности.

Вариант реализации 50. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту реализации 45 или 46, которые содержат одну или две легкие цепи, включающие SEQ ID NO: 90 или последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности, и одну или две тяжелые цепи, включающие SEQ ID NO: 80 или последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности.

Вариант реализации 51. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту реализации 45 или 46, которые содержат одну или две легкие цепи, включающие SEQ ID NO: 92 или последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности, и одну или две тяжелые цепи, включающие SEQ ID NO: 80 или последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности.

Вариант реализации 52. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту реализации 45 или 46, которые содержат одну или две легкие цепи, включающие SEQ ID NO: 96 или последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности, и одну или две тяжелые цепи, включающие SEQ ID NO: 80 или последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99% идентичную указанной последовательности.

Вариант реализации 53. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно одному из вариантов реализации 45 - 52, отличающиеся тем, что антитело представляет собой интактный IgG.

Вариант реализации 54. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно одному из вариантов реализации 45 - 52, отличающиеся тем, что антитело включает Fc-область IgG2 дикого типа или мутированную Fc-область IgG2.

Вариант реализации 55. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно одному из вариантов реализации 45 - 52, отличающиеся тем, что антитело включает мутированную Fc-область IgG1.

Вариант реализации 56. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно одному из вариантов реализации 45 - 52, отличающиеся тем, что антитело включает мутированную Fc-область IgG4.

Вариант реализации 57. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тем же эпитопом SIRP α человека, с которым связывается антитело согласно одному из вариантов реализации 45 - 52.

Вариант реализации 58. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов реализации 45 - 52, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент гуманизированы.

Вариант реализации 59. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов реализации 45 - 52 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Вариант реализации 60. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов реализации 45 - 52 или композиция согласно варианту реализации 59 для лечения рака или инфекционного заболевания.

Вариант реализации 61. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов реализации 45 - 52 или композиция согласно варианту реализации 59 для снижения передачи сигнала SIRP α /CD47 у субъекта, представляющего собой человека.

Вариант реализации 62. Способ лечения рака у субъекта, представляющего собой человека, включающий введение указанному субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из вариантов реализации 45 - 52 или композиции согласно варианту реализации 59, необязательно в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом или терапевтической процедурой.

Вариант реализации 63. Способ лечения инфекции или инфекционного заболевания у субъекта, представляющего собой человека, включающий введение указанному субъекту эффективного количест-

ва антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из вариантов реализации 45 - 52 или композиции согласно варианту реализации 59, необязательно в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом или терапевтической процедурой.

Основные способы.

Стандартные способы молекулярной биологии описаны в Sambrook, Fritsch и Maniatis (1982 и 1989 2^о издание, 2001 3^е издание) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк; Sambrook и Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3^е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк; Wu (1993) *Recombinant DNA*, том 217, Academic Press, Сан-Диего, Калифорния). Стандартные способы также можно найти в Ausbel и др. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, тома 1-4, John Wiley and Sons, Inc. Нью-Йорк, Нью-Йорк, в котором описано клонирование в бактериальных клетках и мутагенез ДНК (том 1), клонирование в клетках млекопитающих и дрожжах (том 2), гликоконъюгаты и экспрессия белка (том 3) и биоинформатика (том 4).

Описаны способы очистки белка, включая иммунопреципитацию, хроматографию, электрофорез, центрифугирование и кристаллизацию (Coligan и др. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, том 1, John Wiley and Sons, Inc., Нью-Йорк). Описаны химический анализ, химическая модификация, посттрансляционная модификация, получение гибридных белков, гликозилирование белков (см., например, Coligan и др. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, том 2, John Wiley and Sons, Inc., Нью-Йорк; Ausbel и др. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, том 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, с. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, Сент-Луис, Миссури; стр. 45 - 89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, Нью-Джерси, с. 384-391). Описано получение, очистка и фрагментация поликлональных и моноклональных антител (Coligan и др. (2001) *Current Protocols in Immunology*, том 1, John Wiley and Sons, Inc., Нью-Йорк; Harlow и Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк; Harlow и Lane, выше). Доступны стандартные методики для определения характеристик взаимодействий лиганд/рецептор (см., например, Coligan и др. (2001) *Current Protocols in Immunology*, том 4, John Wiley, Inc., Нью-Йорк).

Можно получить моноклональные, поликлональные и гуманизированные антитела (см., например, Sheperd и Dean (ред.) (2000) *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, Нью-Йорк, Нью-Йорк; Kontermann и Dubel (ред.) (2001) *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, Нью-Йорк; Harlow и Lane (1988) *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк, с. 139 - 243; Carpenter и др. (2000) *J. Immunol.* 165:6205; He и др. (1998) *J. Immunol.* 160:1029; Tang и др. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:27371-27378; Васа и др. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; Chothia и др. (1989) *Nature* 342:877-883; Foote и Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-499; патент США номер 6329511).

Альтернативой гуманизированию является применение библиотек антител человека, отображенных на фаге, или библиотек антител человека в трансгенных мышах (Vaughan и др. (1996) *Nature Biotechnol.* 14:309-314; Barbas (1995) *Nature Medicine* 1:837-839; Mendez и др. (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Hoogenboom и Chames (2000) *Immunol. Today* 21:371-377; Barbas и др. (2001) *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк; Кау и др. (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, Сан-Диего, Калифорния; de Bruin и др. (1999) *Nature Biotechnol.* 17:397-399).

Описаны одноцепочечные антитела и диатела (см., например, Malecki и др. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:213-218; Conrath и др. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:7346-7350; Desmyter и др. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:26285-26290; Hudson и Kortt (1999) *J. Immunol. Methods* 231:177-189; и патент США номер 4946778). Предложены бифункциональные антитела (см., например, Mack и др. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7021-7025; Carter (2001) *J. Immunol. Methods* 248:7-15; Volkel и др. (2001) *Protein Engineering* 14:815-823; Segal и др. (2001) *J. Immunol. Methods* 248:1-6; Brennan и др. (1985) *Science* 229:81-83; Raso и др. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:27623; Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; Traunecker и др. (1991) *EMBO J.* 10:3655-3659; и патенты США № 5932448, 5532210 и 6129914).

Также предложены биспецифические антитела (см., например, Azzoni и др. (1998) *J. Immunol.* 161:3493; Kita и др. (1999) *J. Immunol.* 162:6901; Merchant и др. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:9115; Pandey и др. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:38633; Zheng и др. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:12999; Propst и др. (2000) *J. Immunol.* 165:2214; Long (1999) *Ann. Rev. Immunol.* 17:875).

Очистка антигена не требуется для получения антител. Животных можно иммунизировать клетками, несущими интересующий антиген. Из иммунизированных животных затем можно выделить спленоциты, и полученные спленоциты можно слить с линией клеток миеломы для получения гибридомы (см., например, Meyaard и др. (1997) *Immunity* 7:283-290; Wright и др. (2000) *Immunity* 13:233-242; Preston и др., выше; Kaithamana и др. (1999) *J. Immunol.* 163:5157-5164).

Антитела можно конъюгировать, например, с низкомолекулярными лекарственными средствами, ферментами, липосомами, полиэтиленгликолем (ПЭГ). Антитела полезны для включения в наборы, для терапевтических, диагностических или других целей и включают антитела, соединенные, например, с красителями, радиоактивными изотопами, ферментами или металлами, например, коллоидным золотом (см., например, Le Doussal и др. (1991) *J. Immunol.* 146:169-175; Gibellini и др. (1998) *J. Immunol.* 160:3891-3898; Hsing и Bishop (1999) *J. Immunol.* 162:2804-2811; Everts и др. (2002) *J. Immunol.* 168:883-

889).

Доступны способы проточной цитометрии, включая сортировку клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) (см., например, Owens и др. (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Хобокен, Нью-Джерси; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2^о изд.; Wiley-Liss, Хобокен, Нью-Джерси; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Хобокен, Нью-Джерси). Доступны флуоресцентные реагенты, подходящие для модификации нуклеиновых кислот, включая праймеры и зонды из нуклеиновых кислот, полипептиды и антитела, для применения, например, в качестве диагностических реагентов (*Molecular Probes (2003) Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Юджин, Орегон; Sigma-Aldrich (2003) *Catalogue*, Сент-Луис, Миссури).

Описаны стандартные способы гистологии иммунной системы (см., например, Muller-Harmelink (ред.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, Нью-Йорк, Нью-Йорк; Hiatt и др. (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, и Wilkins, Филадельфия, Пенсильвания; Louis и др. (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, Нью-Йорк, Нью-Йорк).

Доступны пакеты программного обеспечения и базы данных для определения, например, антигенных фрагментов, лидерных последовательностей, укладки белков, функциональных доменов, сайтов гликозилирования и выравнивания последовательностей (см., например, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Бетесда, Мэриленд); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., Сан-Диего, Калифорния); DeCypher® (TimeLogic Corp., Кристал Бэй, Невада); Menne и др. (2000) *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne и др. (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16:741-742; Wren и др. (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; vonHeijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; vonHeijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690).

Примеры

Следующие примеры служат для пояснения настоящего изобретения. Ни в коем случае не предполагается, что данные примеры ограничивают объем настоящего изобретения.

Пример 1. Специфичность доступных для приобретения антител против hSIRP α .

Специфичность связывания различных доступных для приобретения моноклональных антител против hSIRP α (табл. 7) с вариантом 1 hSIRP α (hSIRP α V1; номер доступа в GenBank: NM001040022.1) (SEQ ID NO: 34), вариантом 2 hSIRP α (hSIRP α V2; номер доступа в GenBank: D86043.1) (SEQ ID NO: 36), hSIRP β 1 (номер доступа в GenBank: NM006065.4) (SEQ ID NO: 38), вариантом 3 транскрипта hSIRP β 1/hSIRP β L (номер доступа в NCBI: NM001135844.3) (SEQ ID NO: 117) и hSIRP γ (номер доступа в NCBI: NM018556.3) (SEQ ID NO: 40) оценивали с помощью клеточного ELISA (CELISA). Реакционную способность подтверждали, применяя клетки CHO-K1 (ATCC CCL-61), которые были временно трансфицированы, с применением липофектамина 2000, кДНК, кодирующей полноразмерную открытую рамку считывания hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP β 1, hSIRP β L и hSIRP γ , субклонированную в вектор pCI-neo (Promega, Мадисон, Висконсин). Клетки CHO-K1.hSIRP α V1, CHO-K1.hSIRP α V2, CHO-K1.hSIRP β 1, CHO-K1.hSIRP β L и CHO-K1.hSIRP γ высевали в культуральную среду (DMEM-F12 (Gibco), дополненную 5% сывороткой новорожденных телят (BioWest) и пенициллином/стрептомицином (Gibco)), в 96-луночные культуральные планшеты с плоским дном и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% в течение 24 ч. Затем культуральную среду удаляли и клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с очищенными антителами против hSIRP α (используемыми при концентрации 10 мкг/мл и ее разведениях). Затем клетки промывали ФБР-Т и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с антителом козы против IgG мыши, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) (Southern Biotech). Затем клетки промывали три раза ФБР-Т и визуализировали иммунореакционную способность против hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP β 1, hSIRP β L и hSIRP γ с помощью стабилизированного хромогена тетраметилбензида (ТМБ) (Invitrogen). Реакции останавливали добавлением 0,5 М H₂SO₄ и считывали поглощение на 450 и 610 нм. Значения EC₅₀ - концентрацию, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания - рассчитывали, применяя GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc).

Таблица 7

Доступные для приобретения антитела против hSIRP α , используемые для сравнения с антителами, полученными в данном изобретении

Мишень	Клон	Номер в каталоге	Компания	Вид	Реакционная способность	Изотип
hSIRP α	SE5A5	323802	Biolegend	мышь	человек	IgG1
hSIRP α	7B3	LS-C340387	LifeSpan Biosciences	мышь	человек	IgG1
hSIRP α	1B5	LS-C338479	LifeSpan Biosciences	мышь	человек	IgG1
hSIRP α	1C6	LS-C338477	LifeSpan Biosciences	мышь	человек	IgG1
hSIRP α	27	sc-136067	Santa Cruz Biotechnology	мышь	человек, мышь, крыса	IgG1
hSIRP α	SE7C2	sc-23863	Santa Cruz Biotechnology	мышь	человек	IgG1
hSIRP α	P3C4	LS-C179629-100	CliniSciences	мышь	человек	IgG2a
hSIRP α	2A4A5	W172-3	MBL International	мышь	человек	IgG2a
hSIRP α	15-414	LS-C58098	LifeSpan Biosciences	мышь	человек	IgG2a
hSIRP α	1H1	LS-C338476	LifeSpan Biosciences	мышь	человек	IgG2a
hSIRP α	C-7	sc-376884	Santa Cruz Biotechnology	мышь	человек	IgG2a
hSIRP α	03	11612-MM03-100	Sino Biological Inc.	мышь	человек	IgG2b
hSIRP α	5E10	LS C83566	LifeSpan Biosciences	мышь	человек	IgG2b
hSIRP α	602411	MAB4546	R&D	мышь	человек	IgG2b
hSIRP α	EPR16264	ab191419	Abcam	кролик	человек, мышь, крыса	IgG
hSIRP α	D6I3M	13379S	Cell Signaling Technology	кролик	человек, мышь, крыса, обезьяна	IgG
hSIRP α	001	50956-R001_100ug	Sino Biological Inc.	кролик	мышь, человек	IgG
hSIRP α	REA144	130-099-768	Miltenyi Biotec	человек	человек	IgG1
hSIRP α	KWAR23	TAB-453CT	Creative Biolabs	человек	человек	IgG4

На фиг. 1 и в следующей табл. 8 представлено, что доступные для приобретения антитела против hSIRP α вступают в перекрестную реакцию по меньшей мере с hSIRP β 1, hSIRP β L или hSIRP γ или демонстрируют аллель-специфическое связывание с hSIRP α V2. Антитело KWAR23 вступает в перекрестную реакцию со всеми исследованными представителями семейства рецепторов SIRP: оно связывается с hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP β 1, hSIRP β L и hSIRP γ .

Таблица 8

Антитело	Связывание hSIRP α V1, EC50 (нМ)	Связывание hSIRP α V2, EC50 (нМ)	Связывание hSIRP β 1, EC50 (нМ)	Связывание hSIRP γ , EC50 (нМ)	Связывание hSIRP β L, EC50 (нМ)
hSIRP α .50A	1,626	1,627	н/о	1,475	0,639
Антитело против hSIRP α (клон SE5A5)	0,372	0,186	0,185	0,200	0,122
Антитело против hSIRP α (клон 7B3)	0,187	0,300	0,255	н/о	0,206
Антитело против hSIRP α (клон 1B5)	н/о	0,122	н/о	н/о	н/о
Антитело против hSIRP α (клон 1C6)	0,739	0,167	2,965	15,589	2,008
Антитело против hSIRP α (клон 27)	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Антитело против hSIRP α (клон SE7C2)	1,269*	0,300	н/о	1,525	26,818*
Антитело против hSIRP α (клон P3C4)	0,288	2,154	0,383	0,365	0,136
Антитело против hSIRP α (клон 2A4A5)	н/о	1,005	8,633	н/о	12,156*
Антитело против hSIRP α (клон 15-414)	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Антитело против hSIRP α (клон 1H1)	н/о	0,204	н/о	н/о	н/о
Антитело против hSIRP α (клон C-7)	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Антитело против hSIRP α (клон 03)	96,016*	15,059*	16,043*	17,303*	9,109*
Антитело против hSIRP α (клон 5E10)	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Антитело против hSIRP α (клон 602411)	0,068	н/о	0,081	3,622	0,060
Антитело против hSIRP α (клон EPR16264)	н/о	2,450*	н/о	н/о	н/о
Антитело против hSIRP α (клон D6I3M)	18,690*	8,762*	н/о	н/о	н/о
Антитело против hSIRP α (клон 001)	18,081*	н/о	н/о	0,494	6,253*
Антитело против hSIRP α (клон REA144)	5,243*	3,274*	4,534*	3,212*	2,147*
KWAR23	0,067	0,062	0,140	0,043	0,097

Значения со знаком * были экстраполированы; н/о - не обнаружили.

Пример 2. Иммунизация и селекция антител против hSIRP α .

Для того чтобы получить антитела SIRP α , которые связываются со всеми известными аллелями SIRP α и не связываются с SIRP β 1, мышей иммунизировали экспрессионной конструкцией pCI-neo, ко-

дирующей hSIRP α V1 и hSIRP α V2. Мышей иммунизировали с помощью генной пушки, применяя генную пушку Helios (BioRad, Геркулес, Калифорния) и покрытые ДНК золотые пули (BioRad), следуя инструкциям производителя. Вкратце, частицы золота диаметром 1 мкм покрывали кДНК pCI-neo-hSIRP α V1 или pCI-neo-hSIRP α V2 и коммерчески доступными векторами экспрессии Flt3L мыши и GM-CSF мыши в соотношении 2:1:1 (оба от Aldevron, Фарго, Северная Дакота). Всего использовали 1 мкг плазмидной ДНК для покрытия 500 мкг частиц золота. В частности, самок мышей BALB/C в возрасте 7-8 недель (Harlan) иммунизировали в уши с помощью генной пушки, проведя 3 цикла введения в оба уха.

Для позитивной и негативной селекции В-клеток и целей CELISA получали стабильные линии клеток CHO-K1.hSIRP α V1, CHO-K1.hSIRP α V2, CHO-K1.hSIRP β 1 и CHO-K1.hCD47 путем трансфекции клеток CHO-K1 вектором pCI-neo, кодирующим полноразмерную открытую рамку считывания hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP β 1 и hCD47 (номер доступа в NCBI: NM001777.3) (SEQ ID NO: 42), соответственно. Стабильные клоны получали с помощью метода серийных разведений.

Титр антител оценивали с помощью CELISA, применяя стабильные линии клеток CHO-K1.hSIRP α V1 и CHO-K1.hSIRP α V2. Данные экспрессирующие hSIRP α линии клеток CHO-K1 поддерживали в DMEM-F12 (Gibco), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (Hyclone) и 80 Ед. пенициллина/стрептомицина (Gibco). Клетки высевали в 96-луночные культуральные планшеты с плоским дном при плотности 8×10^4 клеток/луночку и культивировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% до достижения конfluence слоев клеток. Клетки инкубировали с каждым образцом разбавленных мышинных сывороток в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95%. Затем клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором (ФБР)/0,05% Tween-20 (ФБР-Т) и инкубировали с конъюгатом антитела козы против IgG мыши с HRP (Southern Biotech) в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95%. Затем клетки промывали три раза ФБР-Т и визуализировали иммунореакционную способность антитела против hSIRP α с помощью стабилизированного хромогена ТМБ (Invitrogen). Реакции останавливали добавлением 0,5 М H₂SO₄ и считывали поглощение на 450 и 610 нм. Титр антитела против hSIRP α был выше, чем 1:2500, в каждом отдельном образце сыворотки мыши, что детектировали после двух иммунизаций ДНК. Всех мышей, у которых продемонстрировали реакционную способность против hSIRP α V1 и hSIRP α V2, иммунизировали последний третий раз и умерщвляли 14 дней спустя. Обедненные эритроцитами популяции клеток селезенки и лимфоузлов получали, как описано ранее (Steenbakkers и др., 1992, J. Immunol. Meth. 152: 69-77; Steenbakkers и др., 1994, Mol. Biol. Rep. 19: 125-134), и замораживали при -180°C.

Для селекции продуцирующих антитело против hSIRP α В-клеток была спроектирована и разработана стратегия селекции, которая позволяла связывать преимущественно В-клетки, экспрессирующие антитела, которые связываются с hSIRP α V1 и hSIRP α V2. Спленоциты и лимфатические узлы собирали из иммунизированных hSIRP α V1/V2 мышей, и выделенные клетки инкубировали с CHO-K1.hSIRP β 1, которые высевали в культуральные флаконы T25 и облучали 30 грей. Через 1 ч не связавшиеся клетки осторожно удаляли, возвратно-поступательно перемещая флакон. Среду, содержащую не связавшиеся клетки, затем переносили в новый флакон T25, содержащий облученные клетки CHO-K1.hSIRP β 1. Данную процедуру выполняли всего три раза на льду, чтобы осуществить негативную селекцию вступающих в реакцию с hSIRP β 1 В-клеток. Затем среду, содержащую не связавшиеся В-клетки, инкубировали с клетками CHO-K1.hSIRP α V1 и CHO-K1.hSIRP α V2, которые были облучены 3000 грей. После 1,5 ч инкубации на льду не связавшиеся клетки удаляли с помощью множества этапов промывки, применяя культуральную среду. Затем флаконы T25, содержащие клетки CHO-K1.hSIRP α V1 и CHO-K1.hSIRP α V2 со связанными лимфоцитами, собирали с помощью трипсина-ЭДТА (Sigma). Связавшиеся В-клетки культивировали, как описано у Steenbakkers и др., 1994, Mol. Biol. Rep. 19: 125-134. Вкратце, прошедшие селекцию В-клетки смешивали с 10% (в объемном отношении) супернатанта Т-клеток и 50000 облученных (25 грей) подкармливающих клеток EL-4 B5 в конечном объеме 200 мкл среды в 96-луночных культуральных планшетах с плоским дном. В день восемь супернатанты подвергали скринингу на реакционную способность по отношению к hSIRP α V1 и hSIRP α V2 с помощью CELISA, как описано ниже.

CHO-K1.hSIRP α V1, CHO-K1.hSIRP α V2 и CHO-K1.hSIRP β 1 высевали в культуральную среду (DMEM-F12 (Gibco), дополненную 10% фетальной бычьей сывороткой (Hyclone) и 80 Ед. пенициллина/стрептомицина (Gibco)) в 96-луночные культуральные планшеты с плоским дном и культивировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% до достижения конfluence. Затем культуральную среду удаляли и клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с супернатантами из культур В-клеток. Затем клетки промывали ФБР-Т и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с конъюгатом антитела козы против IgG мыши с HRP (Southern Biotech). Затем клетки промывали три раза ФБР-Т и иммунореакционную способность антитела против hSIRP α V1, антитела против hSIRP α V2 и антитела против hSIRP β 1 визуализировали с помощью стабилизированного хромогена ТМБ (Invitrogen). Реакции останавливали добавлением 0,5 М H₂SO₄ и считывали поглощение на 450 и 610 нм.

Иммунореакционную способность по отношению к SIRP γ человека оценивали с помощью ELISA, применяя покрытые рекомбинантным hSIRP γ /Fc-белком (R&D Systems, номер в каталоге 4486-SB-050; SEQ ID NO: 108) 96-луночные планшеты с плоским дном MaxiSorp. Покрытые белком 96-луночные

планшеты блокировали в ФБР/1% бычьим сывороточном альбумине (БСА) в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ). ФБР/1% БСА удаляли и планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с супернатантами из культур В-клеток. Затем планшеты промывали ФБР-Т и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с конъюгатом антитела козы против IgG мыши с HRP (Southern Biotech). Затем лунки промывали три раза ФБР-Т и визуализировали иммунореакционную способность, направленную против hSIRP γ , с помощью стабилизированного хромогена ТМБ (Invitrogen). Реакции останавливали добавлением 0,5 М H₂SO₄ и считывали поглощение на 450 и 610 нм.

Клоны В-клеток из способных вступать в реакцию с hSIRP α супернатантов, который были неспособны или которые были минимально способны вступать в реакцию с hSIRP β 1 иммортализовали путем миниэлектрослияния, следуя опубликованным процедурам (Steenbakkers и др., 1992, J. Immunol. Meth. 152: 69-77; Steenbakkers и др., 1994, Mol. Biol. Rep. 19:125-34), с некоторыми незначительными отклонениями (например, реакцию с проназой пропустили). Вкратце, В-клетки смешивали с 10⁶ клеток миеломы мыши Sp2/0-Ag14 (ATCC CRL-1581) в изомолярном буфере для электрослияния (Eppendorf). Электрослияние проводили в камере для слияния емкостью 50 мкл под действием переменного электрического поля в течение 15 с (1 МГц, среднеквадратическое напряжение переменного тока 23) с последующим прямоугольным импульсом сильного поля постоянного тока длительностью 10 мс (180 вольт постоянного тока) и снова переменным электрическим полем в течение 15 с (1 МГц, среднеквадратическое напряжение переменного тока 23). Содержимое камеры переносили в селективную среду для гибридом и высевали в 96-луночный планшет при условиях предельных разведений. В день 10 после электрослияния супернатанты гибридом подвергали скринингу для обнаружения активности связывания hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP β 1 и hSIRP γ с помощью CELISA и ELISA, как описано выше. Гибридомы, которые секретируют в супернатант антитела, которые специфично связывали hSIRP α V1 и hSIRP α V2, замораживали при -180°C (партия -1), а также субклонировали методом предельных разведений, чтобы сохранить их целостность и стабильность. Стабильные гибридомы замораживали при -180°C (партия -LD1) до достижения конfluence слоев клеток.

Дальнейшую селекцию гибридом проводили путем оценки способности блокировать взаимодействие hSIRP α V1/hCD47 в формате CELISA. Для оценки блокирования hCD47 клетки CHO-K1.hCD47 высевали в 384-луночные культуральные планшеты с плоским дном и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% в культуральной среде. Рекомбинантный белок hSIRP α /Fc (R&D Systems, номер в каталоге 4546-SA-050; SEQ ID NO: 107) предварительно инкубировали с серией разведений супернатантов гибридомы, содержащих реагирующие с hSIRP α антитела и контрольные антитела (при концентрации 10 мкг/мл и ее разведениях) в течение 30 мин при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95%. Конфлюэнтные клетки CHO-K1.hCD47 промывали ФБР-Т и инкубировали в течение 1 ч со смесями, содержащими реагирующие с hSIRP α антитела и рекомбинантный белок hSIRP α /Fc, при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95%. Затем клетки промывали ФБР-Т с последующим добавлением конъюгата антител козы против IgG человека с HRP (Jackson Immuno Research) к клеткам, которые инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95%. Затем клетки промывали три раза ФБР-Т и визуализировали связывание белка hSIRP α /Fc с помощью стабилизированного хромогена ТМБ (Invitrogen). Реакции останавливали добавлением 0,5 М H₂SO₄ и считывали поглощение на 450 и 610 нм.

Прошедшие селекцию стабильные гибридомы культивировали в бессывороточных средах в течение 7 дней; супернатанты собирали и антитела очищали, применяя смолу с белком A MabSelect Sure, следуя инструкциям производителя (GE Healthcare). Концентрации антител определяли, применяя спектрофотометрию. Супернатанты из культур гибридом использовали для изотипирования гибридом. Вкратце, изотипирование проводили, применяя набор для изотипирования моноклональных антител мыши (Biorad), основанный на индикаторной полоске с полосами иммобилизованных антител козы против антител мыши к каждому из обычных изотипов и легких цепей мыши. Все полученные антитела идентифицировали как IgG1 мыши. Последовательности антител были установлены путем секвенирования переменных областей IgG1 мыши материала гибридомы, которое проводили в LakePharma, применяя следующий способ: выделяли общую РНК клеток гибридом, что позволяло синтезировать кДНК. Проводили быструю амплификацию концов кДНК (RACE), которая позволяла клонирование положительных фрагментов в вектор TOPO (Thermo Fisher Scientific). Клоны TOPO секвенировали и последовательности аннотировали, применяя VBASE2 (Retter и др., VBASE2, an integrative V gene database. Nucleic Acids Res. 2005, 1 января; 33 (выпуск базы данных): D671-4).

Пример 3. Определение характеристик антител против hSIRP α .

Специфичность связывания антитела hSIRP α .50A с hSIRP α сравнивали с таковой у антитела KWAR23 (канадский патент 2939293 A1) в формате CELISA. Клетки CHO-K1 временно трансфицировали кДНК hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP β 1 и hSIRP γ (номер доступа в GenBank: NM018556.3) (SEQ ID NO: 39). Затем оценивали связывание hSIRP α с помощью CELISA, применяя клетки CHO-K1.hSIRP α V1, CHO-K1.hSIRP α V2, CHO-K1.hSIRP β 1 и CHO-K1.hSIRP γ . Детектирование связанного антитела осуществляли с помощью антитела козы против IgG мыши-HRP (Southern Biotech) для антител мыши, включая hSIRP α .50A и контрольные антитела, или, в качестве альтернативы, с помощью конъюгата антител козы

против IgG человека с HRP (Jackson Immuno Research) для антитела KWAR23. KWAR23 (SEQ ID NO: 130; SEQ ID NO: 131) экспрессировался в виде химерного антитела IgG4 каппа человека в клетках CHO. На фиг. 2 и в следующей табл. 9 показано, что антитело KWAR23 вступает в перекрестную реакцию со всеми исследованными представителями семейства рецепторов SIRP: оно связывается с hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP β 1 и hSIRP γ . Значения EC₅₀ представляют собой концентрацию, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания (среднее значение и стандартное отклонение рассчитывали по значениям, полученным в двух независимых экспериментах).

Таблица 9

Антитело	EC50 связывания hSIRP α V1 (нМ)		EC50 связывания hSIRP α V2 (нМ)	
	Среднее	CO	Среднее	CO
KWAR23	0,081	0,001	0,051	0,004
hSIRPα.50A	1,365	0,164	1,296	0,186
Антитело против hSIRPα (клон SE5A5)	0,304		0,200	
Антитело против hSIRPγ (клон LSB2.20)	н/о		н/о	
Антитело	EC50 связывания hSIRP β 1 (нМ)		EC50 связывания hSIRP γ (нМ)	
	Среднее	CO	Среднее	CO
KWAR23	0,161	0,007	0,040	0,002
hSIRPα.50A	н/о	н/о	1,249	0,179
Антитело против hSIRPα (клон SE5A5)	0,192		0,168	
Антитело против hSIRPγ (клон LSB2.20)	н/о		0,265	

Пустые квадраты указывают на измерения n=1. н/о - не обнаружено.

Кроме того, специфичность hSIRP α .50A ко всем известным аллелям hSIRP α (аллельным вариантам, описанным у Takenaka и др., 2007, Nat Immunol. 8:1313-1323) дополнительно исследовали с помощью CELISA, используя такую же стратегию, как описанная выше. Для этой цели связывание hSIRP α .50A оценивали, применяя клетки CHO-K1, которые были временно трансфицированы кДНК, кодирующими полноразмерные hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP α V3 (NA07056_V3) (SEQ ID NO: 43), hSIRP α V4 (NA11832_V4) (SEQ ID NO: 45), hSIRP α V5 (NA18502_V5) (SEQ ID NO: 47), hSIRP α V6 (NA18507_V6) (SEQ ID NO: 49), hSIRP α V8 (NA18570_V8) (SEQ ID NO: 51) и hSIRP α V9 (NA18943_V9) (SEQ ID NO: 53). На фиг. 3 и в следующей табл. 10 продемонстрирована реакционная способность клона антитела hSIRP α .50A с каждым из данных аллелей hSIRP α . Значения EC₅₀ представляют собой концентрацию, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания (среднее значение и стандартное отклонение рассчитывали по значениям, полученным в двух независимых экспериментах).

Таблица 10

		Антитело	
		hSIRP α .50A	Антитело против hSIRP α (клон SE5A5)
hSIRP α V1	EC50 (нМ)	0,936	0,327
	CO	0,285	0,107
hSIRP α V2	EC50 (нМ)	0,665	0,200
	CO	0,106	0,046
hSIRP α V3	EC50 (нМ)	0,688	0,226
	CO	0,097	0,052

hSIRPαV4	EC50 (нМ)	0,824	0,256
	CO	0,280	0,085
hSIRPαV5	EC50 (нМ)	0,765	0,276
	CO	0,210	0,086
hSIRPαV6	EC50 (нМ)	0,954	0,098
	CO	0,437	0,050
hSIRPαV8	EC50 (нМ)	0,644	0,300
	CO	0,066	0,061
hSIRPαV9	EC50 (нМ)	0,733	0,260
	CO	0,205	0,079

Пример 4. Способность hSIRP α .50A блокировать hCD47.

С помощью проточной цитометрии анализировали способность антитела hSIRP α .50A блокировать связывание рекомбинантного белка hCD47/Fc (R&D Systems, номер в каталоге 4670-CD-050; SEQ ID NO: 109) с экспрессированным на поверхности клетки hSIRP α . Для данной цели линии клеток моноцитов THP-1 (ATCC TIB-202) и U-937 (ATCC CRL-1593.2) использовали в качестве источника hSIRP α в данном анализе. Клетки THP-1 и U-937 высевали в 96-луночные культуральные планшеты с закругленным дном и инкубировали в течение 45 мин с блокирующим FcR реагентом (Miltenyi Biotec) и антителом hSIRP α .50A (200 мкг/мл и ее разведения) в ФБР/1% БСА при 4°C. Затем клетки промывали три раза ФБР/1% БСА и инкубировали с меченым DyLight 488 рекомбинантным белком hCD47/Fc в течение 30 мин при 4°C. После данной процедуры мечения клетки промывали два раза, ресуспендировали в ФБР/1% БСА, содержащем 0,1 мкг/мл DAPI (BioLegend), и анализировали с помощью проточной цитометрии на FACSCanto II (BD Biosciences). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo версии 10 (FlowJo, LLC).

На фиг. 4 и в следующей табл. 11 представлено, что связывание рекомбинантного hCD47, гибридованного с доменом Fc IgG1 человека, отслеживали в присутствии возрастающих количеств антитела hSIRP α .50A. Антитело hSIRP α .50A блокировало взаимодействие hSIRP α /hCD47, что выявили, применяя способ на основе проточной цитометрии, описанный выше. Значения IC₅₀ для блокирования hCD47 рассчитывали по этим данным. Значения IC₅₀ представляют собой концентрацию, при которой наблюдается половина ингибирования.

Таблица 11

Антитело	THP-1	U-937
	IC50 (нМ)	IC50 (нМ)
hSIRPα.50A	4,605	7,164

Затем исследовали связывание hSIRP α .50A с hSIRP α , экспрессированным на первичных CD14⁺ моноцитах человека. Кроме того, оценивали способность hSIRP α .50A блокировать взаимодействие между hSIRP α и рекомбинантным белком hCD47/Fc. Для данной цели CD14⁺ моноциты выделяли из очищенных фиколлом мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК), применяя коктейль для обогащения моноцитами человека RosetteSep (Stemcell). Процент моноцитов, присутствующих после обогащения, определяли с помощью проточной цитометрии на FACSVerse (BD Biosciences), на основании окрашивания CD14, применяя детектирующее антитело мыши против CD14 человека, конъюгированное с APC-Cy7 (BD Biosciences). Затем обогащенные CD14⁺ МКПК высевали в 96-луночные культуральные планшеты с закругленным дном и инкубировали в течение 40 мин с блокирующим FcR реагентом (Miltenyi Biotec), содержащим антитело hSIRP α .50A (25 мкг/мл и ее разведения) в ФБР/1% БСА, при 4°C. Затем клетки промывали три раза ФБР/1% БСА и инкубировали с меченым FITC детектирующим антителом козы против Ig мыши (BD Biosciences) в ФБР/1% БСА в течение 40 мин при 4°C. После данной процедуры мечения клетки промывали два раза, ресуспендировали в ФБР/1% БСА, содержащем 0,1 мкг/мл DAPI (BioLegend), и анализировали с помощью проточной цитометрии на FACSVerse (BD Biosciences). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo версии 10 (FlowJo, LLC).

На фиг. 5А и В и в следующей табл. 12 указано, что hSIRP α .50A связывается с первичными обогащенными CD14⁺ моноцитами человека. Значения EC₅₀ представляют собой концентрацию, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания. Чтобы оценить блокирующую способность hSIRP α .50A, обогащенные CD14⁺ моноциты высевали в 96-луночные культуральные планшеты с закругленным дном и инкубировали в течение 45 мин с блокирующим FcR реагентом (Miltenyi Biotec) и антителом hSIRP α .50A (200 мкг/мл и ее разведения) в ФБР/1% БСА при 4°C. После этого клетки промывали три раза ФБР/1% БСА и инкубировали с 10 мкг/мл меченого DyLight 488 рекомбинантного белка hCD47/Fc в течение 45 мин при 4°C. После данной процедуры мечения клетки промывали два раза, ресуспендировали в ФБР/1% БСА, содержащем 0,1 мкг/мл DAPI (BioLegend), и анализировали с помощью проточной

цитометрии на FACSVerser (BD Biosciences). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo версии 10 (FlowJo, LLC). На фиг. 5C и D и в следующей табл. 12 продемонстрирована способность антитела hSIRP α .50A блокировать взаимодействие hSIRP α /hCD47. Значения IC₅₀ для блокирования hCD47 рассчитывали по этим данным. Значения IC₅₀ представляют собой концентрацию, при которой наблюдается половина ингибирования.

Таблица 12

Антитело	Донор 1		Донор 2	
	EC50 (нМ)	IC50 (нМ)	EC50 (нМ)	IC50 (нМ)
hSIRP α .50A	7,381	4,618	3,081	1,035

Пример 5. Функциональность МАТ hSIRP α .50A в анализе фагоцитоза гранулоцитами человека.

Для того чтобы подтвердить функциональность hSIRP α .50A в первичных иммунных клетках, гранулоциты (например, эффекторные клетки) выделяли из крови с ЭДТА здоровых доноров человека. Сначала кровь с ЭДТА от каждого донора объединяли и центрифугировали при 300 g в течение 6 мин при 20°C. Затем удаляли плазму путем аспирации и оставшиеся клетки крови осторожно ресуспендировали. Клетки обрабатывали лизирующим эритроциты (RBC) буфером (155 мМ NH₄Cl; 10 мМ KHCO₃) и инкубировали в течение 10 мин на льду. Затем клетки центрифугировали при 300 g в течение 7 мин. Супернатанты, содержащие лизированные RBC, удаляли путем аспирации и оставшиеся клетки крови осторожно ресуспендировали в лизирующем RBC буфере и держали на льду в течение 1 мин. Лизис RBC останавливали путем добавления аналитической среды (IMDM (Gibco), дополненной 10% фетальной бьей сывороткой (Gibco) и пенициллином/стрептомицином (Gibco)). Клетки крови центрифугировали при 300 g в течение 6 минут и супернатанты удаляли путем аспирации, чтобы удалить как можно больше оставшихся RBC. Затем клетки крови с лизированными эритроцитами ресуспендировали в аналитической среде, содержащей 10 нг/мл IFN γ , и клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95%. Не прикрепившиеся клетки крови, содержащие гранулоциты человека, собирали путем легкой промывки культурального планшета аналитической средой (моноциты удаляли благодаря их прикреплению к пластиковой поверхности). Процент гранулоцитов, присутствующих в суспензии клеток, определяли с помощью проточной цитометрии на FACSCanto II (BD Biosciences) на основании высоких значений прямого рассеяния (FSC) и бокового рассеяния (SSC). Связывание hSIRP α .50A с гранулоцитами человека оценивали путем инкубации клеток в течение 30 мин при 4°C с антителом hSIRP α .50A (25 мкг/мл и ее разведения) в ФБР/1% БСА, содержащем 10% аутологичной сыворотки (ФБР/1% БСА/10% сыворотки). Затем клетки промывали три раза ФБР/1% БСА/10% сыворотки и инкубировали в течение 30 мин при 4°C с меченым FITC детектирующим антителом козы против Ig мыши (BD Biosciences). После данной процедуры меченые клетки промывали два раза, ресуспендировали в ФБР/1% БСА/10% сыворотки и анализировали с помощью проточной цитометрии на FACSCanto II (BD Biosciences). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo версии 10 (FlowJo, LLC). На фиг. 6A показано, что hSIRP α .50A связывается с первичными гранулоцитами человека. Значения EC₅₀ представляют собой концентрацию, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания.

Затем клетки-мишени метили флуоресцентной меткой: либо красителем для оценки пролиферации клеток eFluor450 (eBioscience) в случае клеток лимфомы Raji (ECACC 85011429), Daudi (ECACC 85011437), Ramos (ECACC 85030802) и ВJAB (DSMZ ACC-757), либо, в качестве альтернативы, раствором для меченых клеток Vybrant DiD (Thermo Fisher Scientific) для клеток FaDu. Мечение проводили, следуя инструкциям производителя. Меченые клетки-мишени совместно культивировали в течение 2-3 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с выделенными первичными гранулоцитами человека в соотношении 1:1 (7,5 \times 10⁴ клеток каждой мишени и эффектора на лунку 96-луночного культурального планшета с закругленным дном) в присутствии 0,1 мкг/мл ритуксимаба (антитела против hCD20). Кроме того, клетки совместно культивировали с 0,1 мкг/мл ритуксимаба в присутствии 10 мкг/мл hSIRP α .50A. Фагоцитоз анализировали путем определения процента гранулоцитов, положительных по eFluor450 (или DiD), применяя проточную цитометрию на FACSCanto II (BD Biosciences). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo версии 10 (FlowJo, LLC).

По сравнению с изотипическим контролем IgG1 мыши, hSIRP α .50A эффективно повышает фагоцитоз опухолевых клеток, вызванный ритуксимабом (фиг. 6B). Той же процедуре следовали с другими существующими терапевтическими антителами, такими как 0,05 мкг/мл даратумумаба (антитела против hCD38), 0,1 мкг/мл алемтузумаба (антитела против hCD52) и 0,1 мкг/мл цетуксимаба (антитела против hEGFR) (фиг. 6C-E). Полученные результаты продемонстрировали, что hSIRP α .50A повышает опосредованный антителами фагоцитоз опухолевых клеток гранулоцитами человека.

Пример 6. Функциональность МАТ hSIRP α .50A в анализе фагоцитоза макрофагами человека.

Блокирование CD47 антителом hSIRP α .50A повышает фагоцитоз опухолевых клеток лимфомы человека макрофагами человека. Макрофаги человека получали путем сначала обогащения CD14⁺ моноцитами очищенных фиколлом мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК), применяя коктейль для обогащения моноцитами человека RosetteSep (Stemcell). Моноциты высевали в 96-

луночные микропланшеты с плоским дном CellCarrier (Perkin Elmer) и культивировали в среде для макрофагов (IMDM (Gibco), дополненной 8,5% фетальной бычьей сывороткой (Gibco) и пенициллином/стрептомицином (Gibco)), содержащей 50 нг/мл колониестимулирующего фактора моноцитов человека (M-CSF), в течение 7 дней при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95%, чтобы вызвать дифференцировку в макрофаги. Данные полученные из моноцитов макрофаги (MDM) прикрепляются к субстрату, позволяя смыть другие клетки. Клетки лимфомы человека Raji, Daudi, Ramos и ВJAB подсчитывали и метили красителем для оценки пролиферации клеток eFluor450 (eBioscience), следуя инструкциям производителя. После мечения клетки лимфомы смешивали с аналитической средой (RPMI (Gibco), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (Gibco) и пенициллином/стрептомицином (Gibco)), содержащей 10 мкг/мл антитела против hSIRP α , соответствующие изотипические контроли и либо 0,1 мкг/мл ритуксимаба (антитела против hCD20), либо 0,05 мкг/мл даратумумаба (антитела против hCD38). Клетки лимфомы затем добавляли в отдельные лунки, содержащие MDM, при соотношении опухолевых клеток и фагоцитов 2,5:1, смешивали и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% в течение 2 ч. После инкубации лунки промывали ФБР, чтобы удалить большую часть нефагоцитированных опухолевых клеток, и клетки фиксировали в 2% формальдегиде в течение 10 мин при КТ. Лунки затем промывали и выдерживали в ФБР/3% БСА в темноте при 4°C в течение ночи. Клетки лимфомы, присутствующие в лунках, окрашивали конъюгированным с биотином клоном H1B19 антитела против CD19 человека (eBioscience) в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем доокрашивали конъюгированным с Alexa Fluor 488 стрептавидином (Thermo Fisher Scientific) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем окрашивали ядра DRAQ5 (Thermo Fisher Scientific) в течение 10 мин при комнатной температуре, смесь удаляли и добавляли ФБР в каждую лунку. Клетки анализировали с помощью автоматизированного флуоресцентного микроскопа Operetta (Perkin Elmer). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения Columbus версии 2.6.

На фиг. 7 показано, что hSIRP α .50A повышает опосредованную ритуксимабом и даратумумабом фагоцитарную активность. Проводили количественный анализ фагоцитоза клеток лимфомы человека, используя индекс фагоцитоза, описанный далее: (количество опухолевых клеток внутри макрофагов/количество макрофагов) \times 100; подсчитывая по меньшей мере 200 макрофагов на образец.

Пример 7. Разработка гуманизованного антитела и прививка CDR.

Антитело мыши hSIRP α .50A гуманизировали, применяя методику прививки CDR (см., например, патент США № 5225539 и Williams, D.G. и др., 2010, *Antibody Engineering*, том 1, глава 21).

Сначала идентифицировали человеческие зародышевые последовательности, применяя IgBLAST (Ye J. и др., 2013, *Nucleic Acids Res.* 41:W34-40). Для человеческой зародышевой последовательности VH hSIRP α .50A был идентифицирован V-ген IGHV1/OR15-2*02 (идентичность 75,2%) и для человеческой зародышевой последовательности VL был идентифицирован IGKV1-27*01 (идентичность 74,0%). Данные две зародышевые последовательности использовали для непосредственной прививки последовательностей CDR мыши, в результате чего получили следующие две конструкции кДНК: SEQ ID NO: 17 (VH) и SEQ ID NO: 25 (VL).

Затем создали базу данных, содержащую все человеческие последовательности, доступные в базе данных IMGT (Lefranc, M.-P. и др., 1999, *Nucleic Acid Res.* 27:209-212), в которой было идентифицировано 85848 отдельных последовательностей. Данные последовательности запрашивали в TBLASTN (2.2.31+), чтобы идентифицировать шаблонные последовательности, которые демонстрируют наибольшую идентичность каркасам последовательностей VH и VL hSIRP α .50A. Было идентифицировано три последовательности VH и три последовательности VL, которые продемонстрировали показатель подобия 75% или выше и у которых были сходные длины CDR, предпочтительно идентичные таковым в CDR1, CDR2, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 VL hSIRP α .50, соответственно.

Для тяжелой цепи каркасы, кодируемые последовательностями под номерами доступа в GenBank (Benson, D.A. и др., 2013, *Nucleic Acids Res.* 41(D1): D36-42) AB066948, AB067235 и U84168, выбирали в качестве матриц для прямой прививки последовательностей CDR VH hSIRP α .50A, в результате чего получали следующие конструкции кДНК: SEQ ID NO: 9, 11 и 13, соответственно. Для легкой цепи каркасы, кодируемые последовательностями под номерами доступа в GenBank JF894288, AB363321 и L12101, выбирали в качестве матриц для прямой прививки последовательностей CDR VL hSIRP α .50A, в результате чего получали следующие конструкции кДНК: SEQ ID NO: 19, 21 и 23. Определения каркаса и CDR соответствуют описаным у Kabat и др. ("*Sequences of Proteins of Immunological Interest*", Kabat, E., и др., Департамент здравоохранения и социальных служб США (1983)).

Для того чтобы понять влияние гуманизованных каркасных остатков на структуру Fv, создали гомологичную модель Fv hSIRP α .50A мыши, применяя "Antibody Modeling Cascade" (параметры по умолчанию) в составе Discovery Studio 4.5. Гомологичную модель строили на основе PDB ID 1C1C для легкой цепи и Fv и PDB ID 4Q0X для тяжелой цепи. Последовательности CDR прививали *in silico*, чтобы исследовать остатки, которые расположены близко к любому из CDR и которые могут влиять на конформацию петли, называемые остатками Верньера. Идентифицировали остатки, которые могут влиять на конформацию петли и которые находятся в пределах < 5Å от поверхности CDR, и заменили их на ами-

нокислоту мыши в данном положении. В полученных в результате этого матрицах проверяли присутствие мотивов посттрансляционных модификаций (ПТМ), применяя Discovery Studio 4.5, и где это возможно (т.е. не остатки CDR, не остатки Верньера) заменяли их, чтобы предотвратить ПТМ. Для тяжелой цепи удаление мотивов ПТМ предсказанной последовательности и структурные ограничения (т.е. жесткость каркаса) в VH hSIRP α .50A привели к разработке одной дополнительной конструкции: SEQ ID NO: 15. Для легкой цепи удаление ПТМ привело к разработке следующей конструкции: SEQ ID NO: 27.

Последовательности CDR прививали на каждую из идентифицированных матриц, экспрессированных в виде IgG4 (SEQ ID NO: 65), каппа (SEQ ID NO: 63) антитела человека, клонированного в вектор pCDNA3.1(+) (Thermo Fisher Scientific) для временной трансфекции клеток эмбриональной почки человека FreeStyle 293-F (HEK293T/17, ATCC CRL-11268). В каждом случае использовали вариант IgG4, несущий стабилизирующую мутацию Adair (Angal S. и др., 1993, Mol Immunol. 30: 105-108), где серин 228 превращен в пролин.

Пример 8. Синтез, экспрессия и очистка гуманизированных конструкций.

Плазмиды, кодирующие конструкции тяжелых цепей и легких цепей, смешивали в соотношении 1:1 (всего 30 мкг) и временно экспрессировали путем трансфекции ими клеток FreeStyle 293-F, применяя реагент для трансфекции 293fectin(Invitrogen), следуя инструкциям производителя. Супернатанты (30 мл) собирали через 7 дней и антитела очищали, применяя смолу с белком A MabSelect Sure, следуя инструкциям производителя (GE Healthcare). Буфер заменяли на буфер 10 мМ гистидин, 100 мМ NaCl, pH 5,5, применяя колонки для высаливания Zeba (Thermo Fisher Scientific). Концентрацию очищенных антител определяли на основании ОП на 280 нм (Nanodrop ND-1000). Уровень эндотоксина определяли с помощью ЛАЛ-теста, следуя инструкциям производителя (Lonza).

Пример 9. Связывание гуманизированных антител SIRP α .

Связывание гуманизированных антител против hSIRP α исследовали в формате CELISA. Связывание антител против hSIRP α с SIRP α V1, SIRP α V2, hSIRP β 1 и hSIRP γ человека подтверждали, применяя клетки CHO-K1, которые были временно трансфицированы кДНК, кодирующей полноразмерную открытую рамку считывания каждой из данных соответствующих мишеней, субклонированную в вектор pCI-neo. Клетки CHO-K1.hSIRP α V1, CHO-K1.hSIRP α V2, CHO-K1.hSIRP β 1 и CHO-K1.hSIRP γ высевали в культуральную среду (DMEM-F12 (Gibco), дополненную 5% сывороткой новорожденных телят (BioWest) и пенициллином/стрептомицином (Gibco)), в 96-луночные культуральные планшеты с плоским дном и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% до достижения конfluence слоев клеток. Затем культуральную среду удаляли и клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с очищенными антителами против hSIRP α (10 мкг/мл и ее разведения). Затем клетки промывали ФБР-Т и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с конъюгатом антител козы против IgG человека с HRP (Jackson Immuno Research) или с конъюгатом антител козы против IgG мыши с HRP (Southern Biotech). Затем клетки промывали три раза ФБР-Т и визуализировали иммунореакционную способность антитела против hSIRP α с помощью стабилизированного хромогена ТМБ (Invitrogen). Реакции останавливали добавлением 0,5 М H₂SO₄ и считывали поглощение на 450 и 610 нм. Значения EC₅₀ - концентрацию, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания - рассчитывали, применяя GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc). В табл. 13 представлены значения EC₅₀ гуманизированных антител против hSIRP α .

Табл. 13. Связывание гуманизированного и исходного антител hSIRP α . 50A с клетками CHO-K1.hSIRP α V1, CHO-K1.hSIRP α V2, CHO-K1.hSIRP β 1 и CHO-K1.hSIRP γ . Значения EC₅₀ представляют собой концентрацию, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания (среднее значение и стандартное отклонение рассчитывали по значениям, полученным в двух независимых экспериментах).

Таблица 13

Антитело	Связывание hSIRP α V1, EC50 (нМ)		Связывание hSIRP α V2, EC50 (нМ)		Связывание hSIRP β 1, EC50 (нМ)		Связывание hSIRP γ , EC50 (нМ)	
	Среднее	CO	Среднее	CO	Среднее	CO	Среднее	CO
hSIRP α .5 0H1L1	0,883	0,212	0,864	0,109	н/о	н/о	1,485*	0,120
hSIRP α .5 0H1L2	0,781	0,104	0,816	0,161	н/о	н/о	1,259*	0,155
hSIRP α .5 0H1L3	1,094	0,112	1,107	0,238	н/о	н/о	2,579*	0,672
hSIRP α .5 0H1L4	1,488	0,259	1,621	0,320	н/о	н/о	7,435*	0,208

hSIRP α .5 0H1L5	0,962	0,235	0,848	0,239	н/о	н/о	1,013*	0,115
hSIRP α .5 0H3L1	1,097	0,286	1,056	0,303	н/о	н/о	1,424*	0,080
hSIRP α .5 0H3L2	1,055	0,347	0,999	0,450	н/о	н/о	1,502*	0,305
hSIRP α .5 0H3L3	1,159	0,417	1,160	0,429	н/о	н/о	2,471*	0,530
hSIRP α .5 0H3L4	1,261	0,317	1,520	0,333	н/о	н/о	5,175*	0,210
hSIRP α .5 0H3L5	0,878	0,097	0,868	0,190	н/о	н/о	1,199*	0,120
hSIRP α .5 0H4L1	0,683	0,027	0,681	0,156	н/о	н/о	0,950*	0,171
hSIRP α .5 0H4L2	0,737	0,110	0,651	0,147	н/о	н/о	0,871*	0,062
hSIRP α .5 0H4L3	0,933	0,078	0,898	0,133	н/о	н/о	1,596*	0,144
hSIRP α .5 0H4L4	1,197	0,175	1,240	0,238	н/о	н/о	1,980*	0,681
hSIRP α .5 0H4L5	0,701	0,136	0,661	0,161	н/о	н/о	0,808*	0,038
hSIRP α .5 0H5L1	0,731	0,039	0,709	0,063	н/о	н/о	1,028*	0,087
hSIRP α .5 0H5L2	0,675	0,086	0,572	0,023	н/о	н/о	0,822*	0,046
hSIRP α .5 0H5L3	1,029	0,084	0,796	0,004	н/о	н/о	1,612*	0,247
hSIRP α .5 0H5L4	1,169	0,197	1,115	0,060	н/о	н/о	4,028*	0,342
hSIRP α .5 0H5L5	0,681	0,066	0,611	0,030	н/о	н/о	0,868*	0,028
hSIRP α .5 0A	1,365	0,164	1,296	0,186	н/о	н/о	1,249*	0,179

Стоит отметить, что варианты с тяжелой цепью H2 не возможно было экспрессировать в клетках FreeStyle 293-F; значения, помеченные *, были экстраполированы; н/о - не обнаружено.

Связывание исходного и гуманизированного антител против hSIRP α с hSIRP γ дополнительно оценивали, применяя клетки NK-92MI (ATCC CRL-2408) - линию клеток-естественных киллеров, независимых от интерлейкина-2 (IL-2), полученную из линии клеток NK-92. Клетки NK-92MI высевали в 96-луночные культуральные планшеты с закругленным дном и инкубировали в течение 30 мин с вариантами гуманизированного антитела hSIRP α .50A (100 мкг/мл и ее разведения) в ФБР/1% БСА при 4°C. Затем клетки промывали три раза ФБР/1% БСА и инкубировали в течение 30 мин при 4°C с меченым FITC детектирующим антителом мыши против IgG4 человека (Abcam) или детектирующим антителом осли против IgG мыши (Jackson Immuno Research) в ФБР/1% БСА. После данной процедуры мечения клетки промывали два раза, ресуспендировали в ФБР/1% БСА и анализировали с помощью проточной цитометрии на FACSCanto II (BD Biosciences). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения Flow Jo версии 10 (FlowJo, LLC).

Пример 10. Блокирование связывания hCD47 с hSIRP α гуманизированными антителами hSIRP α .50A.

Блокирование hCD47 оценивали с помощью проточной цитометрии полной панели гуманизированных антител hSIRP α .50A. Для этой цели клетки HEK293 (ATCC CRL-1573) временно трансфицировали, применяя липофектамин 2000 (Invitrogen), вектором pCI-нео, кодирующим полноразмерную открытую рамку считывания SIRP α V1 человека. Трансфицированные клетки культивировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% в среде (DMEM-F12 (Gibco) с 10% фетальной бычьей сывороткой (Gibco) и пеницилли-

ном/стрептомицином (Gibco)) до достижения конфлюэнтности. Затем клетки отделяли, высевали в 96-луночные культуральные планшеты с закругленным дном и инкубировали в течение 30 мин с вариантами гуманизированного антитела hSIRP α .50A (100 мкг/мл и ее разведения) в ФБР/1% БСА при 4°C. Затем клетки промывали три раза ФБР/1% БСА и инкубировали с рекомбинантным белком hCD47/Fc (ModiQuest; SEQ ID NO: 42) в течение 30 мин при 4°C. Впоследствии клетки промывали три раза ФБР/1% БСА и инкубировали в течение 30 мин при 4°C с детектирующим антителом мыши против шарнира IgG1 человека, конъюгированным с FITC (Southern Biotech). После данной процедуры меченая клетки промывали два раза, ресуспендировали в ФБР/1% БСА и анализировали с помощью проточной цитометрии на FACSCanto II (BD Biosciences). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo версии 10 (FlowJo, LLC) и наносили на график, применяя GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc) (фиг. 8).

Как показано на фиг. 8, отслеживали связывание рекомбинантного hCD47, гибризованного с доменом Fc IgG1 человека, в присутствии возрастающих количеств вариантов гуманизированного антитела hSIRP α .50A. Все варианты антитела блокировали взаимодействие hSIRP α /hCD47.

Пример 11. Связывающий домен hSIRP α .50A.

Для того чтобы определить область связывания hSIRP α .50A было разработано несколько мутантов обмена SIRP α на основе последовательностей аминокислот SIRP α V1 и hSIRP β 1 человека. В зависимости от укладки SIRP α внеклеточную область можно подразделить на три отдельных домена: Ig-подобный (иммуноглобулин-подобный) домен V-типа (IgV), Ig-подобный домен C1-типа (IgC1) и Ig-подобный домен C2-типа (IgC2). Домен IgV также известен как связывающий лиганд N-концевой домен SIRP α (который связывается с CD47). Мутанты SIRP α V1/ β 1 человека были разработаны на основе полноразмерной последовательности hSIRP α V1 (SEQ ID NO: 33), и каждый отдельный Ig-подобный домен был заменен на эквивалентный домен из SIRP β 1 человека (SEQ ID NO: 37). КДНК, кодирующие указанные конструкции: hSIRP α -V β C1 α C2 α (SEQ ID NO: 55), hSIRP α -V α C1 β C2 α (SEQ ID NO: 57) и hSIRP α -V α C1 α C2 β (SEQ ID NO: 59), - синтезировали (GeneArt) и субклонировали в вектор pCI-neo. Связывание hSIRP α .50A с мутантами обмена исследовали, применяя CELISA. Для этой цели клетки CHO-K1 временно трансфицировали, применяя липофектамин 2000, векторами pCI-neo, кодирующими hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP β 1, hSIRP α -V β C1 α C2 α , hSIRP α -V α C1 β C2 α и hSIRP α -V α C1 α C2 β , соответственно. Трансфицированные клетки культивировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% в среде (DMEM-F12 (Gibco) с 5% сывороткой новорожденных телят (BioWest) и пенициллином/стрептомицином (Gibco)) до достижения конфлюэнтности. Затем клетки трипсинизировали и высевали в 96-луночные культуральные планшеты с плоским дном и культивировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% в культуральной среде до достижения конфлюэнтности. Затем культуральную среду удаляли и клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с антителом hSIRP α .50A и клоном SE5A5 антитела против hSIRP α . Затем клетки промывали ФБР-Т и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с конъюгатом антитела козы против IgG мыши с HRP (Southern Biotech). После этого клетки промывали три раза ФБР-Т и визуализировали иммунореакционную способность антитела против hSIRP α с помощью стабилизированного хромогена ТМБ (Invitrogen). Реакции останавливали добавлением 0,5 М H₂SO₄ и считывали поглощение на 450 и 610 нм.

Продемонстрировали утрату связывания антитела согласно настоящему изобретению с мутантом hSIRP α -V β C1 α C2 α , что свидетельствует о связывании hSIRP α .50A с доменом IgV hSIRP α (фиг. 9, табл. 14). Значения EC₅₀ представляют собой концентрацию, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания (среднее значение и стандартное отклонение рассчитывали по значениям, полученным в двух независимых экспериментах).

Таблица 14

		Антитело	
		hSIRP α .50A	Антитело против hSIRP α (клон SE5A5)
hSIRP α V1	EC50 (нМ)	0,321	0,117
	CO	0,018	0,001
hSIRP α V2	EC50 (нМ)	0,215	0,084
	CO	0,012	0,012
hSIRP β 1	EC50 (нМ)	н/о	0,180
	CO	н/о	0,025
hSIRP α -V β C1 α C2 α	EC50 (нМ)	н/о	0,121
	CO	н/о	0,003
hSIRP α -V α C1 β C2 α	EC50 (нМ)	0,345	0,135
	CO	0,008	0,013
hSIRP α -V α C1 α C2 β	EC50 (нМ)	0,408	0,127
	CO	0,039	0,028

Для того чтобы точно определить аминокислоты, участвующие во взаимодействии hSIRP α .50A с доменом IgV, получили несколько точечных мутантов hSIRP α V1 на основании различий в отдельных аминокислотах между hSIRP α V1/V2 и hSIRP β 1. На фиг. 10A показано выравнивание домена IgV hSIRP α и hSIRP β 1. Аминокислоты в домене IgV hSIRP α , которые изменены в hSIRP β 1, мутировали, применяя набор для сайт-направленного мутагенеза QuikChange II (Stratagene) и полноразмерную последовательность hSIRP α V1 (SEQ ID NO: 33) в качестве донора кДНК. Связывание hSIRP α .50A с точечными мутантами hSIRP α V1 исследовали, применяя CELISA. Для этой цели клетки CHO-K1 временно трансфицировали, применяя липофектамин 2000, кДНК, кодирующей полноразмерную открытую рамку считывания hSIRP α V1 и его мутантов и hSIRP β 1, субклонированную в вектор pCI-neo. Трансфицированные клетки высевали в культуральную среду (DMEM-F12 (Gibco), дополненную 5% сывороткой новорожденных телят (BioWest) и пенициллином/стрептомицином (Gibco)), в 96-луночные культуральные планшеты с плоским дном и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% в течение 24 ч. Затем культуральную среду удаляли и клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с очищенными антителами против hSIRP α (используемыми при концентрации 10 мкг/мл и ее разведениях). Затем клетки промывали ФБР-Т и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с антителом козы против IgG мыши-HRP (Southern Biotech). Затем клетки промывали три раза ФБР-Т и визуализировали иммунореакционную способность против hSIRP α V1, мутантов hSIRP α V1 и hSIRP β 1 с помощью стабилизированного хромогена ТМБ (Invitrogen). Реакции останавливали добавлением 0,5 М H₂SO₄ и считывали поглощение на 450 и 610 нм. Значения EC₅₀ - концентрацию, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания - рассчитывали, применяя GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc) (среднее значение и стандартное отклонение рассчитывали по значениям, полученным в двух независимых экспериментах). На фиг. 10B и в следующей табл. 15 показано, что пролин в положении 74 (P74) представляет собой важную аминокислоту для специфического связывания hSIRP α .50A с hSIRP α V1. Экспрессия hSIRP α V1(P74A) (SEQ ID NO: 61), в котором P74 заменен на аланин, на клетках CHO-K1 приводит к утрате связывания антитела hSIRP α .50A. Данный пролин отсутствует в последовательности домена IgV hSIRP β 1.

Таблица 15

Антитело	Связывание hSIRP α V1, EC50 (нМ)		Связывание hSIRP β 1, EC50 (нМ)		Связывание hSIRP α V1(P74A), EC50 (нМ)	
	Среднее	CO	Среднее	CO	Среднее	CO
hSIRP α .50A	0,535	0,152	н/о	н/о	н/о	н/о
Антитело против hSIRP α (клон SE5A5)	0,164	0,008	0,156	0,009	0,150	0,013

Пример 12. Определение характеристик антител hSIRP α .40A и hSIRP α .50A.

Специфичность связывания антител hSIRP α .40A и hSIRP α .50A с hSIRP α сравнивали в формате CELISA. Вкратце, клетки CHO-K1 временно трансфицировали кДНК hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP β 1, hSIRP β L и hSIRP γ . Затем оценивали связывание hSIRP α с помощью CELISA, применяя клетки CHO-

K1.hSIRP α V1, CHO-K1.hSIRP α V2, CHO-K1.hSIRP β 1, CHO-K1.hSIRP β L и CHO-K1.hSIRP γ . Детектирование связанного антитела осуществляли с помощью антитела козы против IgG мыши-HRP (Southern Biotech). На фиг. 11 и в следующей табл. 16 показано, что антитела hSIRP α .40A и hSIRP α .50A связываются с hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP β L и hSIRP γ , но не проявляют детектируемого связывания с hSIRP β 1. Значения EC₅₀ представляют собой концентрацию, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания (среднее значение и стандартное отклонение рассчитывали по значениям, полученным в двух независимых экспериментах).

Таблица 16

Антитело	Связывание hSIRP α V1, EC50 (нМ)		Связывание hSIRP α V2, EC50 (нМ)		Связывание hSIRP β 1, EC50 (нМ)		Связывание hSIRP γ , EC50 (нМ)		Связывание hSIRP β L, EC50 (нМ)	
	Среднее	CO	Среднее	CO	Среднее	CO	Среднее	CO	Среднее	CO
	hSIRP α .40A	0,109	0,036	0,088	0,002	н/о	н/о	0,099	0,055	0,141
hSIRP α .50A	1,428	0,371	1,156	0,127	н/о	н/о	1,990	0,827	0,632	0,277

н/о - не обнаружено.

Кроме того, дополнительно исследовали специфичность hSIRP α .40A ко всем известным аллелям hSIRP α (аллельным вариантам, описанным у Takenaka и др., Nat Immunol. 8:1313-1323 (2007)) с помощью CELISA, используя такую же стратегию, как описанная выше. Для этой цели связывание hSIRP α .40A оценивали, применяя клетки CHO-K1, которые были временно трансфицированы кДНК, кодирующими полноразмерные hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP α V3 (NA07056_V3) (SEQ ID NO: 44), hSIRP α V4 (NA11832_V4) (SEQ ID NO: 46), hSIRP α V5 (NA18502_V5) (SEQ ID NO: 48), hSIRP α V6 (NA18507_V6) (SEQ ID NO: 50), hSIRP α V8 (NA18570_V8) (SEQ ID NO: 52), и hSIRP α V9 (NA18943_V9) (SEQ ID NO: 54). На фиг. 12 и в следующей табл. 17 продемонстрировали реакционную способность клона антитела hSIRP α .40A по отношению к каждому из данных аллелей hSIRP α . Значения EC₅₀ представляют собой концентрацию, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания (среднее значение и стандартное отклонение рассчитывали по значениям, полученным в двух независимых экспериментах).

Таблица 17

		Антителу	
		hSIRP α .40A	hSIRP α .50A
hSIRP α V1	EC50 (нМ)	0,134	1,690
hSIRP α V2	EC50 (нМ)	0,089	1,066
hSIRP α V3	EC50 (нМ)	0,107	1,767
hSIRP α V4	EC50 (нМ)	0,100	1,297
hSIRP α V5	EC50 (нМ)	0,115	1,260
hSIRP α V6	EC50 (нМ)	0,136	2,219
hSIRP α V8	EC50 (нМ)	0,089	1,508
hSIRP α V9	EC50 (нМ)	0,115	1,367

Пример 13. Способность hSIRP α .40A блокировать hCD47.

С помощью проточной цитометрии анализировали способность антитела hSIRP α .40A блокировать связывание рекомбинантного белка hCD47/Fc (R&D Systems, номер в каталоге 4670-CD-050; SEQ ID NO: 109) с экспрессированным на поверхности клетки hSIRP α . Для данной цели, линии клеток моноцитов THP-1 (ATCC TIB-202) и U-937 (ATCC CRL-1593.2) использовали в качестве источника hSIRP α в данном анализе. Клетки THP-1 и U-937 высевали в 96-луночные культуральные планшеты с закругленным дном и инкубировали в течение 45 мин с блокирующим FcR реагентом (Miltenyi Biotec) и антителом hSIRP α .40A (100 мкг/мл и ее разведения) в ФБР/1% БСА при 4°C. Затем клетки промывали три раза ФБР/1% БСА и инкубировали с меченым DyLight 488 рекомбинантным белком hCD47/Fc в течение 30 мин при 4°C. После данной процедуры мечения клетки промывали два раза, ресуспендировали в ФБР/1% БСА, содержащем 0,1 мкг/мл DAPI (BioLegend), и анализировали с помощью проточной цитометрии на FACSCanto II (BD Biosciences). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo версии 10 (FlowJo, LLC).

На фиг. 13 и в следующей табл. 18 представлено, что связывание рекомбинантного hCD47, гибридного с доменом Fc IgG1 человека, отслеживали в присутствии возрастающих количеств антитела

hSIRP α .40A. Антитело hSIRP α .40A блокировало взаимодействие hSIRP α /hCD47, что выявили, применяя способ на основе проточной цитометрии, описанный выше. Значения IC₅₀ для блокирования hCD47 рассчитывали по этим данным. Значения IC₅₀ представляют собой концентрацию, при которой наблюдается половина ингибирования.

Таблица 18

Антитело	ТНР-1	U-937
	IC50 (нМ)	IC50 (нМ)
hSIRP α .40A	0,646	1,344
hSIRP α .50A	7,833	19,501

Затем исследовали связывание hSIRP α .40A с hSIRP α , экспрессированным на первичных CD14⁺ моноцитах человека. Кроме того, оценивали способность hSIRP α .40A блокировать взаимодействие между hSIRP α и рекомбинантным белком hCD47/Fc. Для данной цели CD14⁺ моноциты выделяли из очищенных фиколлом мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК), применяя коктейль для обогащения моноцитами человека RosetteSep (Stemcell). Процент моноцитов, присутствующих после обогащения, определяли с помощью проточной цитометрии на FACSVerse (BD Biosciences), на основании окрашивания CD14, применяя детектирующее антитело мыши против CD14 человека, конъюгированное с APC-Cy7 (BD Biosciences). Затем обогащенные CD14⁺ МКПК высевали в 96-луночные культуральные планшеты с закругленным дном и инкубировали в течение 40 мин с блокирующим FcR реагентом (Miltenyi Biotec), содержащим антитело hSIRP α .40A (20 мкг/мл и ее разведения) в ФБР/1% БСА, при 4°C. Затем клетки промывали три раза ФБР/1% БСА и инкубировали с меченым Alexa Fluor 647 детектирующим антителом козы против IgG мыши (Invitrogen) в ФБР/1% БСА в течение 40 мин при 4°C. После данной процедуры мечения клетки промывали два раза, ресуспендировали в ФБР/1% БСА, содержащем 0,1 мкг/мл DAPI (BioLegend), и анализировали с помощью проточной цитометрии на FACSVerse (BD Biosciences). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo версии 10 (FlowJo, LLC).

На фиг. 14А и В показано, что hSIRP α .40A связывается с первичными обогащенными CD14⁺ моноцитами человека. Значения EC₅₀ представляют собой концентрацию, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания. Для того чтобы оценить блокирующую способность hSIRP α .40A, обогащенные CD14⁺ моноциты высевали в 96-луночные культуральные планшеты с закругленным дном и инкубировали в течение 45 мин с блокирующим FcR реагентом (Miltenyi Biotec) и антителом hSIRP α .40A (20 мкг/мл и ее разведения) в ФБР/1% БСА при 4°C. После этого клетки промывали три раза ФБР/1% БСА и инкубировали с 10 мкг/мл меченого DyLight 488 рекомбинантного белка hCD47/Fc в течение 45 мин при 4°C. После данной процедуры мечения клетки промывали два раза, ресуспендировали в ФБР/1% БСА, содержащем 0,1 мкг/мл DAPI (BioLegend), и анализировали с помощью проточной цитометрии на FACSVerse (BD Biosciences). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo версии 10 (FlowJo, LLC). На фиг. 14 С и D продемонстрирована способность антитела hSIRP α .40A блокировать взаимодействие hSIRP α /hCD47. Значения IC₅₀ для блокирования hCD47 рассчитывали по этим данным. Значения IC₅₀ представляют собой концентрацию, при которой наблюдается половина ингибирования.

Пример 14. Функциональность МАТ hSIRP α .40A в анализе фагоцитоза гранулоцитами человека.

Для того чтобы подтвердить функциональность hSIRP α .40A в первичных иммунных клетках, гранулоциты (например, эффекторные клетки) выделяли из крови с ЭДТА здоровых доноров человека. Сначала кровь с ЭДТА от каждого донора объединяли и центрифугировали при 300 g в течение 6 мин при 20°C. Затем удаляли плазму путем аспирации и оставшиеся клетки крови осторожно ресуспендировали. Клетки обрабатывали лизирующим эритроциты (RBC) буфером (155 mM NH₄Cl; 10 mM KHCO₃) и инкубировали в течение 10 мин на льду. Затем клетки центрифугировали при 300 g в течение 7 мин. Супернатанты, содержащие лизированные RBC, удаляли путем аспирации и оставшиеся клетки крови осторожно ресуспендировали в лизирующем RBC буфере и держали на льду в течение 1 мин. Лизис RBC останавливали путем добавления аналитической среды (IMDM (Gibco), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (Gibco) и пенициллином/стрептомицином (Gibco)). Клетки крови центрифугировали при 300 g в течение 6 минут и супернатанты удаляли путем аспирации, чтобы удалить как можно больше оставшихся RBC. Затем клетки крови с лизированными эритроцитами ресуспендировали в аналитической среде, содержащей 10 нг/мл IFN γ , и клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95%. Не прикрепившиеся клетки крови, содержащие гранулоциты человека, собирали путем легкой промывки культурального планшета аналитической средой (моноциты удаляли благодаря их прикреплению к пластиковой поверхности). Процент гранулоцитов, присутствующих в суспензии клеток, определяли с помощью проточной цитометрии на FACSCanto II (BD Biosciences) на основании высоких значений прямого рассеяния (FSC) и бокового рассеяния (SSC). Связывание hSIRP α .40A с гранулоцитами человека оценивали путем инкубации клеток в течение 30 мин при 4°C с антителом hSIRP α .40A (25 мкг/мл и ее разведения) в ФБР/1% БСА, содержащем 10% аутологичной сыворотки (ФБР/1% БСА/10% сыворотки).

Затем клетки промывали три раза ФБР/1% БСА/10% сыворотки и инкубировали в течение 30 мин при 4°C с меченым FITC детектирующим антителом козы против Ig мыши (BD Biosciences). После данной процедуры меченые клетки промывали два раза, ресуспендировали в ФБР/1% БСА/10% сыворотки и анализировали с помощью проточной цитометрии на FACSCanto II (BD Biosciences). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo версии 10 (FlowJo, LLC). На фиг. 15А и в следующей табл. 19 показано, что hSIRP α .40А связывается с первичными гранулоцитами человека. Значения EC₅₀ представляют собой концентрацию, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания.

Таблица 19

Антитело	Донор 1
	EC50 (нМ)
hSIRP α .40А	1,227
hSIRP α .50А	4,298

Затем клетки-мишени Ramos (ECACC 85030802) метили флуоресцентным красителем для оценки пролиферации клеток eFluor450 (eBioscience). Мечение проводили, следуя инструкциям производителя. Меченые клетки-мишени совместно культивировали в течение 2-3 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с выделенными первичными гранулоцитами человека в соотношении 1:1 (7,5×10⁴ клеток каждой мишени и эффектора на лунку 96-луночного культурального планшета с закругленным дном) в присутствии 0,1 мкг/мл ритуксимаба (антитела против hCD20). Кроме того, клетки совместно культивировали с 0,1 мкг/мл ритуксимаба в присутствии 10 мкг/мл hSIRP α .40А. Фагоцитоз анализировали путем определения процента гранулоцитов, положительных по eFluor450, применяя проточную цитометрию на FACSCanto II (BD Biosciences). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo версии 10 (FlowJo, LLC).

По сравнению с изотипическим контролем IgG1 мыши, hSIRP α .40А эффективно повышает фагоцитоз опухолевых клеток, вызванный ритуксимабом (фиг. 15В).

Пример 15. Функциональность МАТ hSIRP α .40А в анализе фагоцитоза макрофагами человека.

Блокирование CD47 антителом hSIRP α .40А повышает фагоцитоз опухолевых клеток лимфомы человека макрофагами человека. Макрофаги человека получали путем сначала обогащения CD14⁺ моноцитами очищенных фиколлом мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК), применяя коктейль для обогащения моноцитами человека RosetteSep (Stemcell). Моноциты высевали в 96-луночные микропланшеты с плоским дном CellCarrier (Perkin Elmer) и культивировали в среде для макрофагов (IMDM (Gibco), дополненной 8,5% фетальной бычьей сывороткой (Gibco) и пенициллином/стрептомицином (Gibco)), содержащей 50 нг/мл колониестимулирующего фактора моноцитов человека (M-CSF), в течение 7 дней при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95%, чтобы вызвать дифференцировку в макрофаги. Данные полученные из моноцитов макрофаги (MDM) прикрепляются к субстрату, позволяя смыть другие клетки. Клетки лимфомы человека Raji подсчитывали и метили красителем для оценки пролиферации клеток eFluor450 (eBioscience), следуя инструкциям производителя. После мечения клетки лимфомы смешивали с аналитической средой (RPMI (Gibco), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (Gibco) и пенициллином/стрептомицином (Gibco)), содержащей 100 мкг/мл антитела против hSIRP α и разведения указанной концентрации, соответствующее антитело изотипического контроля и 1 мкг/мл ритуксимаба (антитела против hCD20). Клетки лимфомы затем добавляли в отдельные лунки, содержащие MDM, при соотношении опухолевых клеток и фагоцитов 2,5:1, смешивали и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% в течение 2 ч. После инкубации лунки промывали ФБР, чтобы удалить большую часть нефагоцитированных опухолевых клеток, и клетки фиксировали в 2% формальдегиде в течение 10 мин при КТ. Лунки затем промывали и выдерживали в ФБР/3% БСА в темноте при 4°C в течение ночи. Клетки лимфомы, присутствующие в лунках, окрашивали конъюгированным с биотином клоном H1B19 антитела против CD19 человека (eBioscience) в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем доокрашивали конъюгированным с Alexa Fluor 488 стрептавидином (Thermo Fisher Scientific) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем окрашивали ядра DRAQ5 (Thermo Fisher Scientific) в течение 10 мин при комнатной температуре, смесь удаляли и добавляли ФБР в каждую лунку. Клетки анализировали с помощью автоматизированного флуоресцентного микроскопа Operetta (Perkin Elmer). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения Columbus версии 2.6.

На фиг. 16 показано, что hSIRP α .40А повышает опосредованную ритуксимабом фагоцитарную активность. Проводили количественный анализ фагоцитоза клеток лимфомы человека, используя индекс фагоцитоза, описанный далее: (количество опухолевых клеток внутри макрофагов/количество макрофагов)×100; подсчитывая по меньшей мере 200 макрофагов на образец.

Пример 16. Разработка гуманизированного антитела и прививка CDR.

Антитело мыши hSIRP α .40А гуманизировали, применяя методику прививки CDR (см., например, патент США № 5225539 и Williams, D.G. и др., 2010, Antibody Engineering, том 1, глава 21). Сначала идентифицировали зародышевые последовательности человека, применяя IgBLAST (Ye J. и др., Nucleic

Acids Res. 41:W34-40 (2013). Для человеческой зародышевой последовательности VH hSIRP α .40A был идентифицирован V-ген IGHV1-46*01 (идентичность 62,2%) и для человеческой зародышевой последовательности VL был идентифицирован IGKV1-39*01 (идентичность 68,4%). Данные две зародышевые последовательности использовали в качестве матрицы для прививки последовательностей CDR мыши, в результате чего получили следующие две конструкции кДНК: SEQ ID NO: 87 (VH) и SEQ ID NO: 99 (VL).

Затем создали базу данных, содержащую все человеческие последовательности, доступные в базе данных IMGT (Lefranc, M.-P. и др., Nucleic Acid Res. 27:209-212 (1999)), в которой было идентифицировано 85848 отдельных последовательностей. Данные последовательности запрашивали в TBLASTN (2.2.31+), чтобы идентифицировать шаблонные последовательности, которые демонстрируют наибольшую идентичность каркасам последовательностей VH и VL hSIRP α .40A. Было идентифицировано четыре последовательности VH и четыре последовательности VL, которые продемонстрировали показатель подобия 80% или выше и у которых были сходные длины CDR, предпочтительно идентичные таковым в CDR1, CDR2, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 VL hSIRP α .40, соответственно.

Для тяжелой цепи каркасы, кодируемые последовательностями под номерами доступа в GenBank (Benson, D.A. и др., Nucleic Acids Res. 41(DI):D36-42 (2013)) L39130, DJ031925, DJ326840 и EF177968, выбирали в качестве матриц для прививки последовательностей CDR VH hSIRP α .40A, в результате чего получали следующие конструкции кДНК: SEQ ID NO: 77, 79, 81 и 83, соответственно. Для легкой цепи каркасы, кодируемые последовательностями под номерами доступа в GenBank AY731031, DQ840993, AY942002 и DQ535171, выбирали в качестве матриц для прямой прививки последовательностей CDR VL hSIRP α .40A, в результате чего получали следующие конструкции кДНК: SEQ ID NO: 89, 91, 93 и 95. Кроме того, была создана база данных, содержащая все гуманизированные последовательности антител, доступные в общедоступном домене, в которой было идентифицировано 300 последовательностей. Данные последовательности запрашивали в BLASTP (2.2.31+), чтобы идентифицировать шаблонные последовательности, которые демонстрируют наибольшую идентичность каркасам последовательностей VH и VL hSIRP α .40A. Для тяжелой цепи каркас гемтузумаба выбрали в качестве матрицы для прививки последовательностей CDR VH hSIRP α .40A, в результате чего получили следующую конструкцию кДНК - SEQ ID NO: 85. Для легкой цепи каркас алацизумаба выбрали в качестве матрицы для прививки последовательностей CDR VL hSIRP α .40A, в результате чего получили следующую конструкцию кДНК - SEQ ID NO: 97.

Определения каркаса и CDR соответствуют описанным у Kabat и др. ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., и др., Департамент здравоохранения и социальных служб США, (1983)).

Для того чтобы исследовать влияние гуманизированных каркасных остатков на структуру Fv, создали гомологичную модель Fv hSIRP α .40A мыши, применяя "Antibody Modeling Cascade" (параметры по умолчанию) в составе Discovery Studio 4.5. Гомологичную модель строили на основе PDB ID 3UMT для легкой цепи, PDB ID 1EHL для тяжелой цепи и PDB ID 3BGF для Fv. Последовательности CDR прививали *in silico*, чтобы исследовать остатки, которые расположены близко к любому из CDR и которые могут влиять на конформацию петли, называемые остатками Верньера. Идентифицировали остатки, которые могут влиять на конформацию петли и которые находятся в пределах $< 5 \text{ \AA}$ от поверхности CDR, и заменили их на аминокислоту мыши в данном положении. В полученных в результате этого матрицах проверяли присутствие мотивов посттрансляционных модификаций (ПТМ), применяя Discovery Studio 4.5, и где это возможно (т.е. не остатки CDR, не остатки Верньера) заменяли их, чтобы предотвратить ПТМ. CDR2 VH содержал сайт гликозилирования, который удалили путем мутации аспарагина на серии.

Последовательности CDR прививали на каждую из идентифицированных матриц, экспрессированных в виде IgG2 (SEQ ID NO: 68), каппа (SEQ ID NO: 64) антитела, клонированного в вектор pcDNA3.1(+) (Thermo Fisher Scientific) для временной трансфекции клеток эмбриональной почки человека FreeStyle 293-F (HEK293T/17, ATCC CRL-11268).

Пример 17. Синтез, экспрессия и очистка химерных и гуманизированных конструкций.

Плазмиды, кодирующие гуманизированные конструкции тяжелых цепей и легких цепей, смешивали в соотношении 1:1 (всего 30 мкг) и временно экспрессировали путем трансфекции ими клеток FreeStyle 293-F, применяя реагент для трансфекции 293fectin (Invitrogen), следуя инструкциям производителя. Супернатанты (30 мл) собирали через 7 дней, фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и очищали антитела, применяя смолу с белком A MabSelect Sure, следуя инструкциям производителя (GE Healthcare). Буфер заменяли на буфер 10 мМ гистидин, 100 мМ NaCl, pH 5,5, применяя колонки для высаливания Zeba (Thermo Fisher Scientific). Концентрацию очищенных антител определяли на основании ОП на 280 нм (Nanodrop ND-1000). Уровень эндотоксина определяли с помощью ЛАЛ-теста, следуя инструкциям производителя (Lonza).

Пример 18. Связывание гуманизированных антител SIRP α .

Связывание исходного и гуманизированных антител против hSIRP α оценивали с помощью проточной цитометрии, применяя стабильную линию клеток CHO-K1.hSIRP α V1. Клетки CHO-K1.hSIRP α V1 высевали в 96-луночные культуральные планшеты с закругленным дном и инкубировали в течение 40

мин с указанными вариантами гуманизированного антитела hSIRP α .40A (20 мкг/мл и ее разведения) в ФБР/1% БСА при 4°C. Затем клетки промывали три раза ФБР/1% БСА и инкубировали в течение 40 мин при 4°C либо с меченым Alexa Fluor 647 детектирующим антителом козы против IgG мыши (Invitrogen), либо с меченым Alexa Fluor 647 детектирующим антителом ослика против IgG человека (Jackson Immuno Research) в ФБР/1% БСА. После данной процедуры меченые клетки промывали два раза, ресуспендировали в ФБР/1% БСА, содержащем 0,1 мкг/мл DAPI (BioLegend), и анализировали с помощью проточной цитометрии на FACSVerse (BD Biosciences). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo версии 10 (FlowJo, LLC). Значения EC₅₀ - концентрацию, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания - рассчитывали, применяя GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc) (фиг. 17 и табл. 20).

Таблица 20

Антитело	hSIRP α V1
	EC50 (нМ)
hSIRP α .40A	0,022
hSIRP α .40H1L1	н/о
hSIRP α .40H1L2	н/о
hSIRP α .40H1L3	н/о
hSIRP α .40H1L4	н/о
hSIRP α .40H1L5	н/о
hSIRP α .40H1L6	н/о
hSIRP α .40H2L1	0,264
hSIRP α .40H2L2	0,298
hSIRP α .40H2L3	0,300
hSIRP α .40H2L4	0,315
hSIRP α .40H2L5	0,284
hSIRP α .40H2L6	0,251
hSIRP α .40H3L1	1,644
hSIRP α .40H3L2	1,404
hSIRP α .40H3L3	1,501
hSIRP α .40H3L4	0,693
hSIRP α .40H3L5	2,302
hSIRP α .40H3L6	0,833
hSIRP α .40H4L1	3,308
hSIRP α .40H4L2	3,360
hSIRP α .40H4L3	3,072
hSIRP α .40H4L4	3,471
hSIRP α .40H4L5	4,828
hSIRP α .40H4L6	3,028
hSIRP α .40H5L1	2,011
hSIRP α .40H5L2	1,919
hSIRP α .40H5L3	2,268
hSIRP α .40H5L4	0,869
hSIRP α .40H5L5	2,954
hSIRP α .40H5L6	2,197
hSIRP α .40H6L1	2,349
hSIRP α .40H6L2	3,002
hSIRP α .40H6L3	3,014
hSIRP α .40H6L4	1,279
hSIRP α .40H6L5	3,785
hSIRP α .40H6L6	2,677

н/о - не обнаружено.

Пример 19. Блокирование связывания hCD47 с hSIRP α гуманизированными антителами hSIRP α .40A.

Блокирование hCD47 оценивали с помощью проточной цитометрии для полной панели гуманизированных антител hSIRP α .40A. Для этой цели линию моноцитов U-937 (ATCC CRL-1593.2) использовали в качестве источника hSIRP α в данном анализе. Клетки U-937 высевали в 96-луночные культуральные планшеты с закругленным дном и инкубировали в течение 45 мин с блокирующим FcR реагентом (Miltenyi Biotec) и с исходным антителом или вариантами гуманизированного антитела hSIRP α .40A (20 мкг/мл и ее разведения) в ФБР/1% БСА при 4°C. Затем клетки промывали три раза ФБР/1% БСА и инкубировали с 10 мкг/мл меченого DyLight 488 рекомбинантного белка hCD47/Fc в течение 30 мин при 4°C. После данной процедуры мечения клетки промывали два раза, ресуспендировали в ФБР/1% БСА, содержащем 0,1 мкг/мл DAPI (BioLegend), и анализировали с помощью проточной цитометрии на FACSVerse (BD Biosciences). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo версии 10 (FlowJo, LLC) и наносили на график, применяя GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc).

На фиг. 18 и в следующей табл. 21 представлено, что связывание рекомбинантного hCD47, гибридного с доменом Fc IgG1 человека, отслеживали в присутствии возрастающих количеств вариантов гуманизированного антитела hSIRP α .40A. Гуманизированное hSIRP α .40A блокировало взаимодействие hSIRP α /hCD47, что выявили, применяя способ на основе проточной цитометрии, описанный выше. Значения IC₅₀ для блокирования hCD47 рассчитывали по этим данным. Значения IC₅₀ представляют собой концентрацию, при которой наблюдается половина ингибирования.

Таблица 21

Антитело	U-937
	IC50 (нМ)
hSIRP α .40A	1,122
hSIRP α .40H1L1	н/о
hSIRP α .40H1L2	н/о
hSIRP α .40H1L3	н/о
hSIRP α .40H1L4	н/о
hSIRP α .40H1L5	н/о
hSIRP α .40H1L6	н/о
hSIRP α .40H2L1	0,638
hSIRP α .40H2L2	0,773
hSIRP α .40H2L3	0,685
hSIRP α .40H2L4	0,718
hSIRP α .40H2L5	0,745
hSIRP α .40H2L6	0,901

hSIRP α .40H3L1	0,980*
hSIRP α .40H3L2	н/о
hSIRP α .40H3L3	2,625*
hSIRP α .40H3L4	1,784*
hSIRP α .40H3L5	2,435*
hSIRP α .40H3L6	97,762*
hSIRP α .40H4L1	10,002*
hSIRP α .40H4L2	7,579*
hSIRP α .40H4L3	75,422*
hSIRP α .40H4L4	3,153*
hSIRP α .40H4L5	5,171*
hSIRP α .40H4L6	3,512*
hSIRP α .40H5L1	34,977*
hSIRP α .40H5L2	н/о
hSIRP α .40H5L3	н/о
hSIRP α .40H5L4	10,772*
hSIRP α .40H5L5	н/о
hSIRP α .40H5L6	0,247*
hSIRP α .40H6L1	2,391*
hSIRP α .40H6L2	20,427*
hSIRP α .40H6L3	9,208*
hSIRP α .40H6L4	3,797*
hSIRP α .40H6L5	20,421*
hSIRP α .40H6L6	9,750*

Значения, отмеченные *, были экстраполированы; н/о - не обнаружено.

Пример 20. Связывающий домен hSIRP α .40A.

Для того чтобы определить область связывания hSIRP α .40A было разработано несколько мутантов обмена SIRP β 1 на основе последовательностей аминокислот SIRP β 1 и SIRP γ человека. В зависимости от укладки SIRP α / β 1/ γ внеклеточную область можно подразделить на три отдельных домена: Ig-подобный (иммуноглобулин-подобный) домен V-типа (IgV), Ig-подобный домен C1-типа (IgC1) и Ig-подобный домен C2-типа (IgC2). Домен IgV также известен как связывающий лиганд N-концевой домен SIRP α и SIRP γ (который связывается с CD47). Мутанты SIRP β 1/ γ человека были разработаны на основе полно-размерной последовательности hSIRP β 1 (SEQ ID NO: 38), и каждый отдельный Ig-подобный домен был заменен на эквивалентный домен из SIRP γ человека (SEQ ID NO: 40). КДНК, кодирующие указанные конструкции: hSIRP-V γ C1 β C2 β (SEQ ID NO: 110), hSIRP-V β C1 γ C2 β (SEQ ID NO: 112) и hSIRP-V β C1 β C2 γ (SEQ ID NO: 114), - синтезировали (GeneArt) и субклонировали в вектор pCI-neo. Связывание hSIRP α .40A с мутантами обмена исследовали, применяя CELISA. Для этой цели клетки CHO-K1 временно трансфицировали, применяя липофектамин 2000, векторами pCI-neo, кодирующими hSIRP α V1, hSIRP α V2, hSIRP β 1, hSIRP-V γ C1 β C2 β , hSIRP-V β C1 γ C2 β и hSIRP-V β C1 β C2 γ , соответственно. Трансфицированные клетки культивировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% в среде (DMEM-F12 (Gibco) с 5% сывороткой новорожденных телят (BioWest) и пенициллином/стрептомицином (Gibco)) до достижения конfluence. Затем клетки трипсинизировали и высевали в 96-луночные культуральные планшеты с плоским дном и культивировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% в культуральной среде до достижения конfluence. Затем культуральную среду удаляли и клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с антителом hSIRP α .40A, антителом hSIRP α .50A и клоном SE5A5 антитела против hSIRP α . Затем клетки промывали ФБР-Т и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с конъюгатом антитела козы против IgG мыши с HRP (Southern Biotech). После этого клетки промывали три раза ФБР-Т и визуализировали иммунореакционную способность антитела против hSIRP α с помощью стабилизированного хромогена ТМБ (Invitrogen). Реакции останавливали добавлением 0,5 М H₂SO₄ и считывали поглощение на 450 и 610 нм.

Продемонстрировали наличие связывания антитела согласно настоящему изобретению с мутантом hSIRP-V γ C1 β C2 β , что свидетельствует о связывании hSIRP α .40A с доменом IgV hSIRP α и hSIRP γ (фиг.

На фиг. 20 и в следующей табл. 23 показано, что пролин в положении 74 (P74) представляет собой важную аминокислоту для специфического связывания hSIRP α .40A с hSIRP α V1. Экспрессия hSIRP α V1(P74A) (SEQ ID NO: 61), в котором P74 заменен на аланин, на клетках CHO-K1 приводит к утрате связывания антитела hSIRP α .40A. Данный пролин не присутствует в последовательности домена IgV hSIRP β 1, и может играть роль в правильной конформации домена IgV.

Таблица 23

Антитело	Связывание hSIRP α V1, EC50 (нМ)		Связывание hSIRP β 1, EC50 (нМ)		Связывание hSIRP α V1(P74A), EC50 (нМ)	
	Среднее	CO	Среднее	CO	Среднее	CO
hSIRP α .40A	0,065	0,006	н/о	н/о	н/о	н/о
hSIRP α .50A	0,534	0,152	н/о	н/о	н/о	н/о
Антитело против hSIRP α (клон SE5A5)	0,163	0,008	0,156	0,009	0,149	0,013

н/о - не обнаружено.

Пример 21. Функциональность химерных вариантов MAT hSIRP α .40A в анализе фагоцитоза макрофагами человека.

Функциональность варибельных доменов hSIRP α .40A, привитых на различные константные домены Fc, оценивали с помощью анализа фагоцитоза *in vitro*, применяя макрофаги человека. Условия эксперимента для анализа фагоцитоза макрофагами человека были аналогичны таковым, объясненным выше в примере 15. Меченые клетки лимфомы Raji смешивали с аналитической средой, содержащей либо 10 мкг/мл, либо 1 мкг/мл вариантов химерного антитела hSIRP α .40A и 1 мкг/мл ритуксимаба, а затем добавляли к MDM при соотношении опухолевых клеток к фагоцитам 2,5:1. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% в течение 2 ч.

Анализ проводили с помощью автоматизированного флуоресцентного микроскопа Operetta (Perkin Elmer) и результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения Columbus версии 2.6. Проводили количественный анализ фагоцитоза клеток лимфомы человека, используя индекс фагоцитоза, описанный далее: (количество опухолевых клеток внутри макрофагов/количество макрофагов) × 100; подсчитывая по меньшей мере 200 макрофагов на образец.

На фиг. 21 показано, что химерное антитело дикого типа (ДТ) hSIRP α .40A.hIgG4 не повышает опосредованный ритуксимабом фагоцитоз, тогда как инертные варианты химерного антитела hSIRP α .40A.hIgG1 (SEQ ID NO: 119), содержащие мутации N297Q (SEQ ID NO: 126), L234A.L235A (LALA) (SEQ ID NO: 123) или L234A.L235A.P329G (LALAPG) (SEQ ID NO: 125), повышают опосредованную ритуксимабом фагоцитарную активность зависимым от концентрации образом. Аналогичным образом, hSIRP α .40A.hIgG2 и инертный вариант химерного антитела hSIRP α .40A.hIgG2, содержащий мутации V234A.G237A.P238S.H268A.V309L.A330S.P331S (Sigma) (SEQ ID NO: 122), повышает опосредованную ритуксимабом фагоцитарную активность зависимым от концентрации образом.

Пример 22. Функциональность вариантов гуманизированного MAT hSIRP α .40A в анализе фагоцитоза макрофагами человека.

Функциональность выбранного набора вариантов гуманизированного антитела hSIRP α .40A оценивали с помощью анализа фагоцитоза *in vitro*, применяя макрофаги человека. Условия эксперимента для анализа фагоцитоза макрофагами человека были аналогичны таковым, объясненным в примере 6.

На фиг. 22 показано, что варианты гуманизированного антитела hSIRP α .40A повышают опосредованную ритуксимабом фагоцитарную активность зависимым от концентрации образом, аналогично антителу KWAR23, привитому на Fc hIgG2.

Пример 23. Функциональность вариантов химерного MAT hSIRP α .50A в анализе фагоцитоза макрофагами человека.

Функциональность варибельных доменов hSIRP α .50A, привитых на различные константные домены Fc, оценивали с помощью анализа фагоцитоза *in vitro*, применяя макрофаги человека. На фиг. 23A показано, что химерное антитело hSIRP α .50A.hIgG4 незначительно повышает опосредованный ритуксимабом фагоцитоз, тогда как химерное антитело hSIRP α .50A.hIgG2 повышает опосредованную ритуксимабом фагоцитарную активность аналогично антителу hSIRP α .50A.mIgG1 мыши (SEQ ID NO: 120). На фиг. 23B продемонстрировано, что химерное антитело hSIRP α .50A.hIgG2 эффективно повышает фагоцитоз опухолевых клеток, вызванный ритуксимабом, зависимым от концентрации образом по сравнению с изотипическим контролем IgG2 человека. Аналогично, hSIRP α .50A.hIgG2 повышает опосредованный ритуксимабом фагоцитоз (антитело против hCD38, применяли при концентрации 0,05 мкг/мл) (фиг. 23C).

Кроме того, hSIRP α .50A.hIgG2 также повышало опосредованный ритуксимабом фагоцитоз в гранулоцитах человека. На фиг. 23D показано, что химерное антитело hSIRP α .50A.hIgG2 повышает фагоцитарную активность, вызванную ритуксимабом, до сходного уровня с таковым у антитела hSIRP α .50A.mIgG1 мыши. Аналогичным образом, на фиг. 24A показано, что химерные антитела hSIRP α .50A.hIgG1.N297Q, hSIRP α .50A.hIgG4.N297Q (SEQ ID NO: 127) или hSIRP α .50A.hIgG2 повышают опосредованную ритуксимабом фагоцитарную активность клетками MDM человека до сходного уровня с таковым у антитела hSIRP α .50A.mIgG1 мыши (ритуксимаб применяли при концентрации 1 мкг/мл). Аналогичные наблюдения были сделаны на фиг. 24B, где фагоцитоз был вызван даратумумабом (0,05 мкг/мл). На фиг. 25 показано, что химерные антитела hSIRP α .50A.hIgG1.N297Q и hSIRP α .50A.hIgG1.L234A.L235A.P329G также повышают опосредованную ритуксимабом фагоцитарную активность клетками MDM человека до сходного уровня с таковым у антитела hSIRP α .50A.hIgG2 (ритуксимаб применяли при концентрации 1 мкг/мл). Химерные варианты MAT hSIRP α .50A, содержащие Fc-область hIgG1 или hIgG4 дикого типа, не повышали фагоцитоз опухолевых клеток.

Пример 24. Сравнение антител KWAR23, клона 18D5, hSIRP α .50A и hSIRP α .40A.

Непосредственное сравнение специфичности моноклональных антител против hSIRP α : KWAR23, клона 18D5 (SEQ ID NO: 128; SEQ ID NO: 129) из WO2017/178653, hSIRP α .50A и hSIRP α .40A, - в отношении связывания с hSIRP α V1, hSIRP α V1(P74A), hSIRP α V2 и hSIRP β 1 оценивали с помощью CELISA. Реакционную способность подтверждали, применяя клетки CHO-K1 (ATCC CCL-61), экспрессирующие кДНК, кодирующую полноразмерную открытую рамку считывания hSIRP α V1, hSIRP α V1(P74A), hSIRP α V2 и hSIRP β 1, субклонированную в вектор pCI-neo (Promega, Мадисон, Висконсин). Клетки CHO-K1.hSIRP α V1, CHO-K1.hSIRP α V1(P74A), CHO-K1.hSIRP α V2 и CHO-K1.hSIRP β 1 высевали в культуральную среду (DMEM-F12 (Gibco), дополненную 5% сывороткой новорожденных телят (BioWest) и пенициллином/стрептомицином (Gibco)), в 96-луночные культуральные планшеты с плоским дном и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% в течение 24 ч. Затем культуральную среду удаляли и клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с очищенными антителами против hSIRP α (используемыми при концентрации 10 мкг/мл и ее разведениях). Затем клетки промывали ФБР-Т и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с антителом козы против IgG мыши-HRP (SouthernBiotech). Затем клетки промывали три раза ФБР-Т и визуализировали иммунореакционную способность против hSIRP α V1, hSIRP α V1(P74A), hSIRP α V2 и hSIRP β 1 с помощью стабилизированного хромогена ТМБ (Invitrogen). Реакции останавливали добавлением 0,5 М H₂SO₄ и считывали поглощение на 450 и 610 нм. Значения EC₅₀ -концентрацию, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания - рассчитывали, применяя GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc).

Связывание с hSIRP γ оценивали с помощью проточной цитометрии, применяя линию клеток Т-клеточного лейкоза Jurkat E6.1 (ECACC 88042803). Клетки Jurkat высевали в 96-луночные культуральные планшеты с закругленным дном и инкубировали в течение 40 мин с антителами против hSIRP α (20 мкг/мл и ее разведения) в ФБР/1% БСА при 4°C. Затем клетки промывали три раза ФБР/1% БСА и инкубировали в течение 40 мин при 4°C с меченым Alexa Fluor 647 детектирующим антителом козы против IgG мыши (Invitrogen) в ФБР/1% БСА. После данной процедуры мечения клетки промывали два раза, ресуспендировали в ФБР/1% БСА, содержащем 0,1 мкг/мл DAPI (BioLegend), и анализировали с помощью проточной цитометрии на FACSVerse (BD Biosciences). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo версии 10 (FlowJo, LLC). Значения EC₅₀ - концентрацию, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания - рассчитывали, применяя GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc).

В табл. 24 представлено, что антитело KWAR23 и клон 18D5 вступают в перекрестную реакцию по меньшей мере с hSIRP β 1 и вариантом P74A hSIRP α V1. Антитела hSIRP α .50A и hSIRP α .40A согласно настоящему изобретению не связываются ни с hSIRP β 1, ни с вариантом P74A hSIRP α V1 при исследуемых условиях. В этом отношении антитела hSIRP α .50A и hSIRP α .40A согласно настоящему изобретению сходным образом отличаются от клона антитела SIRP29 из WO2013/056352. На фиг. 7A и B WO2017/178653 сравнивается связывание клона SIRP29 и KWAR23 с SIRP β 1 (обозначен "sirp-b", № продукта ABIN3077231 в antibodies-online.com), и продемонстрировано, что каждый из клона SIRP29 и KWAR23 обладает наномолярной аффинностью по отношению к SIRP β 1.

Таблица 24

Антитело	Связывание hSIRP α V1, EC50 (нМ)	Связывание hSIRP α V1(P74A), EC50 (нМ)	Связывание hSIRP α V2, EC50 (нМ)	Связывание hSIRP β 1, EC50 (нМ)	Связывание hSIRP γ , EC50 (нМ)
hSIRP α .40A	0,114	н/о	0,093	н/о	0,369
hSIRP α .50A	0,773	н/о	0,645	н/о	-
KWAR23	0,070	0,049	0,049	0,033	0,003
18D5	0,134	0,055	н/о	0,055	н/о

н/о - не обнаружено; "-" - не исследовали.

Блокирование hCD47 антителами KWAR23, клоном 18D5 и hSIRP α .40A оценивали с помощью проточной цитометрии. Для данной цели линии клеток моноцитов THP-1 (ATCC TIB-202) и U-937 (ATCC CRL-1593.2) использовали в качестве источника hSIRP α в данном анализе. Клетки THP-1 и U-937 высевали в 96-луночные культуральные планшеты с закругленным дном и инкубировали в течение 45 мин с блокирующим FcR реагентом (Miltenyi Biotec) и указанными антителами против hSIRP α (20 мкг/мл и ее разведения) в ФБР/1% БСА при 4°C. Затем клетки промывали три раза ФБР/1% БСА и инкубировали с 10 мкг/мл меченого DyLight 488 рекомбинантного белка hCD47/Fc в течение 30 мин при 4°C. После данной процедуры мечения клетки промывали два раза, ресуспендировали в ФБР/1% БСА, содержащем 0,1 мкг/мл DAPI (BioLegend), и анализировали с помощью проточной цитометрии на FACSVerse (BD Biosciences). Результаты обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo версии 10 (FlowJo, LLC) и наносили на график, применяя GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc). Связывание рекомбинантного hCD47, гибридного с доменом Fc IgG1 человека, отслеживали в присутствии возрастающих количеств антител против hSIRP α . Значения IC₅₀ для блокирования hCD47 рассчитывали по этим данным. Значения IC₅₀ представляют собой концентрацию, при которой наблюдается половина ингибирования.

В табл. 18 и табл. 25 представлено, что антитела hSIRP α .40A, hSIRP α .50A и KWAR23 блокируют связывание rhCD47/Fc с обеими линиями клеток моноцитов THP-1 и U-937, которые экспрессируют аллель hSIRP α V2 и hSIRP α V1, соответственно. Клон антитела 18D5 блокирует связывание rhCD47/Fc с линией моноцитов U-937, но не блокирует связывание rhCD47/Fc с линией моноцитов THP-1, в соответствии с наблюдением, что 18D5 не связывается с hSIRP α V2 (табл. 24). В этом отношении, антитела hSIRP α .50A и hSIRP α .40A согласно настоящему изобретению сходным образом отличаются от клона антитела 18D5.

Таблица 25

Антитело	THP-1	U-937
	IC50 (нМ)	IC50 (нМ)
hSIRP α .40A	0,548	1,417
KWAR23	0,132	0,284
18D5	н/о	1,522

н/о - не обнаружено.

Пример 25. Картирование границы взаимодействия между hSIRP α -hSIRP α .40A и hSIRP α -hSIRP α .50A.

Аминокислоты на hSIRP α , с которыми связываются hSIRP α .40A или hSIRP α .50A, установили с помощью процедуры, которая включала перекрестное связывание дейтерированного химического вещества с последующим ферментативным расщеплением и детектированием с применением масс-спектрометрии. Сначала антитело hSIRP α .40A и антиген rhSIRP α -HIS (SinoBiological 11612-H08H-100, SEQ ID NO: 132) или антитело hSIRP α .50A и антиген rhSIRP α -HIS инкубировали, чтобы вызвать связывание, и проверяли целостность и уровень агрегации с помощью масс-спектрометра Ultraflex III MALDI TOF (Bruker), оборудованного модулем взаимодействия HM4 (CovalX). Для данных контрольных экспериментов получали серию разведений 10 мкл образцов антитела или антигена (разведение в 1 - 128 раз, начиная с 1 мг/мл). Из каждого образца 9 мкл подвергали перекрестному связыванию, применяя набор для анализа K200 MALDI MS, следуя инструкциям производителя (CovalX), и инкубировали в течение 180 мин, тогда как 1 мкл непосредственно использовали в масс-спектрометрическом анализе (МАЛДИ больших масс). В масс-спектрометрическом анализе показали, что у антитела и антигена были ожидаемые молекулярные массы: hSIRP α .40A=151,68 кДа (152,78 кДа с кросслинкером), hSIRP α .50A=151,80 кДа (153,17 кДа с кросслинкером) и rhSIRP α -HIS=46,05 кДа (48,67 кДа с кросслинкером). Для определения характеристик комплекса антиген-антитело получали смесь с избытком антигена (соотношение ан-

тиген:антитело для rhSIRP α -HIS:hSIRP α .40A 10,8 мкМ:8,5 мкМ и соотношение антиген:антитело для rhSIRP α -HIS:hSIRP α .50A 5,4 мкМ:2,13 мкМ). 9 мкл образца смеси антиген-антитело подвергали перекрестному связыванию, применяя набор для анализа K200 MALDI-MS, согласно инструкциям производителя, тогда как 1 мкл непосредственно использовали в масс-спектрометрическом анализе. Обнаруженные массы антитела и антигена (hSIRP α .40A: 151,18 кДа, rhSIRP α -HIS: 45,93 кДа, hSIRP α .50A: 151,69 кДа, rhSIRP α -HIS: 46,18 кДа) соответствовали определенным ранее молекулярным массам. Комплексы антиген-антитело, после перекрестного связывания, детектировали в виде двух нековалентных комплексов со стехиометрическими составами 1:1 (195,24 кДа) и 2:1 (240,48 кДа) для rhSIRP α -HIS:hSIRP α .40A и в виде одного нековалентного комплекса со стехиометрическим составом 1:1 (198,24 кДа) для rhSIRP α -HIS:hSIRP α .50A. Антитело и антиген связывались нековалентно; нековалентные агрегаты или неспецифические мультимеры не были обнаружены.

Затем проводили идентификацию rhSIRP α -HIS методом отпечатков пептидных масс. Образцы подвергали протеолизу ASP-N, трипсином, химо трипсином, эластазой и термолизином (Roche Diagnostic), следуя инструкциям производителя, а затем анализировали с помощью МС/МС на nLC-LTQ Orbitrap, применяя систему Ultimate 3000 (Dionex) в сочетании с масс-спектрометром LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific). Такая схема протеолиза приводила к покрытию 98% последовательности обнаруженными пептидами.

Для того чтобы определить взаимодействующие аминокислоты антитела hSIRP α .40A и hSIRP α .50A на антигене rhSIRP α -HIS с высоким разрешением, комплекс антиген-антитело (отношение rhSIRP α -HIS:hSIRP α .40A составляло 10,8 мкМ:8,5 мкМ, отношение rhSIRP α -HIS:hSIRP α .50A составляло 5,4 мкМ:2,13 мкМ) инкубировали с дейтерированными кросслинкерами d0/d12 (набор K200 MALDI) в течение 180 мин и подвергали мультиферментативному расщеплению ферментами ASP-N, трипсином, химо трипсином, эластазой и термолизином. После обогащения перекрестно-связанными пептидами образцы анализировали с помощью масс-спектрометрии с высоким разрешением (nLC-Orbitrap MS) и полученные результаты анализировали, применяя XQuest (Jin Lee, Mol. Biosyst. 4:816-823 (2008)) и Stavroх (Gotze и др., J. Am. Soc. Mass Spectrom. 23:76-87 (2012)). Аминокислоты hSIRP α .40A и hSIRP α .50A, взаимодействующие с rhSIRP α -HIS, картировали на SIRP α V1 человека (SEQ ID NO: 34). Перекрестно-связанные остатки hSIRP α .40A изображены жирным шрифтом в прямоугольниках и остатки hSIRP α .50A изображены жирным шрифтом и подчеркнуты:

```
MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPQWFRG
AGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCVKFRKGGSPDDVEFKSGAGTEL
SVRAKPSAPVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFSRDLTKWFKNGNELSDFQTNVDPVGVESVYSIHSTAK
VVLTRDVHSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPPTLEVTQQPVAENQVNVTCQVRKFPQRLQL
TWLENGNVSRTETASTVTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVSANP
KEQGSNTAAENTGSNERNIYVGVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNAREITQDT
NDITYADLNLPKGKKPAPQAAEPNNHTEYASIQTSPQASEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEY
ASVQVPRK
```

Расстояние между С-альфа атомами остатка P74 и обнаруженных перекрестно-связанных остатков измеряли в Discovery Studio, используя кристаллическую структуру SIRP α (PDB ID 4CMM). Перекрестно-связанные остатки, обнаруженные для hSIRP α .50A, находятся в пределах расстояния между С-альфа атомами, составляющего от 14,0 до 21,4 ангстрем, от остатка P74; перекрестно-связанные остатки, обнаруженные для hSIRP α .40A, находятся в пределах расстояния между С-альфа атомами, составляющего от 16,2 до 33,5 ангстрем, от остатка P74. Расстояние между С-альфа атомами попадают в ожидаемый диапазон площади поверхности эпителио-паратоп, равной 700 Å² (Rowley и др., Biotech. Ann. Rev. 10:151-188 (2004)).

Обнаруженные остатки и площадь поверхности явно отличаются от таковых для связывающего эпителио антитела против hSIRP α - KWAR23 (Ring и др., Proa Natl Acad. Sci. USA 114:E10578-E10585 (2017)).

Пример 26. Сравнение связывания антител против hSIRP α с hSIRP α V1, hSIRP α V1(P74A) и hSIRP β 1.

Специфичность связывания моноклональных антител против hSIRP α (например, включая антитела против hSIRP α , известные в данной области: KWAR23 (патент США CA2939293 A1), 18D5 (патент WO2017/178653 A2) и различные доступные для приобретения антитела против hSIRP α) с hSIRP α V1, hSIRP α V1(P74A) и hSIRP β 1 оценивали с помощью CELISA. Реакционную способность подтверждали, применяя клетки CHO-K1 (ATCC CCL-61), экспрессирующие кДНК, кодирующую полноразмерную открытую рамку считывания hSIRP α V1, hSIRP α V1(P74A) и hSIRP β 1, субклонированную в вектор pCI-neo (Promega, Мадисон, Висконсин). Клетки CHO-K1.hSIRP α V1, CHO-K1.hSIRP α V1(P74A) и CHO-K1.hSIRP β 1 высевали в культуральную среду (DMEM-F12 (Gibco), дополненную 5% сывороткой новорожденных телят (BioWest) и пенициллином/стрептомицином (Gibco)), в 96-луночные культуральные

планшеты с плоским дном и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% в течение 24 ч. Затем культуральную среду удаляли и клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с очищенными антителами против hSIRP α (используемыми при концентрации 10 мкг/мл и ее разведениях). Затем клетки промывали ФБП-Т и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% либо с антителом козы против IgG мыши-HRP (Southern Biotech), либо с антителом козы против IgG человека-HRP (Jackson Immuno Research), либо с антителом козы против IgG кролика-HRP (Southern Biotech). Затем клетки промывали три раза ФБП-Т и иммунореакционную способность против hSIRP α V1, hSIRP α V1(P74A) и hSIRP β 1 визуализировали с помощью стабилизированного хромогена ТМБ (Invitrogen). Реакции останавливали добавлением 0,5 М H₂SO₄ и считывали поглощение на 450 и 610 нм. Значения EC₅₀ -концентрацию, при которой наблюдается 50% полного сигнала связывания - рассчитывали, применяя GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc)

В табл. 26 представлено, что KWAR23, клон 18D5 и все доступные для приобретения моноклональные антитела против hSIRP α способны связываться с вариантом P74A hSIRP α V1, тогда как антитела hSIRP α .40A и hSIRP α .50A согласно настоящему изобретению не связываются с вариантом P74A hSIRP α V1 при исследованных условиях.

Таблица 26

Антитело	Связывание hSIRP α V1, EC50 (нМ)	Связывание hSIRP α V1(P74A), EC50 (нМ)	Связывание hSIRP β 1, EC50 (нМ)
hSIRP α .40A	0,053	н/о	н/о
hSIRP α .50A	0,307	н/о	н/о
KWAR23	0,135	0,077	0,065
18D5	0,128	0,073	0,064
Антитело против hSIRP α (клон SE5A5)	0,156	0,207	0,105
Антитело против hSIRP α (клон 7B3)	0,122	0,141	0,115
Антитело против hSIRP α (клон 1C6)	0,329	0,440	> 2,817
Антитело против hSIRP α (клон 27)	н/о	н/о	н/о
Антитело против hSIRP α (клон SE7C2)	> 7,010	> 6,139	н/о
Антитело против hSIRP α (клон P3C4)	0,179	0,197	0,160
Антитело против hSIRP α (клон 2A4A5)	н/о	н/о	> 6,456
Антитело против hSIRP α (клон 15-414)	н/о	н/о	н/о
Антитело против hSIRP α (клон 1H1)	н/о	н/о	н/о
Антитело против hSIRP α (клон C-7)	н/о	н/о	н/о
Антитело против hSIRP α (клон 03)	> 8,247	> 8,992	> 6,092
Антитело против hSIRP α (клон 5E10)	н/о	н/о	н/о

Антитело против hSIRPα (клон 602411)	0,047	0,076	0,051
Антитело против hSIRPα (клон EPR16264)	> 1,166	> 1,999	н/о
Антитело против hSIRPα (клон D6I3M)	> 6,413	> 121,509	н/о
Антитело против hSIRPα (клон 001)	> 0,868	> 1,192	н/о
Антитело против hSIRPα (клон REA144)	> 3,661	> 4,793	> 3,075

н/о - не обнаружено.

Пример 27. Последовательности, упоминаемые в настоящем описании.

Описание	SEQ ID NO:	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
CDR1 тяжелой цепи 50A	1	NYUIH
(последовательность аминокислот)		
CDR2 тяжелой цепи 50A (последовательность аминокислот)	2	WIYPGNVNTKYNEKFKA
CDR3 тяжелой цепи 50A (последовательность аминокислот)	3	PTIATDFDV
CDR1 легкой цепи 50A (последовательность аминокислот)	4	KASQGVGTAVG
CDR2 легкой цепи 50A (последовательность аминокислот)	5	WASTRHT
CDR3 легкой цепи 50A (последовательность аминокислот)	6	QQYSTYPFT

<p>Варибельная область тяжелой цепи гуманизированного антитела 50 (консенсусная последовательность)</p>	7	<p>EVQLX₁X₂SGX₃EX₄VKPGASVX₅X₆SCKASGFTFTNYYIHWVR QX₇PX₈QGLEWX₉GWYYPGNVNTKYNEKFKAX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃TA DKSTSTX₁₄YMX₁₅LSSLX₁₆SX₁₇DX₁₈AVVYCARPTIIATDFDVV GQGTX₁₉VTVSS</p> <p>где: X₁ = Q, V X₂ = Q, E X₃ = A, S X₄ = V, L X₅ = K, M X₆ = V, I X₇ = A, R X₈ = G, E X₉ = I, M X₁₀ = R, K X₁₁ = V, A X₁₂ = T, I X₁₃ = I, M X₁₄ = A, V X₁₅ = D, E, Q X₁₆ = R, T</p>
---	---	--

		<p>X₁₇ = E, D X₁₈ = T, M X₁₉ = T, L</p>
<p>Вариабельная область легкой цепи гуманизированного антитела 50 (консенсусная последовательность)</p>	8	<p>X₁X₂X₃X₄TQSPSX₅LSASVGDRTTITCKASQGVGTAVGWYQX₆ KPGKX₇PKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTX₈FTLX₉LX₁₀X₁₁ LQPEDX₁₂AX₁₃YYCQYSTYPFTFGGGTKX₁₄EIK</p> <p>где: X₁ = D, E X₂ = I, L X₃ = V, Q X₄ = L, M X₅ = F, S X₆ = Q, K X₇ = A, S, V X₈ = E, D X₉ = T, A X₁₀ = S, N X₁₁ = S, N, G X₁₂ = F, I, V X₁₃ = A, D, T X₁₄ = L, V</p>
<p>VH1 hSIRPα.50A (последовательность нуклеотидов)</p>	9	<p>GAAGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAGGTCGTGAAAC CTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTT CACCTTACCAACTACTACATCCACTGGGTGCGACAGGCC CCAGGCCAGGGACTGGAATGGATCGGCTGGATCTACCCCG GCAACGTGAACACCAAGTACAACGAGAAGTTCAAGGCC GCGTGACCATCACCGCCGACAAGTCTACCTCCACCGCCTA CATGGACCTGTCTCCCTGAGATCCGAGGACACCGCCGTG TACTACTGCGCCAGACCCACCATCATTGCCACCGACTTCG ACGTGTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGTCTCT</p>
<p>VH1 hSIRPα.50A (последовательность аминокислот)</p>	10	<p>EVQLQQSGAEVVKPGASVKVSKASGFTFTNYIHWVRQAP GQGLEWIGWIYPGNVNTKYNEKFKARVTITADKSTSTAYMD LSSLRSEDTAVYYCARPTIIATDFDVWGQGTITVTVSS</p>
<p>VH2 hSIRPα.50A (последовательность нуклеотидов)</p>	11	<p>GAAGTGCAGCTGGTGGAAATCCGGCTCCGAGCTCGTGAAGC CTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTT CACCTTACCAACTACTACATCCACTGGGTGCGACAGGCC CCAGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCTACCCCG GCAACGTGAACACCAAGTACAACGAGAAGTTCAAGGCCA AGGCCACCATCACCGCCGACAAGTCCACCTCCACCGCCTA CATGGAAGTGTCTCCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTG</p>

			TACTACTGTGCCCGCCTACCATCATTGCCACCGACTTCGA TGTGTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTCT
VH2	hSIRP α .50A	12	EVQLVESGSELVKPGASVKVSKASGFTFTNYYIHWRQAP GQGLEWMGWIYPGNVNTKYNEKFKAKATITADKSTSTAYM ELSSLRSEDТАVYYCARPTIIATDFDVWGQGLVTVSS
VH3	hSIRP α .50A	13	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTCGTGAAAC CTGGCGCCTCCGTGATGATCTCCTGCAAGGCCTCCGGCTTC ACCTTACCAACTACTACATCCACTGGGTGCGACAGCGGC CAGGCCAGGACTGGAATGGATCGCTGGATCTACCCCG CAACGTGAACACCAAGTACAACGAGAAGTTCAAGGCCG CGTGATCATGACCGCCGACAAGTCCACCTCCACCGTGTAC ATGCAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACACCGCCGTGT ACTACTGCGCCAGACCCACCATCATTGCCACCGACTTCGA CGTGTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTCT
VH3	hSIRP α .50A	14	EVQLVQSGAEVVKPGASVMISCKASGFTFTNYYIHWRQRP GQGLEWIGWIYPGNVNTKYNEKFKARVIMTADKSTSTVYM QLSSLTSEDТАVYYCARPTIIATDFDVWGQGLVTVSS
VH4	hSIRP α .50A	15	GAAGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAGCTCGTGAAC CTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCTCCGGCTT CACCTTACCAACTACTACATCCACTGGGTGCGACAGCGG CCAGGCCAGGACTGGAATGGATGGCTGGATCTACCCCG GCAACGTGAACACCAAGTACAACGAGAAGTTCAAGGCCA AGGCCACCATCACCGCCGACAAGTCCACCTCCACCGCCTA CATGGAAGTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACACCGCCGTG TACTACTGCGCCAGACCCACCATCATTGCCACCGACTTCG ACGTGTGGGGCCAGGGCACAAACCGTGACCGTGTCTCT
VH4	hSIRP α .50A	16	EVQLQQSGAELVKPGASVKVSKASGFTFTNYYIHWRQRP GQGLEWMGWIYPGNVNTKYNEKFKAKATITADKSTSTAYM ELSSLTSEDТАVYYCARPTIIATDFDVWGQGTTVTVSS
VH5	hSIRP α .50A	17	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTCGTGAAAC CTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCTCCGGCTT CACCTTACCAACTACTACATCCACTGGGTGCGACAGGCC CCCGAGCAGGACTGGAATGGATCGCTGGATCTACCCCG GCAACGTGAACACCAAGTACAACGAGAAGTTCAAGGCC GCGTGACCATGACCGCCGACAAGTCTACCTCCACCGCCTA CATGGAAGTGTCTCCCTGCGGAGCGACGACATGGCCGTG TACTACTGCGCCAGACCCACCATCATTGCCACCGACTTCG ACGTGTGGGGCCAGGGCACAAACCGTGACCGTGTCTCT
VH5	hSIRP α .50A	18	EVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGFTFTNYYIHWRQAP EQGLEWIGWIYPGNVNTKYNEKFKARVTMTADKSTSTAYM ELSSLRSDDMAVYYCARPTIIATDFDVWGQGTTVTVSS

VL1	hSIRP α .50A	19	GACATCGTGTGACCCAGTCCCCAGCTTCTGTCTGCCTC TGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCTCTCAG GGCGTGGGCACCGCTGTGGGATGGTATCAGCAGAAGCCTG GCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCTCTACCAG ACACACCGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCT GGCACCGAGTTTACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCCG AGGATTTGCGCCGCTACTACTGCCAGCAGTACTCCACCTA CCCCTTACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
VL1	hSIRP α .50A	20	DIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQGVGTAVGWYQQKPGK APKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFAA YYCQYSTYPFTFGGGTKLEIK
VL2	hSIRP α .50A	21	GACATCGTGTGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCTGCCTC TGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCTCTCAG GGCGTGGGCACCGCTGTGGGATGGTATCAGCAGAAGCCTG GCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCTCTACCAG ACACACCGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCT GGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAACCTGCAGCCCG AGGACTTCGCCGACTACTACTGCCAGCAGTACTCCACCTA CCCCTTACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
VL2	hSIRP α .50A	22	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQGVGTAVGWYQQKPG KAPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISNLQPEDFA DYCQYSTYPFTFGGGTKVEIK
VL3	hSIRP α .50A	23	GAGCTCGTGTGACCCAGTCCCCTCCAGCCTGTCTGCCTC CGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCTCTCAG GGCGTGGGCACCGCTGTGGGATGGTATCAGCAGAAGCCTG GCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCTCTACCAG ACACACCGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCT GGCACCGACTTTACCCTGGCCATCTCCAGCCTGCAGCCCG AGGATATCGCCGACTACTACTGCCAGCAGTACTCCACCTA CCCCTTACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
VL3	hSIRP α .50A	24	ELVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQGVGTAVGWYQQKPG KAPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLAISLQPEDIA DYCQYSTYPFTFGGGTKVEIK
VL4	hSIRP α .50A	25	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCTGCCTC TGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCTCTCAG GGCGTGGGCACCGCTGTGGGCTGGTATCAGAAAAAGCCCG GCAAGGTGCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCTCCACCAG ACACACCGGCGTGCCCGATAGATTCTCCGGCTCTGGCTCT GGCACCGACTTCACCCTGACCATCAACGGCTGCAGCCTG AGGACGTGGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACTCCACCTA CCCCTTACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG

VL4	hSIRP α .50A	26	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQGVGTAVGWYQKKPG KVPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFLLINGLQPEDV ATYYCQYSTYPFTFGGGTKLEIK
VL5	hSIRP α .50A	27	GACATCGTGTGACCCAGTCCCCAGCTTCTGTCTGCCTC TGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCTCTCAG GGCGTGGGCACCGCTGTGGGATGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGTCCCCAAGCTGTGATCTACTGGGCCTCCACCAG ACACACCGGCGTGCCTGATAGATTCTCCGGCTCTGGCTCT GGCACCGAGTTCACCCTGACCATCTCCAACCTGCAGCCCG AGGACTTCGCCGCTACTACTGCCAGCAGTACTCCACCTA CCCCTTACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGAAATCAAG
VL5	hSIRP α .50A	28	DIVLTQSPSFLSASVGDRTITCKASQGVGTAVGWYQKKPG SPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFAA YYCQYSTYPFTFGGGTKLEIK
VH	мышь hSIRP α .50A	29	CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGC CTGGGGCTTCAGTTAGGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTTC ACCTTACAAAATACTATATACTGGGTGAAGCAGAGGC CTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTGG AAATGTTAATACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGCCAAG GCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACA TGCAGCTCAGCAGCCTGGCCTCTGAGGACTCTGCGGTCTA TTTCTGTGCAAGACCTACGATAATAGCTACGGACTTCGAT GTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCTCA
VH	мышь hSIRP α .50A	30	QVQLQQSGPELVKPGASVRIACKASGFITFTNYYIHVWVQRPG QGLEWIGWIYPGNVNTKYNEKFKAKATLTADKSSITAYMQL SSLASEDSAVYFCARPTIATDFDVGAGTTVTVSS
VL	мышь hSIRP α .50A	31	GACATTGTCATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATC AGTAGGAGACAGGGTCAACATCACCTGCAAGGCCAGTCA GGGTGTGGGTACTGCTGTAGGCTGGTATCAACAGAAACCA GGCAATCTCCTAGACTACTGATTTACTGGGCATCCACCC GGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATC TGGGACAGATTTAGTCTCGCCATTAGCAATGTGCAGTCT GAAGACCTGGCAGATTATTTCTGTCAGCAATATAGCACCT ATCCGTTACGTTCCGAGGGGGACCAATCTAGAAATAAA A
VL	мышь hSIRP α .50A	32	DIVMTQSHKFMSTSVGDRTITCKASQGVGTAVGWYQKKP GQSPRLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFSLAISNVQSEDL ADYFCQYSTYPFTFGGGTNLEIK
SIRP α V1	человека	33	ATGGAGCCCGCCGCCCCGGCCCCGGCCCTCGGGCCCGC TGCTCTGCCTGCTGCTCGCCGCTCCTGCGCCTGGTCAGGA GTGGCGGGTGAGGAGGAGCTGCAGGTGATTCAGCCTGAC

		<p>AAGTCCGTGTTGGTTGCAGCTGGAGAGACAGCCACTCTGC GCTGCACTGCGACCTCTCTGATCCCTGTGGGGCCCATCCA GTGGTTCAGAGGAGCTGGACCAGGCCGGAATTAATCTAC AATCAAAAAGAAGGCCACTTCCCCGGGTAACAACGTGTT CAGACCTCACAAAGAGAAACAACATGGACTTTTCCATCCG CATCGGTAACATCACCCAGCAGATGCCGGCACCTACTAC TGTGTGAAGTTCGGAAAGGGAGCCCCGATGACGTGGAGT TTAAGTCTGGAGCAGGCACTGAGCTGTCTGTGCGCGCCAA ACCCTCTGCCCCGTGGTATCGGGCCCTGCGGCGAGGGCC ACACCTCAGCACACAGTGAGCTTACCTGCGAGTCCCACG GCTTCTCACCCAGAGACATCACCTGAAATGGTTCAAAAA TGGGAATGAGCTCTCAGACTTCCAGACCAACGTGGACCCC GTAGGAGAGAGCGTGTCTACAGCATCCACAGCACAGCCA AGGTGGTGCTGACCCGCGAGGACGTTCACTCTCAAGTCAT CTGCGAGGTGGCCACGTACCTTGCAGGGGGACCCCTCTT CGTGGGACTGCCAACTTGTCTGAGACCATCCGAGTTCAC CCACCTTGAGGTTACTCAACAGCCCGTGAGGGCAGAGAA CCAGGTGAATGTCACCTGCCAGGTGAGGAAGTCTACCCC CAGAGACTACAGCTGACCTGGTTGGAGAATGAAAACGTGT CCCGGACAGAAACGGCCTCAACCGTTACAGAGAACAAGG ATGGTACCTACAACCTGGATGAGCTGGCTCCTGGTGAATGT ATCTGCCACAGGGATGATGTGAAGCTCACCTGCCAGGTG GAGCATGACGGGCAGCCAGCGGTCAGCAAAAGCCATGAC CTGAAGTCTCAGCCCACCGAAGGAGCAGGGCTCAAATA CCGCCGCTGAGAACACTGGATCTAATGAACGGAACATCTA TATTGTGGTGGGTGTGGTGTGCACCTTGTGGTGGCCCTAC TGATGGCGGCCCTCTACCTCGTCCGAATCAGACAGAAGAA AGCCCAGGGCTCCACTTCTTCTACAAGGTTGCATGAGCCC GAGAAGAATGCCAGAGAAATAACACAGGACACAAATGAT ATCACATATGCAGACCTGAACCTGCCAAGGGGAAGAAG CCTGCTCCCAGGCTGCGGAGCCCAACAACACACGGAGT ATGCCAGCATTAGACCAGCCCGCAGCCCGCTCGGAGGA CACCTCACCTATGCTGACCTGGACATGGTCCACCTCAAC CGGACCCCCAAGCAGCCGGCCCCAAGCCTGAGCCGTCTT TCTCAGAGTACGCCAGCGTCCAGGTCCCGAGGAAG</p>
SIRP α V1 (последовательность аминокислот)	человека 34	<p>MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKS VLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKE GHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYVCVKFRK GSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSF TCESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHS TAKVVLTRDVDHSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVP</p>

		<p>PTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVS RTETASTVTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVE HDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTAAENTGSNERNIYIVV GVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNA REITQDTNDITYADLNLPKGKKPAPQAAEPNNHTEYASIQTSP QPASEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVPRK</p>
<p>SIRPαV2 (последовательность нуклеотидов)</p>	<p>человека 35</p>	<p>ATGGAACCTGCCGGACCTGCCCTGGCAGACTGGGACCTC TGCTGTGTCTGCTGCTGGCCGCCTTTGTGCTTGAGCGGA GTGGCTGGCGAAGAGGAACTGCAAGTGATCCAGCCGAC AAGAGCGTGTCCGTGGCTGCTGGCGAGTCTGCCATCTGC ACTGTACCGTGACCAGCCTGATCCCCGTGGGCCCATCCA GTGGTTTAGAGGCGCTGGCCCTGCCAGAGAGCTGATCTAC AACCAGAAAGAGGGCCACTTCCCAGAGTGACCACCGTGT CCGAGAGCACCAAGCGGAGAACATGGACTTCAGCATCA GCATCTCCAACATCACCCCTGCCGACGCCGGCACCTACTA CTGCGTGAAGTTCAGAAAGGGCAGCCCCGACACCGAGTTC AAGAGCGGCGCTGGAACCGAGCTGTCTGTGCGGGCTAAGC CTTCTGCCCTGTGGTGTCTGGACCTGCCGCCAGAGCTACA CCTCAGCACACCGTGTCTTTCACATGCGAGAGCCACGGCT TCAGCCCCAGAGACATCACCCCTGAAGTGGTTCAAGAACGG CAACGAGCTGAGCGACTTCCAGACCAACGTGGACCCTGTG GGCGAGTCCGTGCTACAGCATCCACAGCACCGCCAAGG TGGTGTGACCCGCGAGGATGTGCACAGCCAAGTGATCTG CGAGGTGGCCACGTGACACTGCAGGGCGATCCTCTGAGA GGCACCGCTAACCTGAGCGAGACAATCAGAGTGCCCCCA CCCTGGAAGTGACCCAGCAGCCGTGCGGGCTGAGAACCA AGTGAACGTGACCTGCCAAGTGCAGGAAGTTCTACCCTCAG AGACTGCAGCTGACCTGGCTGGAAAACGGAAACGTGTCCA GAACCGAGACAGCCAGCACCGTGACAGAGAACAAGGACG GCACATACTGATGAGCTGGCTGCTCGTGAACGTGTC CGCCACAGAGATGACGTGAAGCTGACATGCCAGGTGGA ACACGACGGCCAGCCTGCCGTGCTAAGAGCCACGACCTG AAGGTGTCCGCTACCCCAAAGAGCAGGGCAGCAACACC GCCGCTGAGAACACAGGCAGCAACGAGAGAAACATCTAC ATCGTGTGGGCGTGTGTGACCCTGCTGGTGGCTCTGCT GATGGCTGCCCTGTACCTCGTGCGGATCAGACAGAAGAAG GCCAGGGCTCCACCTCCAGCACCAAGACTGCACGAGCCTG AGAAGAACGCCCGGAGATCACCCAGGACACCAACGACA TCACCTACGCCGACCTGAACCTGCCAAGGGCAAGAAGCC TGCCCTCAGGCTGCCGAGCCTAACAACCACACAGAGTAC</p>

		GCCAGCATCCAGACCAGCCCTCAGCCTGCCAGCGAGGACA CACTGACATACGCCGATCTGGACATGGTGCACCTGAACAG AACCCCAAGCAGCCCGCTCCAAGCCCGAGCCTAGCTTC TCTGAGTACGCCTCCGTGCAGGTGCCCAGAAAA
SIRP α V2 (последовательность аминокислот)	человека 36	MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKS VSVAAGESAILHCTVTSVIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEG HFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGS PDTEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCE SHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAK VVLTRDVDHSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPPTLE VTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVSRTET ASTVTENKDGTYNWMSWLLVNVAHRDDVKLTCQVEHDG QPAVSKSHDLKVS AHPKEQSNTAAENTGSNERNIYIVGVV CTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNAREIT QDNDITYADLNLPKGGKPPAPQAAEPNNHTEYASIQTSPQPA SEDTLTYADLDMVHLNRPKQPAPKPEPSFSEYASVQVPRK
SIRP β 1 (последовательность нуклеотидов)	человека 37	ATGCCCGTGCCAGCCTCCTGGCCCCACCTTCCTAGTCCTTT CCTGCTGATGACGCTACTGCTGGGGAGACTCACAGGAGTG GCAGGTGAGGACGAGCTACAGGTGATTCAGCCTGAAAAG TCCGTATCAGTTGCAGCTGGAGAGTCGGCCACTCTGCGCT GTGCTATGACGTCCCTGATCCCTGTGGGGCCCATCATGTG GTTTAGAGGAGCTGGAGCAGGCCGGAATTAATCTACAAT CAGAAAGAAGGCCACTTCCCACGGGTAACAACCTGTTTCAG AACTCACAAGAGAAAACAACCTGGACTTTTCCATCAGCAT CAGTAACATCACCCAGCAGACGCCGGCACCTACTACTGT GTGAAGTTCCGAAAGGGAGCCCTGACGACGTGGAGTTTA AGTCTGGAGCAGGCACTGAGCTGTCTGTGCGCGCAAACC CTCTGCCCCCGTGGTATCGGGCCCTGCGGTGAGGGCCACA CCTGAGCACACAGTGAGCTTCACTGCGAGTCCCATGGCT TCTCTCCAGAGACATCACCTGAAATGGTTCAAAAATGG GAATGAGCTCTCAGACTTCCAGACCAACGTGGACCCCGCA GGAGACAGTGTCTCCTACAGCATCCACAGCACAGCCAGGG TGGTGTGACCCGTGGGGACGTTCACTCTCAAGTCATCTG CGAGATAGCCACATCACCTTGCAGGGGGACCTCTTCGT GGGACTGCCAACTTGTCTGAGGCCATCCGAGTTCACCCA CCTTGAGGTTACTCAACAGCCATGAGGGCAGAGAACCA GGCAAACGTCACCTGCCAGGTGAGCAATTTTACCCCCGG GACTACAGCTGACCTGGTTGGAGAATGGAAATGTGTCCC GGACAGAAACAGCTTCGACCCTCATAGAGAACAAGGATG GCACCTACAACCTGGATGAGCTGGCTCCTGGTGAACACCTG TGCCACAGGGACGATGTGGTGCTCACCTGTCAGGTGGAG

		CATGATGGGCAGCAAGCAGTCAGCAAAAGCTATGCCCTGG AGATCTCAGCGCACCAGAAGGAGCACGGCTCAGATATCAC CCATGAAGCAGCGCTGGCTCCTACTGCTCCACTCCTCGTA GCTCTCCTCTGGGCCCAAGCTGCTACTGGTGGTTGGTGT CTCTGCCATCTACATCTGCTGGAAACAGAAGGCC
SIRPβ1 (последовательность аминокислот)	человека 38	MPVPASWPHLPSPFLMLTLLGRLTGVAGEDELQVIQPEKSV SVAAGESATLRCAMTSLIPVGPIMWFRGAGAGRELIYNQKEG HFPRVTTVSELTKRNNLDFSISISNITPADAGTYCVKFRKGSP DDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVSGPAVRATPEHTVSFTCE SHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPAGDSVSYSIHSTA RVVLTRGDVHSQVICEIAHITLQGDPLRGTANLSEAIRVPPTL EVTQQPMRAENQANVTCQVSNFYPRGLQLTWLENGNVSR ETASTLIENKDGTYNWMSWLLVNTCAHRDDVVLTCQVEHD GQQAVSKSYALEISAHQKEHGS DITHEAALAPTAPLLVALLL GPKLLL VVGVS AIYICWKQKA
SIRPγ (последовательность нуклеотидов)	человека 39	ATGCCTGTCCCAGCCTCCTGGCCCCATCCTCCTGGTCCTTT CCTGCTTCTGACTCTACTGCTGGGACTTACAGAAGTGGCA GGTGAGGAGGAGCTACAGATGATTCAGCCTGAGAAGCTCC TGTTGGTCACAGTTGGAAAGACAGCCACTCTGCACTGCAC TGTGACCTCCCTGCTTCCCGTGGGACCCGTCCTGTGGTTCA GAGGAGTTGGACCAGGCCGGAATTAATCTACAATCAAAA AAGAAGGCCACTTCCCAGGGTAACAACAGTTTCAGACCT CACAAAGAGAAACAACATGGACTTTTCCATCCGCATCAGT AGCATCACCCAGCAGATGTCGGCACATACTACTGTGTGA AGTTTCGAAAAGGGAGCCCTGAGAACGTGGAGTTAAGTC TGGACCAGGCACTGAGATGGCTTTGGGTGCCAAACCCTCT GCCCCGTGGTATTGGGCCCTGCGGCGAGGACCACACCTG AGCATAAGTGTGAGTTTACCTGTGAGTCCCATGGCTTCTCT CCCAGAGACATCACCTGAAATGGTTCAAAAATGGGAATG AGCTCTCAGACTTCCAGACCAACGTGGACCCACAGGACA GAGTGTGGCCTACAGCATCCGCAGCACAGCCAGGGTGGTA CTGGACCCCTGGGACGTTTCGCTCTCAGGTCATCTGCGAGG TGGCCCATGTACCTTGCAGGGGACCCCTCTTCGTGGGAC TGCCAACTTGTCTGAGGCCATCCGAGTTCCACCCACCTTGG AGGTTACTCAACAGCCCATGAGGGTGGGGAACCAGGTAA ACGTCACCTGCCAGGTGAGGAAGTTCTACCCCAAGAGCCT ACAGCTGACCTGGTCGGAGAATGGAAACGTGTGCCAGAG AGAAACAGCCTCGACCCTTACAGAGAACAAGGATGGTAC CTACAACCTGGACAAGCTGGTTCTGGTGAACATATCTGAC CAAAGGGATGATGTGGTCCTCACCTGCCAGGTGAAGCATG ATGGGCAGCTGGCGGTGAGCAAAACGCCTTGCCTTAGAGGT

			CACAGTCCACCAGAAGGACCAGAGCTCAGATGCTACCCCT GGCCCGGCATCATCCCTTACTGCGCTGCTCCTCATAGCTGT CCTCCTGGGCCCCATCTACGTCCCCTGGAAGCAGAAGACC
SIRP γ (последовательность аминокислот)	человека	40	MPVPASWPHPPGFLLLTLGLTEVAGEEELQMIQEKL LTVGKTATLHCTVTSLLPVGTVLWFRGVGPGRELIYNQKEG HFPRVTTVSDLTKRNNMDFSISSITPADVGTYYCVKFRKGS PENVEFKSGPGTEMALGAKPSAPVVLGPAARTTPEHTVSFTC ESHGFSRPDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPTGQSVAYSIRSTA RVVLDPWVRSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSEAIRVPPT LEVTTQPMRVGNQVNVTCQVRKFYPSLQLTWSNGNVQC RETASTLTENKDGTYNWTWFLVNISDQRDDVVLTCQVKHD GQLAVSKRLALEVTVHQDKDQSSDATPGPASSLTALLLIAVLL GPIYVPWKQKT
CD47 (последовательность нуклеотидов)	человека	41	ATGTGGCCTCTGGTGGCCGCTCTGCTGCTGGGCTCTGCTTG TTGTGGATCCGCCAGCTGCTGTTCAACAAGACCAAGTCC GTGGAGTTCACCTTCTGCAACGATACCGTCGTGATCCCCTG CTTCGTGACCAACATGGAAGCCAGAACACCACCGAGGTG TACGTGAAGTGAAGTTCAGGGCCGGGACATCTACACCT TCGACGGCGCCCTGAACAAGTCCACCGTGCCACCGATTT CTCCAGCGCCAAGATCGAGGTGTCACAGCTGCTGAAGGGC GACGCCTCCCTGAAGATGGACAAGTCCGACGCCGTGTCCC ACACCGCAACTACACCTGTGAAGTGACCGAGCTGACCAG AGAGGGCGAGACAATCATCGAGCTGAAGTACCGGGTGGT GTCCTGGTTCAGCCCCAACGAGAACATCCTGATCGTGATC TTCCCATCTTCGCCATCCTGCTGTTCTGGGGCCAGTTCGG CATCAAGACCCTGAAGTACAGATCCGGCGGCATGGACGA AAAGACAATCGCCCTGCTGGTGGCTGGCCTCGTGATCACC GTGATTGTGATCGTGGGCGCTATCCTGTTCTGTCGCCGGCG AGTACAGCCTGAAGAATGCTACCGGCCTGGGCTGATTGT GACCTCCACCGAATCCTGATCCTGCTGCACTACTACGTGT TCTCCACCGCTATCGGCTGACCTCCTTCGTGATCGCCATT CTCGTATCCAAGTATCGCCTACATCCTGGCCGTCGTGG GCCTGTCCCTGTGTATCGCCGCTGCATCCCTATGCACGGC CCCCTGCTGATCTCCGCCTGTCTATTCTGGCCCTGGCTCA GCTGCTGGGACTGGTGTACATGAAGTTCGTGGCCTCCAAC CAGAAAACCATCCAGCCCCCTCGGAAGGCCGTGGAAGAA CCCCTGAACGCCTTCAAAGAATCCAAGGGCATGATGAACG ACGAA
CD47 (последовательность аминокислот)	человека	42	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCF VTNMEAQNTTEVYVKWFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSS AKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVELTREGE

		<p>THIELKYR VVSWFSPNENILIVIFPIFAILFWGQFGIKTLKYRS GGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGL IVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIALVIQVIAYILAVVGLSL CIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQP PRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE</p>
<p>SIRPαV3 (последовательность нуклеотидов)</p>	<p>человека 43</p>	<p>ATGGAACCTGCCGGCCCTGCTCCTGGTAGACTGGGACCTC TGCTGTGTCTGCTGCTGGCCGCCTTTGTGCTTGGAGCGGA GTGGCTGGCGAAGAGGAACTGCAAGTGATCCAGCCCGAC AAGTCCGTGTCTGTGGCCGCTGGCGAGTCTGCCATCTGCT GTGTACCGTGACCTCCCTGATCCCCGTGGGCCCCATCCAGT GGTTTAGAGGCGCTGGCCCTGCCAGAGAGCTGATCTACAA CCAGAAAGAGGGCCACTTCCCCAGAGTGACCACCGTGTC GAGTCCACCAAGCGGAGAACATGGACTTCTCCATCTCCA TCAGCAACATCACCCCTGCCGACGCCGGCACCTACTACTG CGTGAAGTTCCGGAAGGGCTCCCCGACACCGAGTTCAAG TCTGGCGCTGGCACCGAGCTGTCTGTGCGGGCTAAACCTT CTGCCCTGTGGTGTCTGGACCTGCCGCTAGAGCTACCCCT CAGCACACCGTGTCTTTACCTGCGAGTCCCACGGCTTCAG CCCTCGGGACATCACCCCTGAAGTGGTTCAAGAACGGCAAC GAGCTGAGCGACTTCCAGACCAACGTGGACCTGTGGGCG AGAGCGTGTCTACTCCATCCACTCCACCGCCAAGGTGGT GCTGACACGCGAGGACGTGCACTCCAAGTGATCTGCGAG GTGGCCACGTGACACTGCAGGGCGATCCTCTGAGAGGCA CCGCCAACCTGTCCGAGACAATCAGAGTGCCCCCACCCT GGAAGTGACCCAGCAGCCAGTGCGGGCCGAGAACCAAGT GAACGTGACCTGCCAAGTGCGGAAGTTCTACCCCCAGCGG CTGCAGCTGACCTGGCTGAAAACGGCAATGTGTCCCGGA CCGAGACAGCCAGCACCGTGACCGAGAACAAGGATGGCA CCTACAATTGGATGTCTTGGCTGCTCGTGAACGTGTCCGCC CACCGGGACGATGTGAAGCTGACATGCCAGGTGGAACAC GACGGCCAGCTGCCGTGTCCAAGAGCCACGATCTGAAGG TGTCCGCTCATCCAAAGAGCAGGGCTCCAACACCGCCGC TGAGAACACCGGCTTAACGAGCGGAACATCTACATCGTC GTGGGCGTCTGTGCACCCTGCTGGTGGCTCTGCTGATGG CTGCCCTGTACCTCGTGCGGATCCGGCAGAAGAAGGCCCA GGGCTCTACCTCCTCCACCAGACTGCACGAGCCCGAGAAG AACGCCAGAGAGATCACCCAGGACACCAACGACATCACCC TACGCCGACCTGAACCTGCCAAGGGCAAGAAGCCTGCC CTCAGGCTGCCGAGCCTAACAAACCACACCGAGTACGCCTC CATCCAGACCAGCCCTCAGCCTGCCTCTGAGGACACCCTG ACCTACGCTGATCTGGACATGGTGCACCTGAACCGGACCC</p>

		CCAAGCAGCCAGCTCCTAAGCCCGAGCCTAGCTTCTCTGA GTACGCCAGCGTGCAGGTGCCCCGAAA
SIRP α V3 (последовательность аминокислот)	человека 44	MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKS VSVAAGESAILLCTVTSVIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEG HFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYCVKFRKGS PDTEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVSGPAARATPQHTVSFTCE SHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAK VVLTRDVDHSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPPTLE VTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVSRTET ASTVTENKDGTYNWMSWLLVNVAHRDDVKLTCQVEHDG QPAVSKSHDLKVAHPKEQGSNTAAENTGSNERNIYIVVGVV CTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNAREIT QDNDITYADLNLPKGGKPPAQAAEPNNHTEYASIQTSPQPA SEDTLTYADLDMVHLNRTPKQAPKPEPSFSEYASVQVPRK
SIRP α V4 (последовательность нуклеотидов)	человека 45	ATGGAACCTGCCGGCCCTGCTCCTGGTAGACTGGGACCTC TGCTGTGTCTGCTGCTGGCCGCCTTTGTGCTTGAGCGGA GTGGCTGGCGAAGAGGGCCTGCAAGTGATCCAGCCCGAC AAGTCCGTGTCTGTGGCCGCTGGCGAGTCTGCCATCCTGC ACTGTACCGCCACCTCCCTGATCCCCGTGGGACCCATCCA GTGGTTTAGAGGCGCTGGCCCTGGCAGAGAGCTGATCTAC AACCAGAAAGAGGGCCACTTCCCAGAGTGACCACCGTGT CCGACCTGACCAAGCGGAACAACATGGACTTCTCCATCCG GATCGGCAACATCACCCCTGCCGATGCCGGCACCTACTAC TGCGTGAAGTTCGGAAGGGCTCCCCGACGACGTGGAGT TCAAATCCGGCGCTGGCACCGAGCTGTCTGTGCGGGCTAA ACCTTCTGCCCTGTGGTGTCTGGCCCTGCCGCTAGAGCTA CCCCTCAGCACACCGTGTCTTTTACCTGCGAGTCCCACGGC TTCAGCCCTCGGGACATCACCCCTGAAGTGTTCAAGAACG GCAACGAGCTGAGCGACTTCCAGACCAACGTGGACCCTGT GGCGGAGAGCGTGTCTACTCCATCCACTCCACCGCCAAG GTGGTGTGACACGCGAGGACGTGCACTCCCAAGTGATCT GCGAGGTGGCCACGTGACACTGCAGGGCGATCCTCTGAG AGGCACCGCCAACCTGTCCGAGACAATCAGAGTGCCCCC ACCCTGGAAGTGACCCAGCAGCCAGTGCGGGCCGAGAAC CAAGTGAACGTGACCTGCCAAGTGCGGAAGTTCTACCCCC AGCGGCTGCAGCTGACCTGGCTGAAAACGGCAATGTGTC CCGGACCGAGACAGCCTCCACCGTGACCGAGAACAAGGA TGGCACCTACAATTGGATGTCTTGGCTGCTCGTGAACGTGT CCGCCCACCGGACGATGTGAAGCTGACATGCCAGGTGGA ACACGACGGCCAGCCTGCCGTGTCCAAGTCCCACGATCTG AAGGTGTCCGCTCATCCCAAAGAGCAGGGCTCCAACACCG

		<p>CCGCTGAGAACACCGGCTCTAACGAGCGGAACATCTACAT CGTCGTGGGCGTCGTGTGCACCTGCTGGTGGCTCTGCTG ATGGCTGCCCTGTACCTCGTGGGATCCGGCAGAAGAAGG CCCAGGGCTCTACCTCCTCACCAGACTGCACGAGCCCGA GAAGAACGCCAGAGAGATCACCCAGGACACCAACGACAT CACCTACGCCGACCTGAACCTGCCAAGGGCAAGAAGCCT GCCCCCAGGCTGCCGAGCCTAACAAACCACACCGAGTACG CCTCCATCCAGACCAGCCCTCAGCCTGCCTCTGAGGACAC CCTGACCTACGCTGATCTGGACATGGTGCACCTGAACCGG ACCCCAAGCAGCCAGCTCCTAAGCCCGAGCCTAGCTTCT CTGAGTACGCCAGCGTGCAGGTGCCCCGAAA</p>
SIRP α V4 (последовательность аминокислот)	человека 46	<p>MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEGLQVIQPK SVSVAAGESAILHCTATSLIPVGPQWFRGAGPGRELIYNQKE GHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCVKFRK GSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSF TCESHGFSRPDITLWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHS TAKVVLTRREDVHSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVP PTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVS RTETASTVTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVE HDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTAAENTGSNERNIYIVV GVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNA REITQDNDITYADLNLPKGKKPAPQAEPNNHTEYASIQTSP QPASEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVP RK</p>
SIRP α V5 (последовательность нуклеотидов)	человека 47	<p>ATGGAACCTGCCGGCCCTGCTCCTGGTAGACTGGGACCTC TGCTGTGTCTGCTGCTGGCCGCCTTTGTGCTTGAGCGGA GTGGCTGGCGAAGAGGAAGTCAAGTATCCAGCCCGAC AAGTTTCGTGCTGGTGGCCGCTGGCGAGACAGCCACCCTGA GATGTACCGCCACCTCCCTGATCCCCGTGGGCCCTATCCA GTGGTTT AGAGGCGCTGGCCCTGGCAGAGAGCTGATCTAC AACCAGAAAGAGGGCACTTCCCCAGAGTGACCACCGTGT CCGACCTGACCAAGCGGAACAACATGGACTTCTCCATCCG GATCGGCAACATCACCCCTGCCGATGCCGGCACCTACTAC TGCGTGAAGTTCGGGAAGGGCTCCCCGACGACGTGGAGT TCAAATCCGGCGCTGGCACCGAGCTGTCTGTGCGGGCTAA ACCTTCTGCCCTGTGGTGTCTGGCCCTGCCGCTAGAGCTA CCCCTCAGCACACCGTGTCTTTTACCTGCGAGTCCCACGGC TTCAGCCCTCGGGACATCACCCCTGAAGTGTTCAAGAACG GCAACGAGCTGAGCGACTTCCAGACCAACGTGGACCCTGT GGGCGAGTCCGTGTCTACTCCATCCACTCCACCGCCAAG GTGGTGCTGACACGCGAGGACGTGCACTCCCAAGTGATCT</p>

		<p>GCGAGGTGGCCACGTGACACTGCAGGGCGATCCTCTGAG AGGCACCGCCAACCTGTCCGAGACAATCAGAGTGCCCCC ACCCTGGAAGTGACCCAGCAGCCAGTGCGGGCCGAGAAC CAAGTGAACGTGACCTGCCAAGTGCGGAAGTTCTACCCCC AGCGGCTGCAGCTGACCTGGCTGAAAAACGGCAATGTGTC CCGGACCGAGACTGCCTCCACCGTGACCGAGAACAAAGGAT GGCACCTACAATTGGATGTCTTGGCTGCTCGTGAACGTGT CCGCCCACCGGGACGATGTGAAGCTGACATGCCAGGTGGA ACACGACGGCCAGCCTGCCGTGTCCAAGTCCCACGATCTG AAGGTGTCCGCTCATCCAAAGAGCAGGGCTCCAACACCG CCGCTGAGAACACCGGCTTAACGAGCGGAACATCTACAT CGTCGTGGGCGTGTGTGCACCCTGCTGGTGGCTCTGCTG ATGGCTGCCCTGTACCTCGTGCGGATCCGGCAGAAGAAGG CCCAGGGCTCTACCTCCTCCACCAGACTGCACGAGCCCGA GAAGAACGCCAGAGAGATCACCCAGGACACCAACGACAT CACCTACGCCGACCTGAACCTGCCAAGGGCAAGAAGCCT GCCCCCTCAGGCTGCCGAGCCTAACCAACCACCCGAGTACG CCTCCATCCAGACCAGCCCTCAGCCTGCCTCTGAGGACAC CCTGACCTACGCTGATCTGGACATGGTGCACCTGAACCGG ACCCCCAAGCAGCCAGCTCCTAAGCCCGAGCCTAGCTTCT CTGAGTACGCCAGCGTGCAGGTGCCCCGGAAA</p>
SIRP α V5 (последовательность аминокислот)	человека 48	<p>MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKF VLVAAGETATLRCTATSLIPVGPQWFRGAGPGRELIYNQKE GHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSRIGNITPADAGTYCVKFRK GSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSF TCESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHS TAKVVLTRDVDHSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVP PTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVS RTETASTVTENKDGTYNWMSWLLVNNSAHRDDVKLTCQVE HDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTAAENTGSNERNIYIVV GVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNA REITQDNDITYADLNLPKGGKPPAQAAEPNNHTEYASIQTSP QPASEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVP RK</p>
SIRP α V6 (последовательность нуклеотидов)	человека 49	<p>ATGGAACCTGCCGGCCCTGCTCCTGGTAGACTGGGACCTC TGCTGTGTCTGCTGCTGGCCGCCTTTGTGCTTGGAGCGGA GTGGCTGGCGAAGAGGAACTGCAAGTGATCCAGCCCGAC AAGTCCGTGCTGGTGGCTGCTGGCGAGACTGCCACCCTGA GATGTACCGCCACCTCCCTGATCCCCGTGGGCCCTATCCA GTGGTTTAGAGGCGCTGGCCCTGGCAGAGAGCTGATCTAC AACCAGAAAGAGGGCCACTTCCCCAGAGTGACCACCGTGT</p>

		<p>CCGACCTGACCAAGCGGAACAACATGGACTTCCCATCCG GATCGGCAACATCACCCCTGCCGATGCCGGCACCTACTAC TGCGTGAAGTTCCGGAAGGGCTCCCCGACGACGTGGAGT TCAAATCCGGCGCTGGCACCGAGCTGTCTGTGCGGGCTAA ACCTTCTGCCCCTGTGGTGTCTGGCCCTGCCGCTAGAGCTA CCCCTCAGCACACCGTGTCTTTTACCTGCGAGTCCCACGGC TTCAGCCCTCGGGACATCACCCCTGAAGTGGTTCAAGAACG GCAACGAGCTGAGCGACTTCCAGACCAACGTGGACCCTGT GGGCGAGTCCGTGTCTACTCCATCCACTCCACGCCAAG GTGGTGTGACACGCGAGGACGTGCACTCCAAGTGATCT GCGAGGTGGCCACGTGACACTGCAGGGCGATCCTCTGAG AGGACCCGCCAACCTGTCCGAGACAATCAGAGTGCCCCC ACCCTGGAAGTGACCCAGCAGCCCGTGGGGCTGAGAACC AAGTGAACGTGACCTGCCAAGTGGGAAGTTCTACCCCA GCGGCTGCAGCTGACCTGGCTGAAAACGGCAATGTGTCC CGGACCGAGACAGCCTCCACCGTGACCGAGAACAAGGAT GGCACCTACAATTGGATGTCTGGCTGCTCGTGAACGTGT CCGCCACCGGACGATGTGAAGCTGACATGCCAGGTGGA ACACGACGGCCAGCTGCCGTGTCCAAGTCCCACGATCTG AAGGTGTCCGCTCATCCAAAAGAGCAGGGCTCCAACCCG CCGCTGAGAACACCGCTCTAACGAGCGGAACATCTACAT CGTCGTGGCGTCTGTGTGACCCCTGCTGGTGGCACTGTG ATGGCCGCTCTGTACCTCGTGCGGATCCGGCAGAAGAAG CCCAGGGCTCTACCTCCTCCACCAGACTGCACGAGCCCGA GAAGAACGCCAGAGAGATCACCCAGGACACCAACGACAT CACCTACGCCGACCTGAACCTGCCAAGGGCAAGAAGCCT GCCCCTCAGGCTGCCGAGCCTAACAACCACCCGAGTACG CCTCCATCCAGACCAGCCCTCAGCCTGCCTCTGAGGACAC CCTGACCTACGCTGATCTGGACATGGTGCACCTGAACCGG ACCCCAAGCAGCCAGCTCCTAAGCCCGAGCTAGCTTCT CTGAGTACGCCAGCGTGCAGGTGCCCCGAAA</p>
<p>SIRPαV6 (последовательность аминокислот)</p>	<p>человека 50</p>	<p>MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKS VLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKE GHFPRVTTVSDLTKRNNMDFPIRIGNITPADAGTYCVKFRK GSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSF TCESHGFSPRDITLWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHS TAKVVLTRREDVHSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVP PTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVS RTETASTVTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVE HDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTAAENTGSNERNIYIVV GVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNA</p>

		REITQDTNDITYADLNLPKGGKPPAPQAAEPNNHTEYASIQTS QPASEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVP RK
SIRP α V8 (последовательность нуклеотидов)	человека 51	ATGGAACCTGCCGGCCCTGCTCCTGGTAGACTGGGACCTC TGCTGTGTCTGCTGCTGGCCGCTCTTGTGCTTGGAGCGGA GTGGCTGGCGAAGAGGAACTGCAAGTGATCCAGCCCGAC AAGTCCGTGCTGGTGGCTGCTGGCGAGACTGCCACCCTGA GATGTACCGCCACCTCCCTGATCCCCGTGGGCCCTATCCA GTGGTTTAGAGGCGCTGGCCCTGCCAGAGAGCTGATCTAC AACCAGAAAGAGGGCACTTCCCCAGAGTGACCACCGTGT CCGAGTCCACCAAGCGGAGAACATGGACTTCTCCATCTC CATCAGCAACATCACCCCTGCCGACGCCGGCACCTACTAC TGCGTGAAGTCCGGAAGGGCTCCCCGACACCGAGTTCA AGTCTGGCGCTGGCACCGAGCTGTCTGTGCGGGCTAAACC TTCTGCCCTGTGGTGTCTGGACCTGCCGCTAGAGCTACCC CTCAGCACACCGTGTCTTTACCTGCGAGTCCCACGGCTTC AGCCCTCGGGACATCACCCCTGAAGTGGTTCAAGAACGGCA ACGAGCTGAGCGACTTCCAGACCAACGTGGACCCTGTGGG CGAGTCCGTGTCTACTCCATCCACTCCACCGCCAAGGTG GTGCTGACACGCGAGGACGTGCACTCCCAAGTGATCTGCG AGGTGGCCACGTGACACTGCAGGGCGATCCTCTGAGAGG CACCGCCAACCTGTCCGAGACAATCAGAGTGCCCCCACC CTGGAAGTGACCCAGCAGCCCGTGGGGCTGAGAACCAA GTGAACGTGACCTGCCAAGTGCGGAAGTTCTACCCCCAGC GGCTGCAGCTGACCTGGCTGAAAAACGGCAATGTGTCCCC GACCGAGACAGCCAGCACCGTGACCGAGAACAAGGATGG CACCTACAATTGGATGTCTGGCTGCTCGTGAACGTGTCC GCCCACCGGGACGATGTGAAGCTGACATGCCAGGTGGAA CACGACGGCCAGCCTGCCGTGTCCAAGAGCCACGATCTGA AGGTGTCCGCTCATCCAAAGAGCAGGGCTCCAACACCGC CGCTGAGAACACCGGCTCTAACGAGCGGAACATCTACATC GTCGTGGGCGTCTGTGACCCCTGCTGGTGGCACTGTGA TGGCCGCTCTGTACCTCGTGCGGATCCGGCAGAAGAAGGC CCAGGGCTTACCTCCTCCACCAGACTGCACGAGCCCGAG AAGAACGCCAGAGAGATCACCCAGGACACCAACGACATC ACCTACGCCGACCTGAACCTGCCAAGGGCAAGAAGCCTG CCCCCAGGCTGCCGAGCCTAACAACCACACCGAGTACGC CTCCATCCAGACCAGCCCTCAGCCTGCCTCTGAGGACACC CTGACCTACGCTGATCTGGACATGGTGACCTGAACCGGA CCCCAAGCAGCCAGCTCCTAAGCCCGAGCCTAGCTTCTC TGAGTACGCCAGCGTGCAGGTGCCCGGAAA

SIRP α V8 (последовательность аминокислот)	человека 52	MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKS VLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKE GHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYCVKFRKG SPDTEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVSGPAARATPQHTVSFTC ESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTA KVVLTRREDVHSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPPT LEVTTQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQLQLTWLENGVNSRT ETASTVTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHD GQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTA AENTGSNERNIYIVVGV VCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNAREI TQDTNDITYADLNLPK GKKPAPQAAEPNNHTEYASIQTSPQP ASEDTLTYADLDMVHLNRTPKQAPKPEPSFSEYASVQVPRK
SIRP α V9 (последовательность нуклеотидов)	человека 53	ATGGAACCTGCCGGCCCTGCTCCTGGTAGACTGGGACCTC TGCTGTGTCTGCTGCTGGCCGCTCTTGTGCTTGGAGCGGA GTGGCTGGCGAAGAGGAAGTCAAGTATCCAGCCCGAC AAGTCCGTGCTGGTGGCTGCTGGCGAGACTGCCACCCTGA GATGTACCGCCACCTCCCTGATCCCCGTGGGCCCTATCCA GTGGTTTAGAGGCGCTGGCCCTGGCAGAGAGCTGATCTAC AACCAGAAAGAGGGCACTTCCCCAGAGTGACCACCGTGT CCGACCTGACCAAGCGGAACAACATGGACTTCTCCATCCG GATCTCCAACATCACCCCTGCCGACGCCGGCACCTACTAC TGCGTGAAGTCCCGAAGGGCTCCCCGACGACGTGGAGT TCAAATCCGGCGCTGGCACCGAGCTGTCTGTGCGGGCTAA ACCTTCTGCCCTGTGGTGTCTGGCCCTGCCGCTAGAGCTA CCCCTCAGCACACCGTGTCTTTTACCTGCGAGTCCCACGGC TTCAGCCCTCGGGACATCACCCCTGAAGTGTTCAAGAACG GCAACGAGCTGAGCGACTTCCAGACCAACGTGGACCCTGT GGGCGAGTCCGTGTCTACTCCATCCACTCCACCGCCAAG GTGGTGCTGACACGCGAGGACGTGCACTCCAAGTGATCT GCGAGGTGGCCACGTGACACTGCAGGGCGATCCTCTGAG AGGACCGCCAACCTGTCCGAGACAATCAGAGTGCCCCC ACCCTGGAAGTGACCCAGCAGCCCGTGCGGGCTGAGAACC AAGTGAAACGTGACCTGCCAAGTGCGGAAGTTCTACCCCA GCGGCTGCAGCTGACCTGGCTGGAAAACGGCAATGTGTCC CGGACCGAGACAGCTCCACCGTGACCGAGAACAAGGAT GGCACCTACAATTGGATGTCTGGCTGCTCGTGAACGTGT CCGCCACCGGGACGATGTGAAGCTGACATGCCAGGTGGA ACACGACGGCCAGCTGCCGTGTCCAAGTCCCACGATCTG AAGGTGTCCGCTCATCCAAAGAGCAGGGCTCCAACACCG CCGCTGAGAACACCGGCTCTAACGAGCGGAACATCTACAT CGTCGTGGGCGTGTGTGCACCCTGCTGGTGGCACTGCTG

		ATGGCCGCTCTGTACCTCGTGCGGATCCGGCAGAAGAAGG CCCAGGGCTCTACCTCCTCCACCAGACTGCACGAGCCCGA GAAGAACGCCAGAGAGATCACCCAGGACACCAACGACAT CACCTACGCCGACCTGAACCTGCCAAGGGCAAGAAGCCT GCCCCCTCAGGCTGCCGAGCCTAACCAACCACCCGAGTACG CCTCCATCCAGACCAGCCCTCAGCCTGCCTCTGAGGACAC CCTGACCTACGCTGATCTGGACATGGTGCACCTGAACCGG ACCCCAAGCAGCCAGCTCCTAAGCCCGAGCCTAGCTTCT CTGAGTACGCCAGCGTGCAGGTGCCCCGAAA
SIRP α V9 (последовательность аминокислот)	человека 54	MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKS VLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKE GHFPRVTTVSDLTKRNNMDFISIRISNITPADAGTYCVKFRK GSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSF TCESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHS TAKVVL TREDVHSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVP PTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGVNS RTETASTVTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLTQCVE HDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTA AENTGSNERNIYIVV GVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNA REITQDNDITYADLNLPK GKKPAPQAAEPNNHTEYASIQTSP QPASEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQV RK
hSIRP α -V β C1 α C2 α (последовательность нуклеотидов)	55	ATGGAACCTGCCGGCCCTGCTCCTGGTAGACTGGGACCTC TGCTGTGTCTGTGCTGGCCGCCTTTGTGCTTGGAGCGGA GTGGCTGGCGAGGACGAGCTGCAAGTGATCCAGCCCGAG AAGTCCGTGTCTGTGGCCGCTGGCGAGTCTGCCACCCTGA GATGCGCTATGACCTCCCTGATCCCCGTGGGCCCATCAT GTGGTTTAGAGGGCTGGCGCTGGCAGAGAGCTGATCTAC AACCAGAAAGAGGGCCACTTCCCCAGAGTGACCACCGTGT CCGAGCTGACCAAGCGGAACAACCTGGACTTCTCCATCTC CATCAGCAACATCACCCCTGCCGACCCGGCACCTACTAC TGCGTGAAGTTCCGGAAGGGCTCCCCGACGACGTGGAGT TCAAATCCGGCGCTGGAACCGAGCTGTCCGTGCGGGCTAA ACCTTCTGCCCTGTGGTGTCTGGCCCTGCCGCTAGAGCTA CCCCTCAGCACACCGTGTCTTTACCTGCGAGTCCCACGGC TTCAGCCCTCGGGACATCACCTGAAGTGGTTCAAGAACG GCAACGAGCTGAGCGACTTCCAGACCAACGTGGACCCTGT GGCGAGAGCGTGTCTACTCCATCCACTCCACCGCCAAG GTGGTGCTGACACGCGAGGACGTGCACTCCAAGTGATCT GCGAGGTGGCCACGTGACACTGCAGGGCGATCCTCTGAG AGGACCGCCAACCTGTCCGAGACAATCAGAGTGCCCCC

		<p>ACCCTGGAAGTGACCCAGCAGCCTGTGCGGGCCGAGAACC AAGTGAACGTGACCTGCCAAGTGCGGAAGTTCTACCCCA GCGGCTGCAGCTGACCTGGCTGGAAAACGGCAATGTGTCC CGGACCGAGACAGCCAGCACCGTGACCGAGAACAAGGAT GGCACCTACAATTGGATGTCTGGCTGCTCGTGAACGTGT CCGCCCACCGGACGATGTGAAGCTGACATGCCAGGTGGA ACACGACGGCCAGCCTGCCGTGTCCAAGTCCCACGATCTG AAGGTGTCCGCTCATCCCAAAGAGCAGGGCTCCAACACCG CCGCTGAGAACACCGGCTCTAACGAGCGGAACATCTACAT CGTCGTGGGCGTGTGTGCACCTGCTGGTGGCTCTGCTG ATGGCTGCCCTGTACCTCGTGGGATCCGGCAGAAGAAGG CCCAGGGCTCTACCTCCTCCACCAGACTGCACGAGCCTGA GAAGAACGCCAGAGAGATCACCCAGGACACCAACGACAT CACCTACGCCGACCTGAACCTGCCAAGGGCAAGAAGCCT GCCCCTCAGGCCGCCGAGCCTAACAAACCACACCGAGTACG CCTCCATCCAGACCAGCCCTCAGCCTGCCTCTGAGGACAC CCTGACCTACGCTGATCTGGACATGGTGCACCTGAACCGG ACCCCAAGCAGCCAGCTCCTAAGCCCGAGCCTAGCTTCT CTGAGTACGCCAGCGTGCAGGTGCCCCGAAA</p>
hSIRP α -V β C1 α C2 α (последовательность аминокислот)	56	<p>MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEDELQVIQPEKS VSVAAGESATLRCAMTSLIPVGPIMWFRGAGAGRELIYNQKE GHFPRVTTVSELTKRNNLDFSISISNITPADAGTYCVKFRKG SPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFT CESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSHST AKVVLTRDVDHSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPP TLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPORLQLTWLENGNVSR TETASTVTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLTQVEH DGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTAAENTGSNERNIYIVVG VVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNAR EITQDTNDITYADLNLPK GKKPAPQAAEPNNHTEYASIQTSPQ PASEDTLTYADLDMVHLNRTPKQAPKPEPSFSEYASVQVPR K</p>
hSIRP α -V α C1 β C2 α (последовательность нуклеотидов)	57	<p>ATGGAACCTGCCGGCCCTGCTCCTGGTAGACTGGGACCTC TGCTGTGTCTGCTGCTGGCCGCCTTTGTGCTTGAGCGGA GTGGCTGGCGAAGAGGAACTGCAAGTGATCCAGCCCGAC AAGTCCGTGCTGGTGGCTGCTGGCGAGACTGCCACCCTGA GATGTACCGCCACCTCCCTGATCCCCGTGGGCCCTATCCA GTGGTTTAGAGGCGCTGGCCCTGGCAGAGAGCTGATCTAC AACCAGAAAGAGGGCCACTTCCCAGAGTGACCACCGTGT CCGACCTGACCAAGCGGAACAACATGGACTTCTCCATCCG GATCGGCAACATCACCCCTGCCGATGCCGGCACCTACTAC</p>

		<p>TGCGTGAAGTTCCGGAAGGGCTCCCCGACGACGTGGAGT TCAAATCCGGCGCTGGCACCGAGCTGTCTGTGCGGGCTAA ACCTTCTGCCCCGTGGTGTCTGGACCTGCCGTGCGAGCTA CCCCTGAGCACACCGTGTCTTTTACCTGCGAGTCCCACGGC TTCAGCCCTCGGGACATCACCTGAAGTGTTCAAGAACG GCAACGAGCTGAGCGACTTCCAGACCAACGTGGACCCAGC CGGCGACTCCGTGTCCTACTCCATCCACTTACC GCCAGA GTGGTGTGACCCAGAGGGCGACGTGCACTCCCAAGTGATCT GCGAGATCGCCCATATCACACTGCAGGGCGACCCCTGAG AGGCACCGCTAACCTGTCTGAGACAATCCGGGTGCCCCC ACCCTGGAAGTGACTCAGCAGCCAGTGCGGGCCGAGAAC CAAGTGAACGTGACCTGCCAAGTGCGGAAGTTTACCCCC AGCGGCTGCAGCTGACCTGGCTGAAAAACGGCAATGTGTC CCGGACCGAGACAGCCTCCACCGTGACCGAGAACAAGGA TGGCACCTACAATTGGATGTCTTGGCTGCTCGTGAACGTGT CCGCCACCGGGACGATGTGAAGCTGACATGCCAGGTGGA ACACGACGGCCAGCCTGCCGTGTTCAAGTCCCACGATCTG AAGGTGTCCGCTCATCCAAAGAGCAGGGCTCCAACACCG CCGCTGAGAACACCGGCTTAACGAGCGGAACATCTACAT CGTCGTGGGCGTCTGTGCACCCTGCTGGTGGCACTGCTG ATGGCCGCTCTGTACCTCGTGCGGATCCGGCAGAAGAAGG CCCAGGGCTCTACCTCCTCCACCAGACTGCACGAGCCCGA GAAGAACGCCAGAGAGATCACCCAGGACACCAACGACAT CACCTACGCCGACCTGAACCTGCCAAGGGCAAGAAGCCT GCCCCCTAGGCCGCCGAGCCTAACAACCACACCGAGTACG CCTCCATCCAGACCAGCCCTCAGCCTGCCTCTGAGGACAC CCTGACCTACGCTGATCTGGACATGGTGCACCTGAACCGG ACCCCCAAGCAGCCAGCTCCTAAGCCCGAGCCTAGCTTCT CTGAGTACGCCAGCGTGCAGGTGCCCCGAAA</p>
hSIRP α -V α C1 β C2 α (последовательность аминокислот)	58	<p>MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKS VLVAAGETATLRCTATSLIPVGPQWFRGAGPGRELIYNQKE GHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSRIGNITPADAGTYCYVKFRK GSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVSGPAVRATPEHTVSF TCESHGFSPRDITLWFKNGNELSDFQTNVDPAGDSVSYSIHS TARVVLTRGDVHSQVICEIAHITLQGDPLRG TANLSETIRVPP TLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVS TETASTVTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEH DGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTAAENTGSNERNIYIVVG VVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNAR EITQDTNDITYADLNLPKGKPPAPQAAEPNNHTEYASIQTSPO PASEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVPR</p>

		К
hSIRP α -V α C1 α C2 β (последовательность нуклеотидов)	59	ATGGAACCTGCCGGCCCTGCTCCTGGTAGACTGGGACCTC TGCTGTGTCTGCTGCTGGCCGCCTTTGTGCTTGGAGCGGA GTGGCTGGCGAAGAGGAACTGCAAGTGATCCAGCCCGAC AAGTCCGTGCTGGTGGCTGCTGGCGAGACTGCCACCCTGA GATGTACCGCCACCTCCCTGATCCCCGTGGGCCCTATCCA GTGGTTTAGAGGCGCTGGCCCTGGCAGAGAGCTGATCTAC AACCAGAAAGAGGGCCACTTCCCCAGAGTGACCACCGTGT CCGACCTGACCAAGCGGAACAACATGGACTTCTCCATCCG GATCGGCAACATCACCCCTGCCGATGCCGGCACCTACTAC TGCGTGAAGTCCGGAAGGGCTCCCCGACGACGTGGAGT TCAAATCCGGCGCTGGCACCGAGCTGTCTGTGCGGGCTAA ACCTTCTGCCCTGTGGTGTCTGGCCCTGCCGCTAGAGCTA CCCCTCAGCACACCGTGTCTTTACCTGCGAGTCCCACGGC TTCAGCCCTCGGGACATCACCCCTGAAGTGTTCAAGAACG GCAACGAGCTGAGCGACTTCCAGACCAACGTGGACCCTGT GGCGAGTCCGTGTCCTACTCCATCCACTCCACCGCCAAG GTGGTGTGACACGCGAGGACGTGCACTCCAAGTGATCT GCGAGGTGGCCACGTGACACTGCAGGGCGATCCTCTGAG AGGCACCGCCAACCTGTCCGAGACAATCAGAGTGCCCCC ACCCTGGAAGTGACCCAGCAGCCTATGAGAGCCGAGAAC CAGGCCAACGTGACCTGCCAGGTGTCCAATTCTACCCTC GGGGCTGCAGCTGACCTGGCTGAAAACGGCAATGTGTC CCGGACCGAGACAGCCTCCACCCTGATCGAGAACAAGGAT GGCACCTACAATTGGATGTCCTGGCTGCTCGTGAACACCT GTGCCACCGGACGATGTGGTGTGACCTGTCAGGTGGA ACACGATGGCCAGCAGGCCGTCCAAGTCTACGCTCTG GAAGTGTCCGCCACCCAAAGAGCAGGGCTCTAATACCG CCGCTGAGAACACCGGCTCCAACGAGCGGAACATCTACAT CGTCGTGGGCGTCGTGTGACCCCTGCTGGTGGCACTGCTG ATGGCCGCTCTGTACCTCGTGCGGATCCGGCAGAAGAAGG CTCAGGGCTCCACCTCCTCCACCAGACTGCACGAGCCTGA GAAGAACGCCAGAGAGATCACCCAGGACACCAACGACAT CACCTACGCCGACCTGAACCTGCCAAGGGCAAGAAGCCT GCCCCTCAGGCTGCCGAGCCTAACAACCACACCGAGTACG CCTCCATCCAGACCAGCCCTCAGCCTGCCTCTGAGGACAC CCTGACCTACGCTGATCTGGACATGGTGCACCTGAACCGG ACCCCCAAGCAGCCAGCTCCTAAGCCCGAGCCTAGCTTCT CTGAGTACGCCAGCGTGCAGGTGCCCCGAAA

hSIRP α -V α C1 α C2 β (последовательность аминокислот)	60	MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKS VLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKE GHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSRIGNITPADAGTYCYVKFRK GSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVSGPAARATPQHTVSF TCESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHS TAKVVLTREDVHSQVICEVAHVTLQGDPLRGANLSETIRVP PTLEVTQQPMRAENQANVTCQVSNFYPRGLQLTWLENGNVS RTETASTLIENKDGTYNWMWSLLVNTCAHRDDVVLTCQVE HDGQQA VSKSYALEVSAHPKEQGSNTAAENTGSNERNIYV VGVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKN AREITQDTNDITYADLNLPK GKKPAPQAAEPNNHTEYASIQT SPQASEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQ VPRK
SIRP α V1(P74A) человека (последовательность нуклеотидов)	61	ATGGAGCCCGCCGGCCCGGCCCGCCCGCCCTCGGGCCGC TGCTCTGCCTGCTGCTCGCCGCGTCTGCGCCTGGTCAGGA GTGGCGGGTGAGGAGGAGCTGCAGGTGATTAGCCTGAC AAGTCCGTGTGGTTGCAGCTGGAGAGACAGCCACTCTGC GCTGCACTGCGACCTCTCTGATCCCTGTGGGGCCCATCCA GTGGTTCAGAGGAGCTGGAGCAGGCCGGGAATTAATCTAC AATCAAAAAGAAGGCCACTTCCCCGGGTAACAACGTGTT CAGACCTCACAAAGAGAAACAACATGGACTTTTCCATCCG CATCGGTAACATCACCCAGCAGATGCCGGCACCTACTAC TGTGTGAAGTTCGGAAAGGGAGCCCCGATGACGTGGAGT TTAAGTCTGGAGCAGGCACTGAGCTGTCTGTGCGCGCCAA ACCCTCTGCCCCGTGGTATCGGGCCCTGCGGCGAGGGCC ACACCTCAGCACACAGTGAGCTTACCTGCGAGTCCCACG GCTTCTACCCAGAGACATCACCTGAAATGGTTCAAAAA TGGGAATGAGCTCTCAGACTTCCAGACCAACGTGGACCCC GTAGGAGAGAGCGTGTCTACAGCATCCACAGCACAGCCA AGGTGGTGCTGACCCGCGAGGACGTTCACTCTCAAGTCAT CTGCGAGGTGGCCACGTACCTTGCAGGGGACCCCTCTT CGTGGGACTGCCAACTTGTCTGAGACCATCCGAGTTCAC CCACCTTGAGGTTACTCAACAGCCCCGTGAGGGCAGAGAA CCAGGTGAATGTCACCTGCCAGGTGAGGAAGTTCTACCC CAGAGACTACAGCTGACCTGGTTGGAGAATGGAAACGTGT CCCGGACAGAAACGGCCTCAACCGTTACAGAGAACAAGG ATGGTACCTACAACCTGGATGAGCTGGCTCCTGGTGAATGT ATCTGCCACAGGGATGATGTGAAGCTCACCTGCCAGGTG GAGCATGACGGGCAGCCAGCGGTCAGCAAAAGCCATGAC CTGAAGGTCTCAGCCACCCGAAGGAGCAGGGCTCAAATA CCGCCGCTGAGAACACTGGATCTAATGAACGGAACATCTA

		TATTGTGGTGGGTGTGGTGTGCACCTTGCTGGTGGCCCTAC TGATGGCGGCCCTCTACCTCGTCCGAATCAGACAGAAGAA AGCCAGGGCTCCACTTCTTCTACAAGTTGCATGAGCCC GAGAAAGAAATGCCAGAGAAATAACACAGGACACAAATGAT ATCACATATGCAGACCTGAACCTGCCAAGGGGAAGAAG CCTGCTCCCCAGGCTGCGGAGCCCAACAACCACACGGAGT ATGCCAGCATTAGACCAGCCCGCAGCCCGCTCGGAGGA CACCTCACCTATGCTGACCTGGACATGGTCCACCTCAAC CGGACCCCCAAGCAGCCGGCCCCAAGCCTGAGCCGTCCT TCTCAGAGTACGCCAGCGTCCAGGTCCCAGGAAG
SIRPαV1(P74A) человека (последовательность аминокислот)	62	MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKS VLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGAGRELIYNQKE GHFPRVTTVSDLTKRNNMDF SIRIGNITPADAGTYCVKFRK GSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSF TCESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHS TAKVVLTREDVHSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVP PTLEV TQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGVNS RTETASTVTENKDGTYNWM SWLLVNVSAHRDDVKLTCQVE HDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTAAENTGSNERNIYIVV GVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNA REITQDNDITYADLNLPKGKKPAPQAAEPNNHTEYASIQTSP QPASEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVP RK
Константный домен каппа человека (последовательность нуклеотидов)	63	CGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCACCTTC CGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTTCTGTCGTGTGC CTGCTGAACAACCTTACCCCCGAGGCCAAGGTGCAGT GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGG AATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTC CCTGTCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAG AAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGC CTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGT GC
Константный домен каппа человека (белковая последовательность)	64	RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTL LSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Константные домены IgG4 человека (включающие S228P) (последовательность нуклеотидов)	65	GCTTCCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTTCTCTGGCCCCCTTG CTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACCGCGCTCTGGGCTGCC TCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCTGTGACAGTGTCTCTG GAACTCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTTCCA GCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCAGCGT

		CGTGACAGTGCCTCCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTAC ACCTGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGG ACAAGCGGGTGAATCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTCC TTGCCAGCCCCTGAATTTCTGGGCGGACCTTCTGTGTTTC TGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCG GACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCAG GAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCG TGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAAC AGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTG CAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCTCCATCGAAAAG ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAG GTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTAAAGGCTTCTACC CCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCC TGAGAACA ACTACAAGACCACCCCTGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTTCTGTACTCTCGCCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTGTTCTCTGCAGCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCC TGTCCCTGTCTCTGGGAAA
Константные домены IgG4 человека (включая S228P) (белковая последовательность)	66	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGK
Константные домены IgG2 человека (последовательность нуклеотидов)	67	GCTTCTACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTG TAGCAGAAGCACCAGCGAGTCTACAGCCGCTCTGGGCTGT CTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTG GAATAGCGGAGCACTGACAAGCGGCGTGACACCTTTCCA GCTGTGCTGCAAAGCTCCGGCCTGTACTCTGTCCAGCGT GGTACAGTGCCCAGCAGCAATTTGGCACCCAGACCTAC ACCTGTAATGTGGACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGG ACAAGACCGTGGAACGGAAGTGCTGCGTGAATGCCCTCC TTGTCTGCTCCTCCAGTGGCTGGCCCTCCCGTGTCTGTGTT CCCTCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACC CCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGG ATCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGA AGTGACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTT

		<p>CAACAGCACCTTCAGAGTGGTGCCGTGCTGACCGTGGTG CATCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAG GTGTCCAACAAGGGCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCA TCAGCAAGACCAAAGGCCAGCCTCGCGAGCCCCAGGTTTA CACACTTCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCAGC GACATCX₁CCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAG AACAACTACAAGACCACACCTCCTATGCTGGACTCCGACG GCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTC CAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGT CTCTGAGCCCCGGCAAA</p> <p>где: X₁ = G, T</p>
Константные домены IgG2 человека (белковая последовательность)	68	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPA PIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIX₁VEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p>где: X₁ = A, S</p>
CDR1 тяжелой цепи 40A (последовательность аминокислот)	69	SYWMH
CDR2 тяжелой цепи 40A (последовательность аминокислот)	70	AIYPVNNDTTYNQKFKG
CDR3 тяжелой цепи 40A (последовательность аминокислот)	71	SFYYSLDAAWFVY
CDR1 легкой цепи 40A (последовательность аминокислот)	72	RASQDIGSRLN

CDR2 легкой цепи 40A (последовательность аминокислот)	73	ATSSLDS
CDR3 легкой цепи 40A (последовательность аминокислот)	74	LQYASSPFT
Вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного антитела 40 (консенсусная последовательность)	75	EVQX ₁ X ₂ QSGAX ₃ X ₄ X ₅ KPGASVKX ₆ SCKASGSTFTSYWMHWV X ₇ QX ₈ PGQGLEWX ₉ GAIYPVNSDTTYNQKFKGX ₁₀ X ₁₁ TX ₁₂ TVX ₁₃ X ₁₄ SX ₁₅ STX ₁₆ YMX ₁₇ LSSLX ₁₈ X ₁₉ EDX ₂₀ AVYYCX ₂₁ RSFYSLD AAWFVYWGQGTXX ₂₂ X ₂₃ TVSS где: X ₁ = F, L X ₂ = Q, R, V X ₃ = E, V X ₄ = L, V X ₅ = A, K, V X ₆ = L, M, V X ₇ = K, R X ₈ = A, R, T X ₉ = I, M X ₁₀ = K, R X ₁₁ = A, V X ₁₂ = L, M X ₁₃ = D, V X ₁₄ = K, T X ₁₅ = A, S, T X ₁₆ = A, V X ₁₇ = E, Q X ₁₈ = R, T X ₁₉ = F, S X ₂₀ = S, T X ₂₁ = A, T X ₂₂ = L, T X ₂₃ = L, V
Вариабельная область легкой цепи гуманизированного антитела 40 (консенсусная последовательность)	76	DIQMTQSPSSLSASX ₁ GX ₂ RVX ₃ ITCRASQDIGSRLNWLQXX ₄ P GKAX ₅ KRLIYATSSLDSGVPX ₆ RFGSX ₇ SGX ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ LTISX ₁₂ LQPEDFATYYCLQYASSPFTFGX ₁₃ GTKX ₁₄ EIX ₁₅ где: X ₁ = L, V

			<p>X₂ = D, E X₃ = S, T X₄ = K, T X₅ = I, P X₆ = K, S X₇ = G, R X₈ = S, T X₉ = D, E X₁₀ = F, Y X₁₁ = S, T X₁₂ = G, S X₁₃ = G, Q X₁₄ = L, V X₁₅ = H, K</p>
VH1	hSIRP α .40A (последовательность нуклеотидов)	77	<p>GAGGTGCAGTTCCTTGCAGTCTGGTGCCGTGCTGGCTAGAC CTGGAACCTCCGTGAAGATCTCCTGCAAGGCCTCCGGCTC CACCTTCACCTCTTACTGGATGCACTGGGTCAAGCAGAGG CCTGGACAGGACTCGAATGGATCGGCGCTCTGTACCCTG TGAACCTCCGACACCACCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAG AGCCAAGCTGACCGTGGCCACCTCTGCTTCTATCGCCTACC TGGAATTTTCCAGCCTGACCAACGAGGACTCCGCCGTGTA CTACTGCGCCCGTCTTCTACTACTCTCTGGACGCCGCTT GGTTTGTGTACTGGGGCCAGGGAAGTCTGGTGACCGTGTCTCT</p>
VH1	hSIRP α .40A (последовательность аминокислот)	78	<p>EVQLFQSGAVLARPGTSVKISCKASGSTFTSYWMHWVKQRP GQGLEWIGALYPVNSDITYNQKFKGRAKLTVATSASIAYLEF SSLTNEEDSAVYYCARSFYYSLDAAWFVYWGQGLVTVSS</p>
VH2	hSIRP α .40A (последовательность нуклеотидов)	79	<p>GAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCTGAGGTTGTGAAGC CTGGCGCTTCCGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTCC ACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTCAAGCAGGCC CTGGACAAGGCCTGGAATGGATCGGCGCTATCTACCCCGT GAACTCCGACACCACCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAA AGCTACCCTGACCGTGGACAAGTCTGCCTCCACCGCTAC ATGGAAGTGTCCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGT ACTACTGCACCCGGTCTTCTACTACTCCCTGGACGCCGCT TGGTTTGTGTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACCGTGTCTCT</p>
VH2	hSIRP α .40A (последовательность аминокислот)	80	<p>EVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGSTFTSYWMHWVKQA PGQGLEWIGAIYPVNSDITYNQKFKGKATLTVDKSASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCTRFSFYSLDAAWFVYWGQGLVTVSS</p>

VH3	hSIRP α .40A	81	GAGGTGCAGCTGAGACAGTCTGGCGCTGTGCTTGTGAAGC CTGGCGCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTC CACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTCAAGCAGACC CCTGGACAGGGACTCGAGTGGATCGGGCGCTATCTACCCTG TGAACTCCGACACCACCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAA AGCTACCCTGACCGTGGACAAGTCTCCTCCACCGCTTAC ATGCAGCTGTCCAGCCTGACCTCTGAGGACTCCGCCGTGT ACTACTGCGCCCGTCTTCTACTACTCTCTGGACGCCGCT TGGTTTGTGTACTGGGGCCAGGGCACAACCCTGACAGTGT CCTCT
VH3	hSIRP α .40A	82	EVQLRQSGAVLVKPGASVKMSCKASGSTFTSYWMHWVKQT PGQGLEWIGAIYPVNSDITYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARSFYSLDAAWFVYWGQGTTLTVSS
VH4	hSIRP α .40A	83	GAGGTGCAGTTCGTTCACTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAAC CTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTCC ACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTCCGACAGGCTC CAGGACAAGGCTTGAATGGATGGGCGCTATCTACCCCGT GAACTCCGACACCACCTACAACCAGAAATCAAGGGCAG AGTGACCATGACCGTCGTGACCTCCACCTCCACCGTGTAC ATGGAAGTGTCCAGCCTGAGATCCGAGGACACCGCCGTGT ACTACTGCGCCCGTCTTCTACTACTCTCTGGACGCCGCT TGGTTTGTGTACTGGGGCCAGGGAAGTCTGGTGACCGTGT CCTCT
VH4	hSIRP α .40A	84	EVQFVQSGAEVKKPGASVKVSKASGSTFTSYWMHWVVRQA PGQGLEWIMGAIYPVNSDITYNQKFKGRVTMTVVVSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCARSFYSLDAAWFVYWGQGLTVTV SS
VH5	hSIRP α .40A	85	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGTGCCGTGTTGGCTAAGC CTGGCGCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTC CACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTCAAGCAGAGG CCTGGACAGGGACTCGAGTGGATCGGGCGCTATCTACCCTG TGAACTCCGACACCACCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAA AGCTACCCTGACCGTGGACAAGTCTCCTCCACCGCTTAC ATGCAGCTGTCCAGCCTGACCTTCGAGGACTCCGCCGTGT ACTACTGCGCCCGTCTTCTACTACTCTCTGGACGCCGCT TGGTTTGTGTACTGGGGCCAGGGCACAACCCTGACAGTGT CCTCT
VH5	hSIRP α .40A	86	EVQLQSGAVLAKPGASVKMSCKASGSTFTSYWMHWVKQR PGQGLEWIGAIYPVNSDITYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYM QLSSLTFEDSAVYYCARSFYSLDAAWFVYWGQGTTLTVSS

VH6 (последовательность нуклеотидов)	hSIRP α .40A	87	GAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAAC CTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTCC ACCTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTCCGACAGGCTC CAGGACAAGGCTTGAATGGATGGGCGCTATCTACCCCGT GAACTCCGACACCACCTACAACCAGAAATCAAGGGCAG AGTGACCATGACCGTGGACACCTCCACCAGCACCGTGTAC ATGGAAGTGTCCAGCCTGAGATCCGAGGACACCGCCGTGT ACTACTGCGCCCGTCTTCTACTACTCTCTGGACGCCGCT TGGTTTGTGTACTGGGGCCAGGGAAGTCTGGTGACCGTGT CCTCT
VH6 (последовательность аминокислот)	hSIRP α .40A	88	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGSTFTSYWMHWVRQA PGQGLEWMGAIYPVNSDITYNQKFKGRVTMTVDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCARSFYYSLDAAWFVYWGQGLVTV SS
VL1 (последовательность нуклеотидов)	hSIRP α .40A	89	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTCCGCCTC TGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCTCTCAG GACATCGGCTCCAGACTGAACTGGCTGCAGCAGACCCCTG GCAAGGCCATCAAGAGACTGATCTACGCCACCTCCAGCCT GGATTCTGGCGTGCCTCTAGATTCTCCGGCTCTAGATCTG GCACCGACTTCTCCCTGACCATCTCTGGACTGCAGCCTGA GGACTTCGCCACCTACTACTGTCTGCAGTACGCCAGCTCTC CATTACCTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGAAATCCAC
VL1 (последовательность аминокислот)	hSIRP α .40A	90	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWLQQTPGK AIKRLIYATSSLDSGVPSRFSRSGTDFSLTISGLQPEDFATY YCLQYASSPFTFGGGTKVEIH
VL2 (последовательность нуклеотидов)	hSIRP α .40A	91	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTCCGCCTC TGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCTCTCAG GACATCGGCTCCAGACTGAACTGGCTGCAGCAGAAGCCTG GCAAGGCCATCAAGAGACTGATCTACGCCACCTCCAGCCT GGATTCTGGCGTGCCTCTAGATTCTCCGGCTCTAGATCTG GCACCGACTTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCTGA GGACTTCGCCACCTACTACTGTCTGCAGTACGCCCTCTCTC CATTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGAAATCAAG
VL2 (последовательность аминокислот)	hSIRP α .40A	92	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWLQKPGK AIKRLIYATSSLDSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCLQYASSPFTFGQGTKVEIK
VL3 (последовательность нуклеотидов)	hSIRP α .40A	93	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTCCGCCTC TGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCTCTCAG GACATCGGCTCCAGACTGAACTGGCTGCAGCAGAAGCCTG GCAAGGCCATCAAGAGACTGATCTACGCCACCTCCAGCCT GGATTCTGGCGTGCCTCTAGATTCTCCGGCTCTAGATCTG

			GCACCGACTTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCTGA GGACTTCGCCACCTACTACTGTCTGCAGTACGCCAGCTCTC CATTACCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
VL3	hSIRP α .40A	94	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWLQKPGK AIKRLIYATSSLDSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCLQYASSPFTFGGGTKLEIK
VL4	hSIRP α .40A	95	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTCCGCCTC TGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCTCTCAG GACATCGGCTCCAGACTGAACTGGCTGCAGCAGAAGCCTG GCAAGGCCCTAAGAGACTGATCTACGCCACCTCCAGCCT GGATTCTGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTG GCACCGAGTTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCTGA GGACTTCGCCACCTACTACTGTCTGCAGTACGCCAGCTCTC CATTACCTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
VL4	hSIRP α .40A	96	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWLQKPGK APKRLIYATSSLDSGVPSRFSRSGSGTEFTLTISSLQPEDFATY YCLQYASSPFTFGGGTKVEIK
VL5	hSIRP α .40A	97	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTCCGCCTC TGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCTCTCAG GACATCGGCTCCAGACTGAACTGGCTGCAGCAGAAGCCTG GCAAGGCCATCAAGAGACTGATCTACGCCACCTCCAGCCT GGATTCTGGCGTGCCCAAGAGATTCTCCGGCTCTAGATCC GGCTCCGACTATACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCTG AGGACTTCGCCACCTACTACTGTCTGCAGTACGCCCTCTCT CCATTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
VL5	hSIRP α .40A	98	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWLQKPGK AIKRLIYATSSLDSGVPKRFSRSGSDYTLTISSLQPEDFATY YCLQYASSPFTFGQGTKVEIK
VL6	hSIRP α .40A	99	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTCTGCTTC CCTGGGCGAGAGAGTGTCCATCACCTGTAGAGCCTCTCAG GACATCGGCTCCAGACTGAACTGGCTGCAGCAGAAGCCTG GCAAGGCCATCAAGAGACTGATCTACGCCACCTCCAGCCT GGATTCTGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTAGATCTG GCACCGACTTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCTGA GGACTTCGCCACCTACTACTGTCTGCAGTACGCCAGCTCTC CATTACCTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
VL6	hSIRP α .40A	100	DIQMTQSPSSLSASLGERVSITCRASQDIGSRLNWLQKPGKA IKRLIYATSSLDSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC LQYASSPFTFGGGTKVEIK

VH мышцы hSIRP α .40A (последовательность нуклеотидов)	101	GAGGTTCA GTTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGC CAGGGACTTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTC CACCTTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTA AACAGGGG CCTGGACAGGGTCTGCAATGGATTGGCGCTATTTATCTGT AAATAATGATACTACCTATAATCAGAAGTTCAAGGGCAAG GCCGA ACTCACTGTAGTCACTTCCACCAGCACTGCCTACA TGGAGGTCAGTAGTCTGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTA T TACTGTACAAGATCGTTCTACTATAGTCTCGACGCGGCCT GGTTTGT TACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCT GCA
VH мышцы hSIRP α .40A (последовательность аминокислот)	102	EVQFQQSGTVLARPGTSVKMSCKASGSTFTSYWMHWVKQG PGQGLQWIGAIYPVNDTTYNQKFKGKAELTVVTSTSTAYM EVSSLTNE DSAVYYCTRSFYSLDAAWFVYWGQGLVTVSA
VL мышцы hSIRP α .40A (последовательность нуклеотидов)	103	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTC TCTGGGAGAAAAGAGTCAGTCTCACTTGTCTGGGCAAGTCAG GACATTGGTAGTAGGTTAAACTGGCTTCAGCAGGAACCAG ATGGA ACTATTA AACGCCTGATCTACGCCACATCCAGTTT AGATTCTGGTGTCCCCAAAAGGTTCA GTGGCAGTAGGTCT GGGTCAGATTATTCTCTCACCATCAGCGGCCTTGAGTCTGA AGACTTTGTAGACTATTACTGTCTACAATATGCTAGTTCTC CGTTCACGTTCTGGAGGGGGACCAAGCTGGAATAAAC
VL мышцы hSIRP α .40A (последовательность аминокислот)	104	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSRLNWLQQEPDGT IKRLIYATSSLD SGVPKRFSGSRSGSDYSLTISGLESEDFV DYY CLQYASSPFTFGGGTKLEIN
Тяжелая цепь мышцы hSIRP α .40A (последовательность аминокислот; константный домен подчеркнут, сигнальный пептид не показан)	105	EVQFQQSGTVLARPGTSVKMSCKASGSTFTSYWMHWVKQG PGQGLQWIGAIYPVNDTTYNQKFKGKAELTVVTSTSTAYM EVSSLTNE DSAVYYCTRSFYSLDAAWFVYWGQGLVTVSA <u>AKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTW</u> <u>NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNV</u> <u>AHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDV</u> <u>LTITLTPKVT CVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPR</u> <u>EEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVN SAAFPAPIEKT</u> <u>ISKTKGRPKAPQVYTIPPKQMAKDKVSLTCMITDFFPEDIT</u> <u>VEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLN VQKSNWE</u> <u>AGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK</u>
Легкая цепь мышцы hSIRP α .40A (последовательность аминокислот; константный домен подчеркнут,	106	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSRLNWLQQEPDGT IKRLIYATSSLD SGVPKRFSGSRSGSDYSLTISGLESEDFV DYY CLQYASSPFTFGGGTKLEIN <u>RADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGAS</u> <u>VVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRONGVLNSWTDODSKDST</u> <u>YSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC</u>

сигнальный пептид не показан)		
rhSIRP α /Fc (последовательность аминокислот)	107	(GVAG)EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQ WFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTRNNMDF SIRIG NITPADAGTYCYVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAP VVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFSRDLTKWFKNGNELSD FQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVL TREDVHSQVICEVAHVTL QGDPLRGTANLSETIRVPPTLEVTTQPPVRAENQVNVTCQVRK FYPQRLQLTWLENGNVSRTETASTVTENKDGTYNWMWLL VNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQG SNTAAENTGSNERIEGRMDPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLS PGK
rhSIRP γ /Fc (последовательность аминокислот)	108	VLWFRGVGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTRNNMDF SIR ISSITPADVGTYYCYVKFRKGSPENVEFKSGPGTEMALGAKPS APVVLGPAARTTPEHTVSFTCESHGFSRDLTKWFKNGNELS DFQTNVDPTGQSVAYSIRSTARVVLDPWDVRSQVICEVAHV TLQGDPLRGTANLSEAIRVPPTLEVTTQPPMRAGNQVNVTCQ VRKFYPSLQLTWLENGNVCQRETASTLTENKDGTYN WTS WFLVNISDQRDDVVLTCQVKHDGQLAVSKRLALEVT VHQK DQSSDATPGPASIEGRMDPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLS PGK
rhCD47/Fc (последовательность аминокислот)	109	QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWK FKGRDIYTFDGLNKS TVPTDFSSAKIEVSQLLKGDA SLKMD KSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIE LKYRVVSWFSPIEGRM DPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLS PGK
hSIRP-V γ C1 β C2 β (последовательность нуклеотидов)	110	ATGCCCGTGCCTGCCTCTTGGCCTCATCTGCCAGCCCCTT TCTGCTGATGACCCTGCTGCTGGGCAGGCTGACAGGCGTG GCAGGCGAAGAGGA ACTGCAGATGATCCAGCCCGAGAAG

		<p>CTGCTGCTCGTGACCGTGGGCAAGACCGCCACCCTGCACT GCACCGTGACATCCCTGCTGCCTGTGGGACCCGTGCTGTG GTTTAGAGGCGTGGGCCCTGGCAGAGAGCTGATCTACAAC CAGAAAAGAGGGCCACTTCCCCAGAGTGACCACCGTGTCCG ACCTGACCAAGCGGAACAACATGGACTTCTCCATCCGGAT CTCCAGCATCACCCCTGCCGACGTGGGCACCTACTACTGC GTGAAGTTCCGGAAGGGCTCCCCGAGAACGTGGAGTTCA AGTCTGGCCCAGGCACCGAGATGGCCCTGGGCGCTAAACC TTCTGCCCTGTGGTGTCTGGACCTGCCGTGCGGGCTACCC CTGAGCACACCGTGTCTTTTACCTGCGAGTCCCACGGCTTC AGCCCTCGGGACATCACCCCTGAAGTGGTTCAAGAACGGCA ACGAGCTGTCCGACTTCCAGACCAACGTGGACCCTGCCGG CGACTCCGTGTCTACTCCATCCACTCTACGCCAGAGTGG TGCTGACCAGAGGCGACGTGCACTCCAAGTGATCTGCGA GATCGCCCATATCACACTGCAGGGCGACCCCTGAGAGGC ACCGCCAATCTGTCTGAGGCCATCAGAGTGCCCCCACCC TGGAAGTGACCCAGCAGCCTATGAGAGCCGAGAACCAGG CCAACGTGACCTGTCAGGTGTCCAACCTTACCCTCGGGG CCTGCAGCTGACCTGGCTGAAAACGGCAATGTGTCCCGG ACCGAGACAGCCTCCACCCTGATCGAGAACAAGGACGGC ACCTACAATTGGATGTCTGGCTGCTCGTGAACACCTGTG CCCACAGGGACGACGTGGTGTGACATGCCAGGTGGAAC ACGATGGCCAGCAGGCCGTGTCCAAGTCCTACGCCCTGGA AATCTCCGCCCATCAGAAAAGAGCACGGCTCCGATATCACC CACGAGGCCGCTCTGGCTCTACCCTCCTCTGCTGGTGGG TCTGCTGCTGGGACCTAAGCTGCTGCTGGTCTGGGCGTG TCCGCCATCTACATCTGCTGGAAGCAGAAGGCTGA</p>
hSIRP-V γ C1 β C2 β (последовательность аминокислот)	111	<p>MPVPASWPHLPSPFLLMTLLGRLTGVAEEELQMIQPEKLL LVTVGKTATLHCTVTSLLPVGVPVWFRGVGPGRELIYNQKE GHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSRISITPADVGTYYCVKFRKG SPENVEFKSGPGTEMALGAKPSAPVVS GPAVRATPEHTVSFT CESHGFSRDLTKWFKNGNELSDFQTNVDPAGDSVSYSIHST ARVVLTRGDVHSQVICEIAHITLQGDPLRGTANLSEAIRVPPT LEVTQPMRAENQANVTCQVSNFYPRGLQLTWLENGNVS TETASTLIENKDGTYNWMSWLLVNTCAHRDDVVLTCQVEH DGQQA VSKSYALEISAHQKEHGS DITHEAALAPTAPLLVALL LGPKLLLVGVSAIYICWKQKA</p>
hSIRP-V β C1 γ C2 β (последовательность нуклеотидов)	112	<p>ATGCCCGTGCCTGCCTCTTGGCCTCATCTGCCAGCCCCTT TCTGCTGATGACCCCTGCTGCTGGGCAGGCTGACAGGCGTG GCAGGCGAAGATGAGCTGCAAGTGATCCAGCCCCGAGAAG TCCGTGTCTGTGGCCGCTGGCGAGTCTGCCACCCTGAGAT</p>

		GCGCTATGACCTCCCTGATCCCCGTGGGCCCATCATGTG GTTTAGAGGCGCTGGCGCTGGCAGAGAGCTGATCTACAAC CAGAAAGAGGGCCACTTCCCCAGAGTGACCACCGTGTCCG AGCTGACCAAGCGGAACAACCTGGACTTCTCCATCTCCAT CAGCAACATCACCCCTGCCGACGCCGGCACCTACTACTGC GTGAAGTTCCGGAAGGGCTCCCCGACGACGTGGAGTTCA AATCCGGCGCTGGAACCGAGCTGTCCGTGCGGGCTAAACC TTCTGCCCTGTGGTGTGGGACCTGCCGCTAGAACCCACC CCTGAGCACACCGTGTCTTTACCTGCGAGTCCCACGGCTT CAGCCCTCGGGACATCACCTGAAGTGGTTCAAGAACGGC AACGAGCTGAGCGACTTCCAGACCAACGTGGACCCTACCG GCCAGTCCGTGGCCTACTCCATCAGATCCACCGCCAGAGT GGTGCTGGACCCTTGGGATGTGCGGTCCCAAGTGATCTGC GAGGTGGCCCATGTGACACTGCAGGGCGATCCTCTGAGAG GCACCGCAATCTGTCTGAGGCCATCAGAGTGCCCCCAC CCTGGAAGTGACCCAGCAGCCTATGAGAGCCGAGAACCA GGCCAACGTGACCTGCCAGGTGTCCAACCTTACCCCTCGG GGCCTGCAGCTGACCTGGCTGGAACCGCAATGTGTCCC GGACCGAGACAGCCTCCACCCTGATCGAGAACAAGGATG GCACCTACAATTGGATGTCCTGGCTGCTCGTGAACACCTG TGCCACCGGGATGACGTGGTGTGACTTGTGAGGTGGAA CACGACGGCCAGCAGGCCGTGTCCAAGTCTACGCCCTGG AAATCTCCGCCATCAGAAAGAGCACGGCTCCGATATCAC CCACGAGGCCGCTCTGGCTCCTACCGCTCCTCTGCTGGTGG CTCTGCTGCTGGGACCTAAGCTGCTGCTGGTCTGGGCGT GTCCGCCATCTACATCTGCTGGAAGCAGAAGGCCTGA
hSIRP-VβC1γC2β (последовательность аминокислот)	113	MPVPASWPHLPSPFLMLLLLGRLTGVAGEDELQVIQPEKSV SVΛΛGESATLRCAMTSLIPVGPIMWFRGAGAGRELIYNQKEG HFPRVTTVSELTKRNNLDFSISISNITPADAGTYCVKFRKGP DDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVLGPAARTPEHTVSFTCE SHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPTGQSVAYSIRSTA RVVLDPWDVRSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSEAIRVPPT LEVTQQPMRAENQANVTCQVSNFYPRGLQLTWLENGNVS TETASTLIENKDGTYNWMSWLLVNTCAHRDDVVLTCQVEH DGQQA VSKSY ALEISAHQKEHGS DITHEAALAPTAPLLVALL LGPKLLLVGVSAIYICWKQKA
hSIRP-VβC1βC2γ (последовательность нуклеотидов)	114	ATGCCCGTGCCTGCCTCTGGCCTCATCTGCCAGCCCCTT TCTGCTGATGACCCTGCTGCTGGGCAGGCTGACAGGCGTG GCAGGCGAAGATGAGCTGCAAGTGATCCAGCCCGAGAAG TCCGTGTCTGTGGCCGCTGGCGAGTCTGCCACCCTGAGAT GCGCTATGACCTCCCTGATCCCCGTGGGCCCATCATGTG

		<p>GTTTAGAGGCGCTGGCGCTGGCAGAGAGCTGATCTACAAC CAGAAAGAGGGCCACTTCCCCAGAGTGACCACCGTGTCCG AGCTGACCAAGCGGAACAACCTGGACTTCTCCATCTCCAT CAGCAACATCACCCCTGCCGACGCCGGCACCTACTACTGC GTGAAGTTCGGGAAGGGCTCCCCGACGACGTGGAGTTCA AATCCGGCGCTGGAACCGAGCTGTCCGTGCGGGCTAAACC TTCTGCCCTGTGGTGTCTGGACCTGCTGTGCGCGCTACCC CTGAGCACACCGTGTCTTTACCTGCGAGTCCCACGGCTTC AGCCCTCGGGACATCACCTGAAGTGGTTCAAGAACGGCA ACGAGCTGAGCGACTTCCAGACCAACGTGGACCTGCCGG CGACTCCGTGTCTACTCCATCCACTCTACCGCCAGAGTGG TGCTGACCAGAGGCGACGTGCACTCCAAGTGATCTGCGA GATCGCCCATATCACACTGCAGGGCGACCCCTGAGAGGC ACCGCAATCTGTCTGAGGCCATCAGAGTGCCCCCACCC TGGAAGTGACCCAGCAGCCTATGAGAGTGGGCAACCAAG TGAACGTGACCTGCCAAGTGGGAAGTTCTACCCCCAGTC CCTGCAGCTGACTTGGAGCGAGAATGGCAACGTGTGCCAG AGAGAGACAGCCTCCACCCTGACCGAGAACAAGGACGGA ACCTACAACCTGGACCTCCTGGTTCCTCGTGAACATCTCCGA CCAGCGGGACGACGTGGTGTGACATGCCAAGTGAAGCA CGATGGACAGCTGGCCGTGTCCAAGCGGCTGGCTCTGGAA GTGACAGTGCACCAGAAAGAGCACGGCTCCGACATCACCC ACGAGGCCGCTCTGGCTCCTACAGCTCCTCTGCTGGTGGCT CTGCTGCTGGGACCTAAGCTGCTGCTGGTCTGGGCGTGT CCGCCATCTACATCTGCTGGAAGCAGAAGGCCTGA</p>
hSIRP-VβC1βC2γ (последовательность аминокислот)	115	<p>MPVPASWPHLPSFLLMTLLGRLTGVADELDQVIQPEKSV SVAAGESATLRCAMTSLIPVGPIMWFRGAGAGRELIYNQKEG HFPRVTTVSELTKRNNLDFISISNITPADAGTYVCVKFRKGS DDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVSGPAVRATPEHTVSFTCE SHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPAGDSVSYSIHSTA RVVLTRGDVHSQVICEIAHITLQGDPLRGTANLSEAIRVPPTL EVTQQPMRVGNQVNVTCQVRKFYPQSLQLTWSSENGNVCQR ETASTLTENKDGTYNWTWFLVNISDQRDDVVLTQVKHGD QLAVSKRLALEVTVHQKEHGSITHEAALAPTAPLLVALLLG PKLLLVVGVSAIYICWKQKA</p>
SIRPβL человека (последовательность нуклеотидов)	116	<p>ATGCCTGTGCCTGCCTCTTGGCCTCATCTGCCCTCTCCATT TCTGCTGATGACCCTGCTGCTGGGCAGACTGACAGGTGTT GCTGGCGAAGAGGAACTGCAAGTGATCCAGCCTGACAAG AGCATCTGTGGCCGCTGGCGAATCTGCCACACTGCACT GTACCGTGACATCTCTGATCCCTGTGGGCCCCATCCAGTG GTTTAGAGGTGCTGGACCTGGCAGAGAGCTGATCTACAAC</p>

			CAGAAAGAGGGACTTCCCCAGAGTGACCACCGTGCCG ACCTGACCAAGCGGAACAACATGGACTTCAGCATCCGGAT CAGCAACATCACCCCTGCCGATGCCGGCACCTACTACTGC GTGAAGTTCAGAAAGGGCAGCCCCGACCACGTGAGTTTA AAAGCGGAGCCGGCACAGAGCTGAGCGTGCGGGCTAAAC CTTCTGCTCCTGTGGTGTCTGGACCAGCCGCTAGAGCTACA CCTCAGCACACCGTGTCTTTTACCTGCGAGAGCCACGGCTT CAGCCCCAGAGATATCACCCCTGAAGTGGTTCAAGAACGGC AACGAGCTGTCCGACTTCCAGACCAATGTGGACCCAGCCG GCGATAGCGTGTCTACAGCATTACAGCACCGCCAAGGT GGTGCTGACCCGGGAAGATGTGCACAGCCAAGTGATTTGC GAGGTGGCCCACGTTACCCTGCAAGGCGATCCTCTGAGAG GAACCGCCAACCTGAGCGAGACAATCCGGGTGCCACCTAC ACTGGAAGTGACCCAGCAGCCTGTGCGGGCCGAGAATCA AGTGAACGTGACCTGCCAAGTGCAGGAAGTTCTACCCTCAG AGACTGCAGCTGACCTGGCTGAAAAACGGCAATGTGTCCC GGACCGAGACAGCCAGCACACTGACCGAGAACAAGGATG GCACCTACAATTGGATGAGCTGGCTGCTGGTCAATGTGTC TGCCACCGGGACGATGTGAAGCTGACATGCCAGGTGGAA CACGATGGCCAGCCTGCCGTGTCTAAGAGCCACGACCTGA AGGTGTCCGCTCATCCC AAAGAGCAGGGCAGCAATACTGC CCCTGGACCTGCTCTTGTCTTCTGCCGCTCCTCTGCTGATCG CCTTTCTGCTGGGACCTAAGGTGCTGCTGGTTGTGGGAGT GTCCGTGATCTACGTGTACTGGAAGCAGAAGGCC
SIRPβL (последовательность аминокислот)	человека	117	MPVPASWPHLPSPFLLMTLLGRLTGVAAGEELQVIQPKSIS VAAGESATLHCTVTSVIPVGIQWFRGAGPGRELIYNQKEGH FPRVTVSDLTKRNNMDFSIKSNITPADAGTYCVKFRKQSP DHVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCE SHGFSRPDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPAGDSVSYSIHSTA KVVLTRDVDHSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPPT LEVTTQPVRAENQVNVTCQVRKFPQRLQLTWLENGNVSR ETASTLTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHD GQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTAPGPALASAAPLLIAFLL GPKVLLVVGVSVIYVYWKQKA
Константные IgG1 (последовательность нуклеотидов)	домены человека	118	GCCAGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCT CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCG TGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCC CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT

		GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC ACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCGGGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAACAACACTACAG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGATAA
Константные домены IgG1 человека (последовательность аминокислот)	119	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
Константные домены IgG1 мыши (последовательность аминокислот)	120	AKTTPPSVYPLAPGCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTVTWN SGSLSSSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQVTVCSVA HPASSTTVDKKLEPSGPISTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSV FIFPPNIKDVLMISLTPKVTCCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVE VHTAQQTTHREDYNSTIRVVSTLPIQHODWMSGKEFKCKVN NKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCL VVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKL NMKTSKWEKTDSEFCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK
Константный домен каппа мыши (последовательность аминокислот)	121	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFFPKDINVKWKI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNS YTCEATHKSTSTSPIVKSFNREK
Константные домены IgG2 человека, мутант V234A-G237A-P238S-	122	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPAAASSVFLFPPKPK

<p>H268A-V309L-A330S-P331S (Sigma) (последовательность аминокислот)</p>		<p>DTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIX₁VEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p> <p>где: X₁ = A, S</p>
<p>Константные домены IgG1 человека, мутант L234A-L235A (последовательность аминокислот)</p>	123	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
<p>Константные домены IgG1 человека, мутант L234A-L235A-P329G (последовательность нуклеотидов)</p>	124	<p>GCTAGCACAAAGGCCCTAGTGTGTTTCTCTGGCTCCCTC TTCCAAATCCACTTCTGGTGGCACTGCTGCTGGGATGCC TGGTGAAGGATTACTTTCTGAACCTGTGACTGTCTCATGG AACTCTGGTCTGACTTCTGGTGTCCACACTTTCCCTGC TGTGCTGCAGTCTAGTGGACTGTACTCTCTGTCACTGTGG TCACTGTGCCCTTTCATCTCTGGGAACCCAGACCTACATT TGTAATGTGAACCACAAACCATCAACACTAAAGTGGACA AAAAAGTGAACCCAAATCCTGTGACAAAACCCACACCTG CCCACCTTGTCCGGCGCCTGAAGCGGCGGGAGGACCTTCT GTGTTTCTGTTCCCCCAAACCAAAGGATACCCTGATGAT CTCGGAACCCCTGAGGTGACATGTGTGGTGGTGGATGTG TCTCATGAGGACCCCGAAGTCAAATTTAATTGGTATGTG ACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAAACCAAGCCTAGAG AGGAACAGTACAATTCAACCTACAGAGTCGTCAGTGTGCT GACTGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAATGGCAAGGAATAC AAGTGTAAGTCTCAAACAAGGCCCTGGGAGCTCCAATTG AGAAAACAATCTCAAAGGCCAAAGGACAGCCTAGGGAAC CCCAGGTCTACACCCTGCCACCTTCGAGAGACGAACTGAC CAAAAACCAGGTGTCCCTGACATGCCTGGTCAAAGGCTTC TACCCTTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAGTCAAATGGAC AGCCTGAGAACAACACTACAAAACAACCCCCCTGTGCTGGA TTCTGATGGCTCTTTCTTTCTGACTCCAAACTGACTGTGG ACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAATGTCTTTTCTTGCTC TGTCATGCATGAGGCTCTGCATAACCACTACACTCAGAAA TCCCTGTCTGTCTCCCGGAAA</p>

Константные домены IgG1 человека, мутант L234A-L235A-P329G (последовательность аминокислот)	125	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Константные домены IgG1 человека, мутант N297Q (последовательность аминокислот)	126	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Константные домены IgG4 человека, мутант S228P-N297Q (последовательность аминокислот)	127	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
VH 18D5 (последовательность аминокислот)	128	QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYWVHWVKQR PIQGLEWIGNIDPSDSDTHYNQKFKDKASLTVDKSSSAYMQ LSSSLTFEDSAVYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGLTVTVSA
VL 18D5 (последовательность аминокислот)	129	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWYL QKPGQSPKLLIYRVSNRFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYFCFQGTHTVPTFGSGTKLEIK
VH KWAR23 (последовательность аминокислот)	130	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYIHWVQQR EQGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQDKATITADTSNTAYLHL SSLTSEDVAVYYCARWGAYWGQGLTVTVSS
VL KWAR23 (последовательность аминокислот)	131	QIVLTQSPAIMASAPGKVTLTCSASSVSSSYLYWYQKPGS SPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEAAAS YFCHQWSSYPRTFGAGTKLELK
rhSIRP α -HIS (последовательность аминокислот)	132	MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKDS VLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKE GHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYVVKFRK GSPDDVEFKSGAGTELSVRAPVAVVSGPAARATPQHTVSF TCESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHS
		TAKVVLTREDVHSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVP PTLEVTTQPPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVS RTETASTVTENKDGTYNWMWLLVNVSAHRDDVKLTCQVE HDGQPAVSKSHDLKVAHPKEQGSNTAAENTGSNERHHHHH HH

Все противопоставленные материалы, цитированные в данном изобретении, включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, запись в базе данных (например, последовательности Genbank или записи GeneID), заявка на патент или патент были конкретно и отдельно указаны как включенные посредством ссылки. Заявители подразумевают, что данное положение о включении посредством ссылки, в соответствии со Сводом федеральных нормативных документов, раздел 37, § 1.57(b)(1), относится ко всем без исключения отдельным публикациям, записям в базе данных (например, последовательностям Genbank или записям GeneID), заявкам на патент или патентам, каждый

из которых явно идентифицирован в соответствии со Сводом федеральных нормативных документов, раздел 37, §1.57(b)(2), даже если такое цитирование не расположено в непосредственной близости от специально предназначенного для этого положения о включении посредством ссылки. Включение специально предназначенных положений о включении посредством ссылки, если они есть, в настоящее описание никоим образом не ослабляет данное основное положение о включении посредством ссылки. Не предполагается, что цитирование противопоставленных материалов в данном изобретении является допущением, что данный противопоставленный материал принадлежит к известному уровню техники, оно также не является каким-либо допущением в отношении содержимого или даты данных публикаций или документов. В тех случаях, когда в противопоставленных материалах приведено определение заявленного термина, которое противоречит определениям, предложенным в настоящем описании, для понимания заявленного изобретения следует использовать определения, предложенные в настоящем описании.

Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами реализации, описанными в данном изобретении. Действительно, различные модификации настоящего изобретения, дополнительно к описанным в данном изобретении, станут очевидны специалистам в данной области из предшествующего описания и сопроводительных фигур. Предполагают, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Полагают, что предшествующей текстовой части описания изобретения будет достаточно, чтобы позволить специалисту в данной области осуществить настоящее изобретение. Различные модификации настоящего изобретения дополнительно к тем, которые показаны и описаны в данном изобретении, станут очевидны специалистам в данной области из предшествующего описания, и они входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с SIRP α человека, где указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность тяжелой цепи, содержащую HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 69; HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70; и HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 71; и последовательность легкой цепи, содержащую LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 72; LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 73; и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 74.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где указанные антитело или его фрагмент имеют следующие характеристики:

связываются с клеткой, экспрессирующей белок SIRP α V1 человека, с EC₅₀ менее 10 нМ, предпочтительно менее 5 нМ, более предпочтительно менее 1,5 нМ, еще более предпочтительно менее 1,0 нМ, еще более предпочтительно менее 0,5 нМ и наиболее предпочтительно приблизительно 0,3 нМ или менее;

связываются с клеткой, экспрессирующей белок SIRP α V2 человека, с EC₅₀ менее 10 нМ, предпочтительно менее 5 нМ, более предпочтительно менее 1,5 нМ, еще более предпочтительно менее 1,0 нМ, еще более предпочтительно менее 0,5 нМ и наиболее предпочтительно приблизительно 0,3 нМ или менее;

не характеризуются детектируемым связыванием с белком SIRP β 1 при концентрации антитела 50 нМ, предпочтительно 67 нМ и более предпочтительно 100 нМ; или, альтернативно, в концентрации, которая в 10 раз больше, предпочтительно в 50 раз, более предпочтительно в 100 раз и еще более предпочтительно в 200 раз больше, чем EC₅₀ антитела против SIRP α V1 или SIRP α V2;

ингибируют связывание между SIRP α человека и CD47 с IC₅₀ менее 10,0 нМ, более предпочтительно менее 5,0 нМ, еще более предпочтительно менее 2,5 нМ и наиболее предпочтительно приблизительно 1,0 нМ или менее; и показывает балл "человечности" T20 по меньшей мере 79, и более предпочтительно 85.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одну из следующих комбинаций последовательности вариабельной области тяжелой цепи/последовательности вариабельной области легкой цепи:

SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 90,

SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 92,

SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 96.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по одному из пп.1-3, где указанное антитело представляет собой интактный IgG.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по одному из пп.1-4, где указанное антитело содержит Fc-область дикого типа IgG2 или мутированную Fc-область IgG2, или где указанное антитело содержит мутированную Fc-область IgG1, или где указанное антитело содержит мутированную Fc-область IgG4.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где указанные антитело или

антигенсвязывающий фрагмент гуманизованы.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, которое представляет собой гуманизованное антитело, которое содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи, где каждая переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 80, и каждая переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 90, или где каждая переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 80, и каждая переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 92, или где каждая переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 80, и каждая переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 96.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, которые содержат паттерн гликозилирования, характерный для экспрессии клеткой млекопитающего, и, необязательно, гликозилирование в результате экспрессии в клетке CHO.

9. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любое из антител или любой из антигенсвязывающих фрагментов по пп.1-8.

10. Выделенная нуклеиновая кислота по п.9, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 79, кодирующую переменную область тяжелой цепи; и по меньшей мере одну из

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 89, кодирующей переменную область легкой цепи,

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 91, кодирующей переменную область легкой цепи, или

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 95, кодирующей переменную область легкой цепи.

11. Вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.9 или 10.

12. Вектор экспрессии по п.11, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую как последовательность тяжелой цепи, так и последовательность легкой цепи антитела против SIRP α , при этом указанный вектор экспрессии содержит следующие последовательности первой нуклеиновой кислоты/последовательности второй нуклеиновой кислоты, выбранные из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 79/SEQ ID NO: 89,

SEQ ID NO: 79/SEQ ID NO: 91,

SEQ ID NO: 79/SEQ ID NO: 95.

13. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.11 или 12 для экспрессии антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8.

14. Клетка-хозяин по п.13, которая продуцирует полноразмерное антитело против SIRP α .

15. Клетка-хозяин по п.14, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку, клетку человека, клетку млекопитающего, клетку *Pichia*, клетку растения, клетку HEK293 или клетку яичников китайского хомяка (CHO).

16. Композиция для лечения состояния, характеризующегося передачей сигналов SIRP α /CD47, у субъекта, нуждающегося в этом, путем блокирования передачи сигналов hSIRP α /hCD47, содержащая в эффективном количестве антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

17. Композиция по п.16, где указанное состояние представляет собой рак или инфекцию.

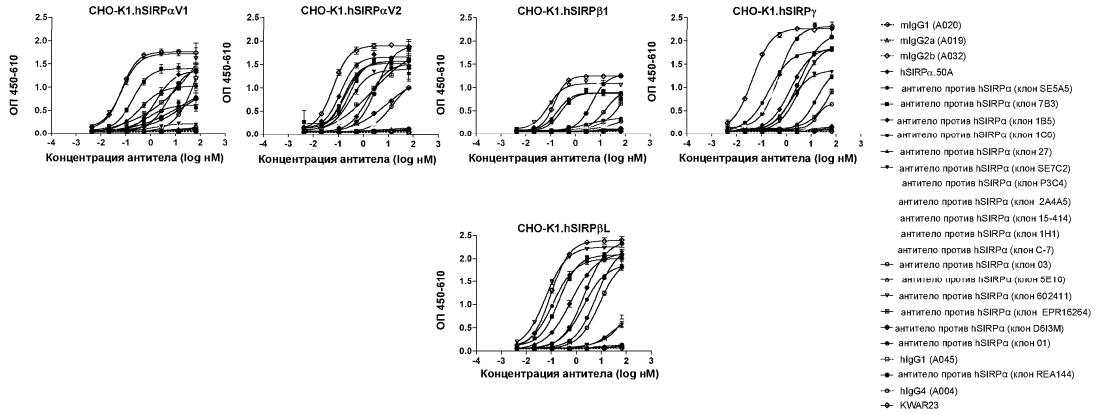
18. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь любого из антител или антигенсвязывающих фрагментов по пп.1-8, в условиях, благоприятных для экспрессии указанного полинуклеотида.

19. Способ по п.18, дополнительно включающий выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки-хозяина и/или культуральной среды.

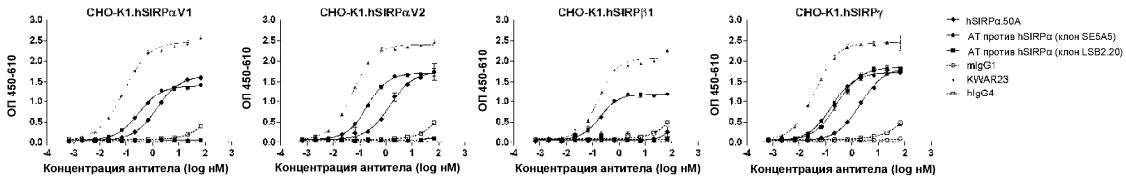
20. Способ обнаружения присутствия пептида SIRP α или его фрагмента в образце, включающий приведение в контакт указанного образца с антителом или его фрагментом по любому из пп.1-8 и обнаружение присутствия комплекса между указанным антителом или фрагментом и пептидом, где обнаружение указанного комплекса указывает на присутствие пептида SIRP α .

21. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8 для лечения состояния, характеризующегося передачей сигналов SIRP α /CD47, у нуждающегося в этом субъекта путем блокирования передачи сигналов hSIRP α /hCD47.

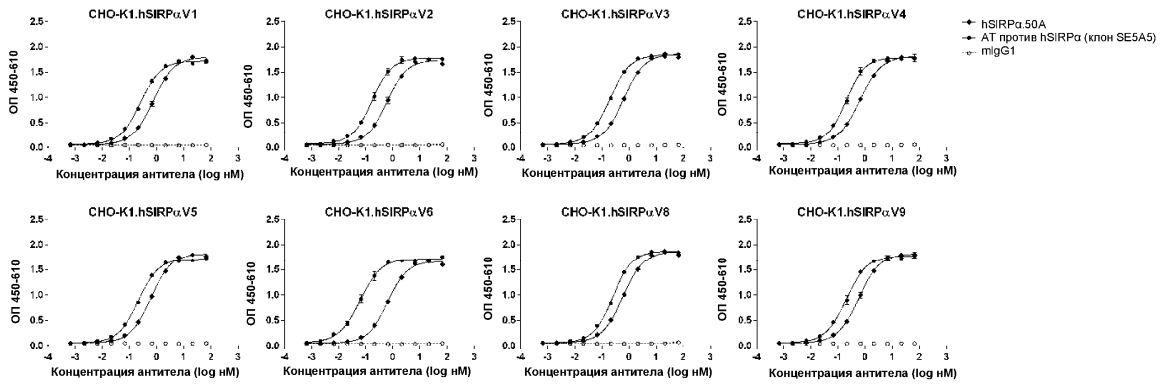
22. Применение по п.21, где указанное состояние представляет собой рак или инфекцию.



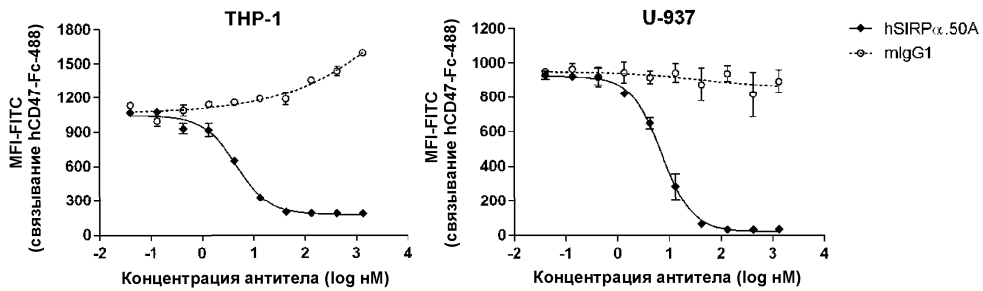
Фиг. 1



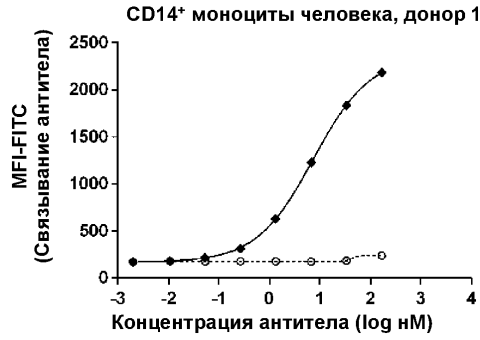
Фиг. 2



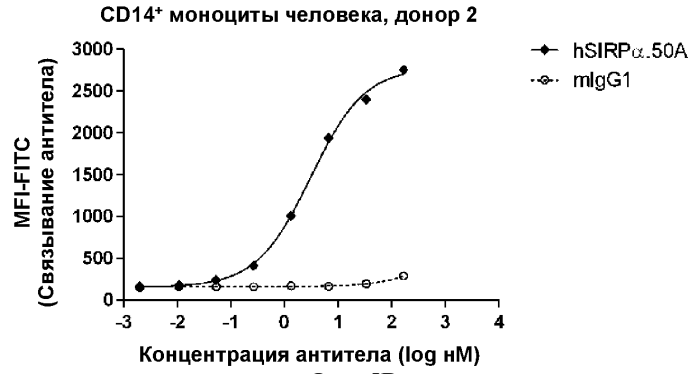
Фиг. 3



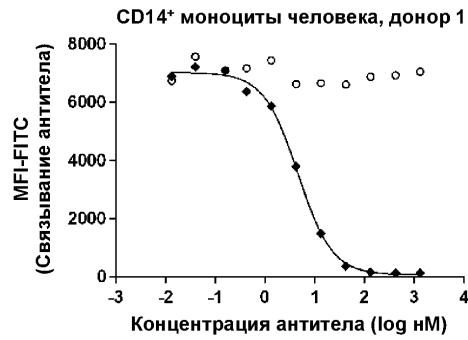
Фиг. 4



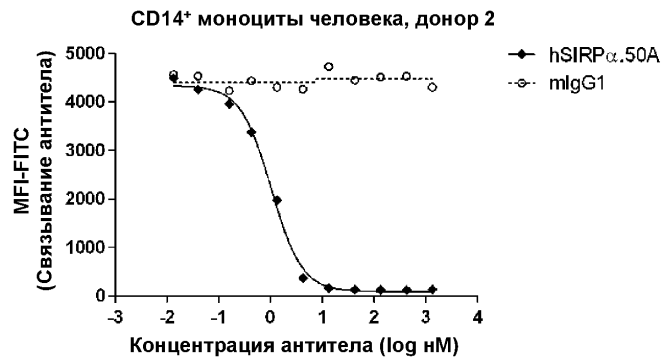
Фиг. 5А



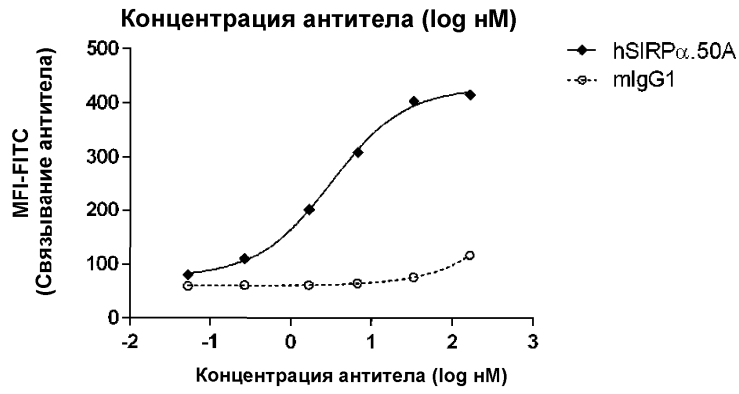
Фиг. 5В



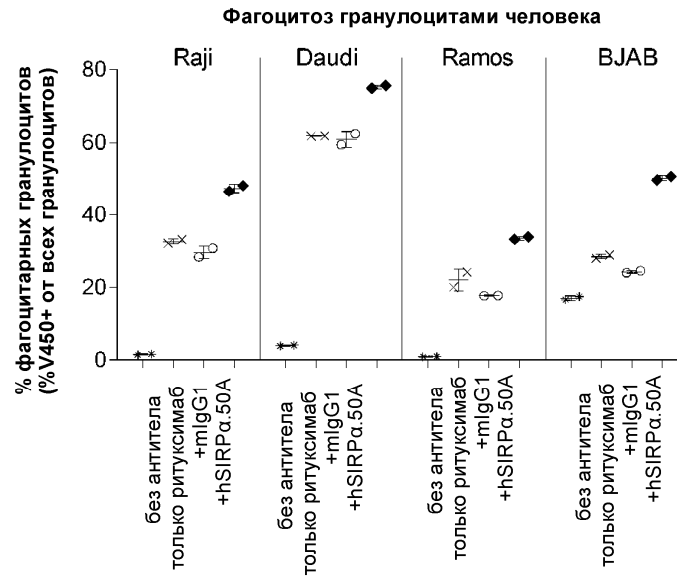
Фиг. 5С



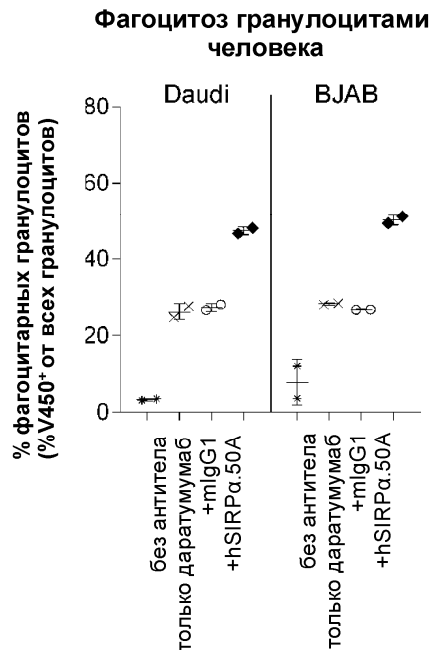
Фиг. 5D



Фиг. 6А

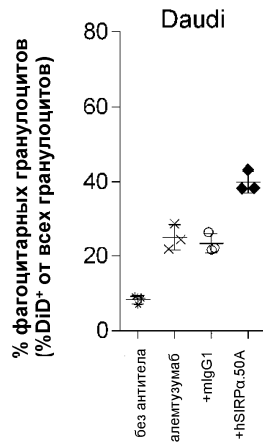


Фиг. 6В



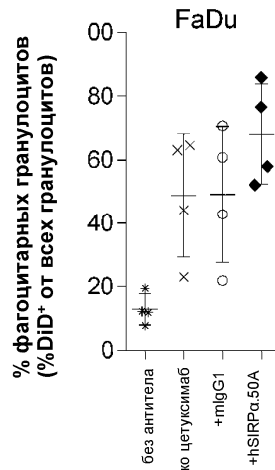
Фиг. 6С

Фагоцитоз гранулоцитами человека



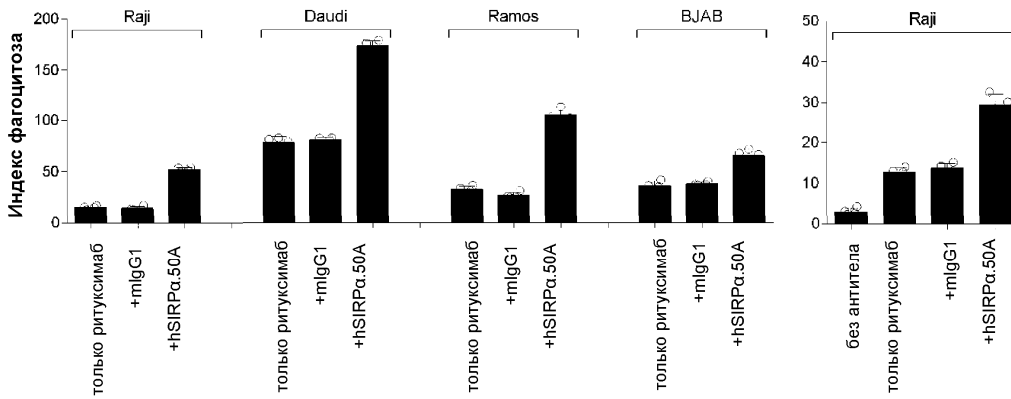
Фиг. 6D

Фагоцитоз гранулоцитами человека

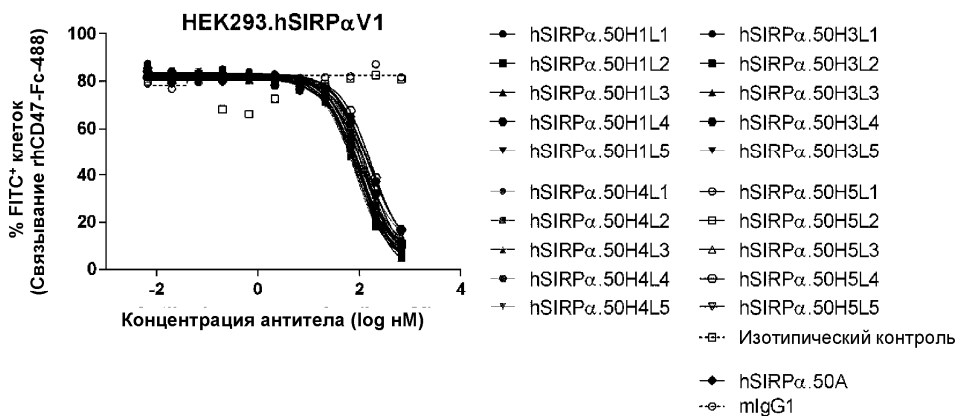


Фиг. 6E

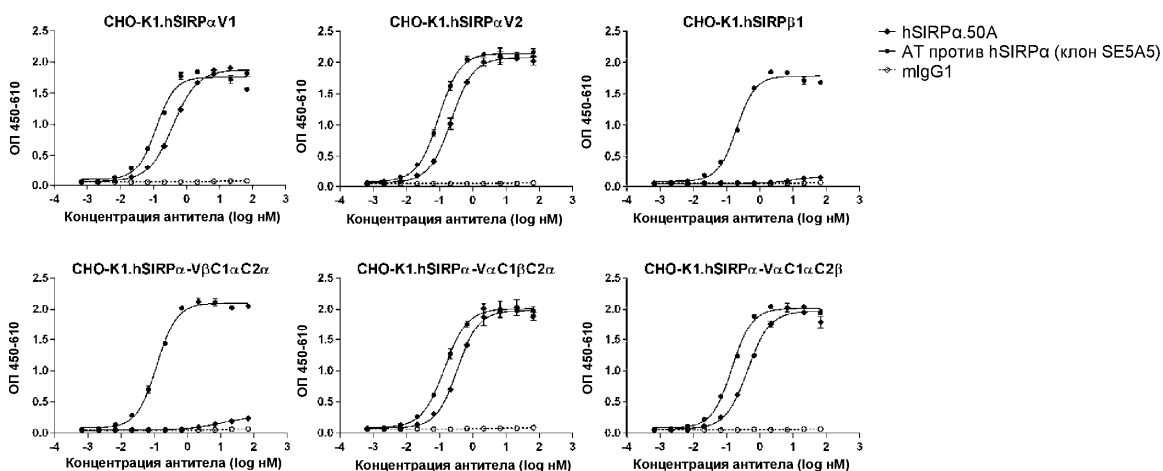
Фагоцитоз первичными MDM человека



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

hSIRP α V1 EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGP^QI^QWFRGAGP^GRELIIYNQKEGHFPRV

hSIRP α V2 EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTV^TSLIPVGP^IQ^WFRGAGPARELIYNQKEGHFPRV

hSIRP β 1 EEELQVIQPDKSVSVAAGESATLRCA^MTSLIPVGP^IQ^WFRGAG^ARELIIYNQKEGHFPRV

*:*****:* ** *****:* * *: ***** ***** .*****

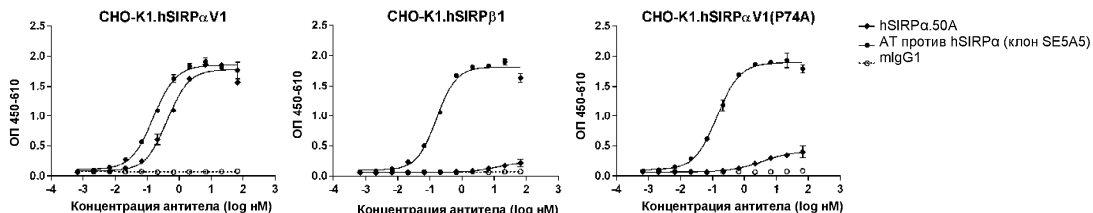
hSIRP α V1 TTVSDLTKRNNMDFSI^RIGNITPADAGTY^YCVKFRKGS^PDDVEFKSG

hSIRP α V2 TTVSESTKRENMDFSI^SISINITPADAGTY^YCVKFRKGS^P-TEFKSG

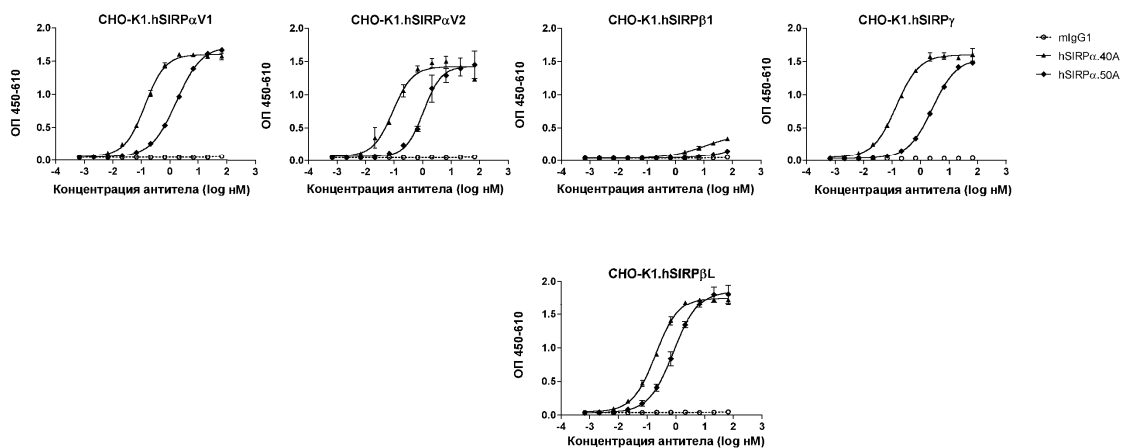
hSIRP β 1 TTVSELTKRNNMDFSI^SISINITPADAGTY^YCVKFRKGS^PDDVEFKSG

*****: * ** : * ***** * .*****

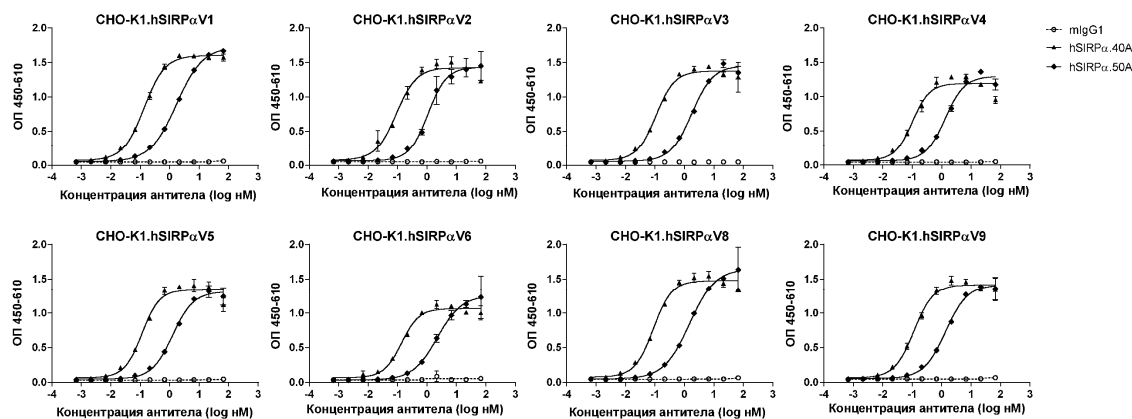
Фиг. 10А



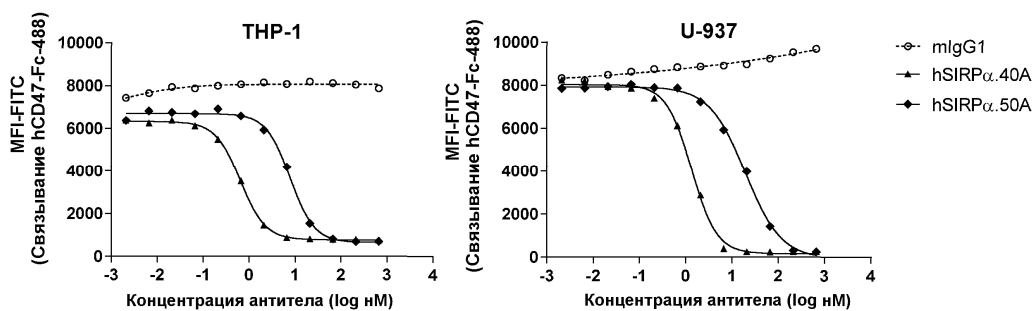
Фиг. 10В



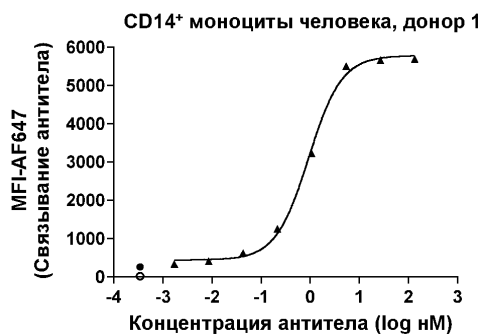
Фиг. 11



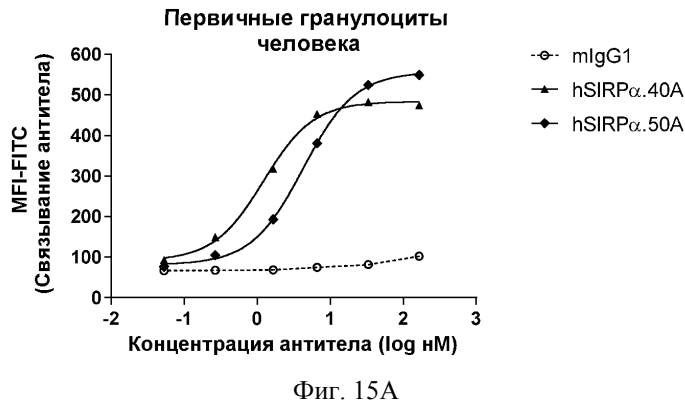
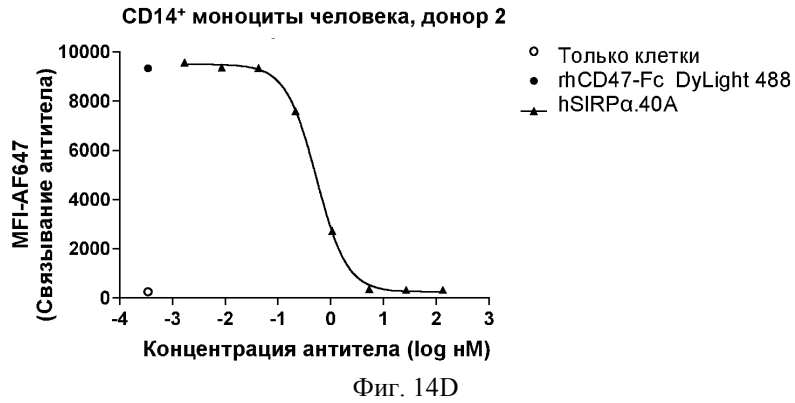
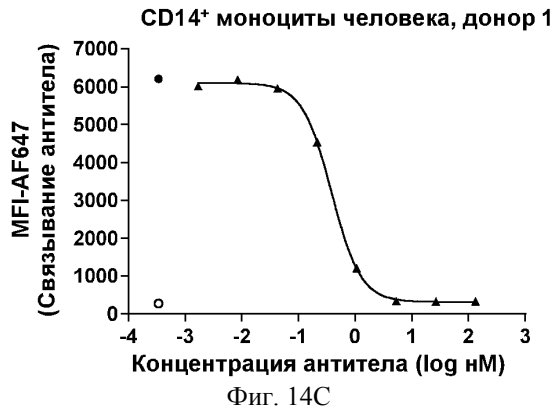
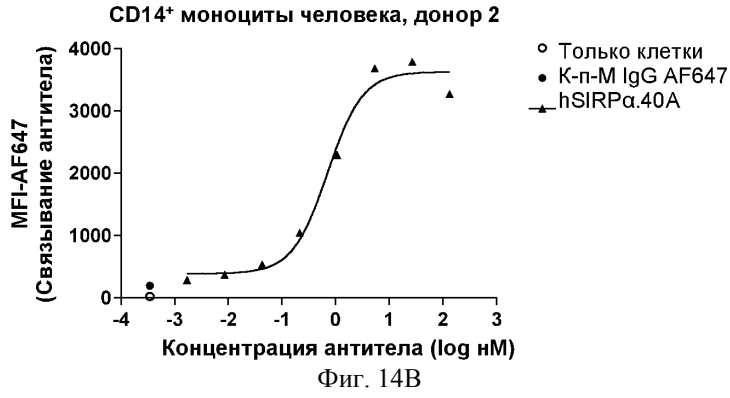
Фиг. 12

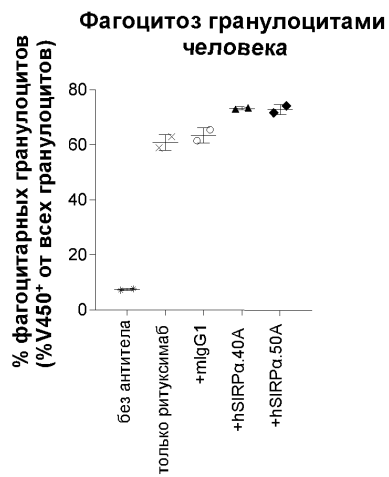


Фиг. 13

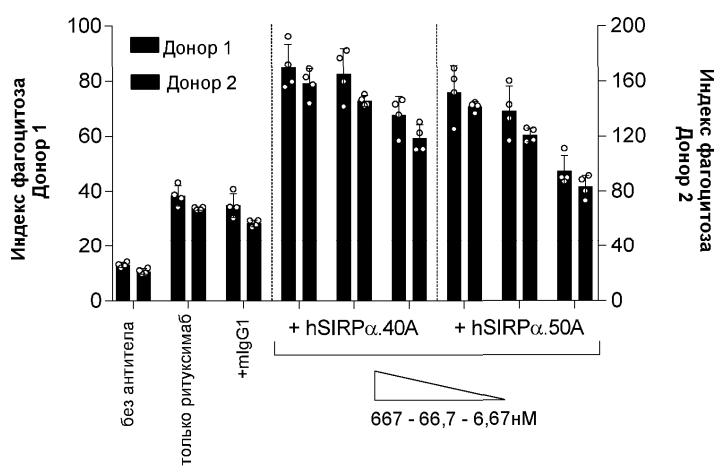


Фиг. 14А

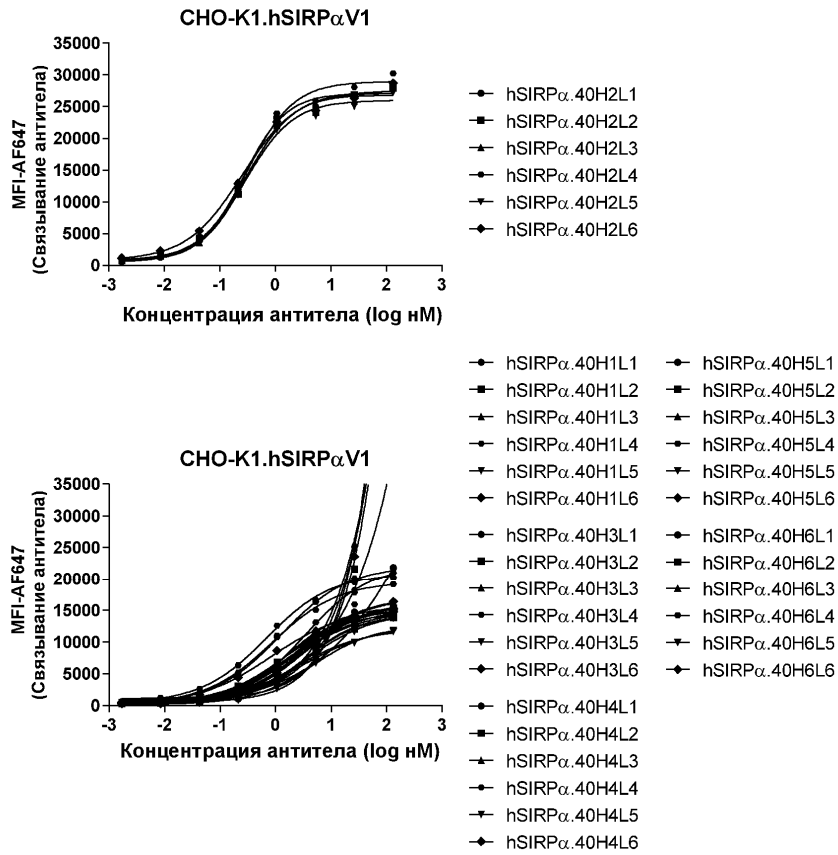




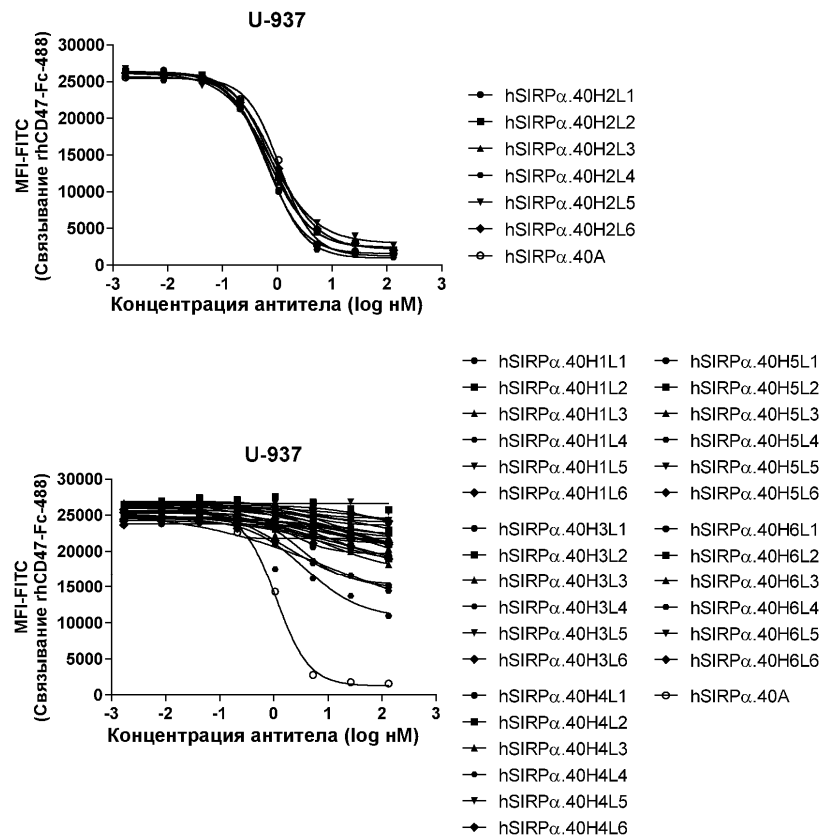
Фиг. 15B



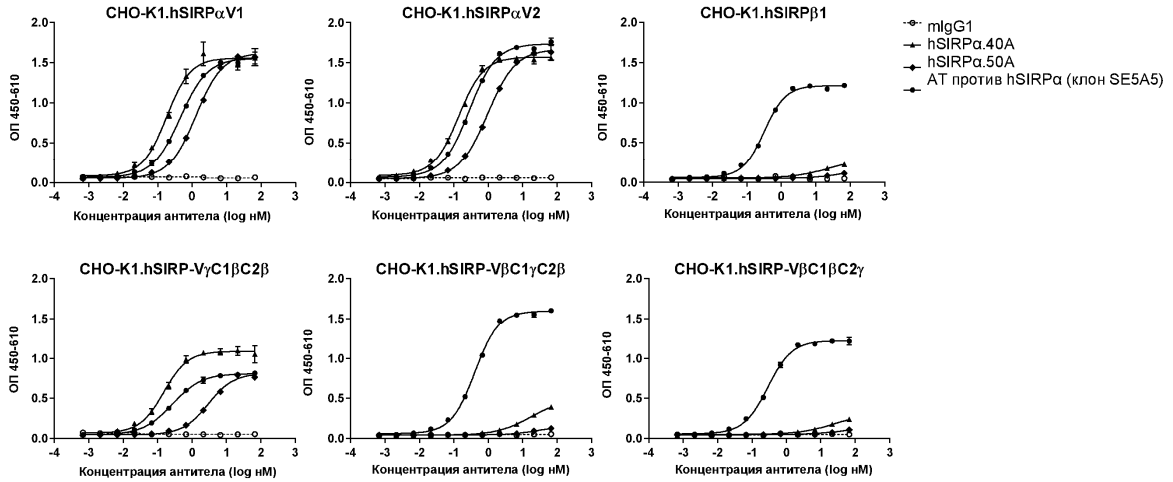
Фиг. 16



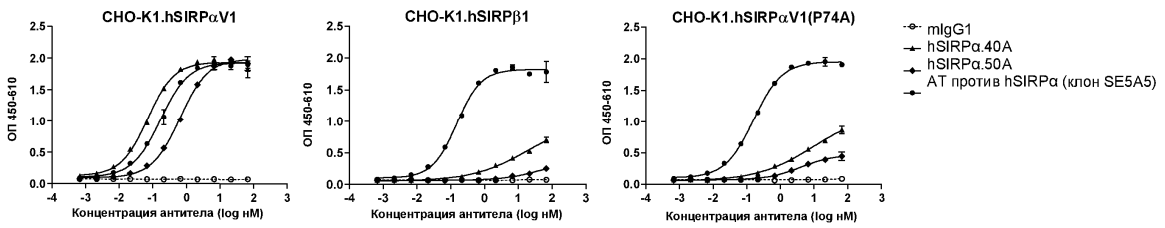
Фиг. 17



Фиг. 18

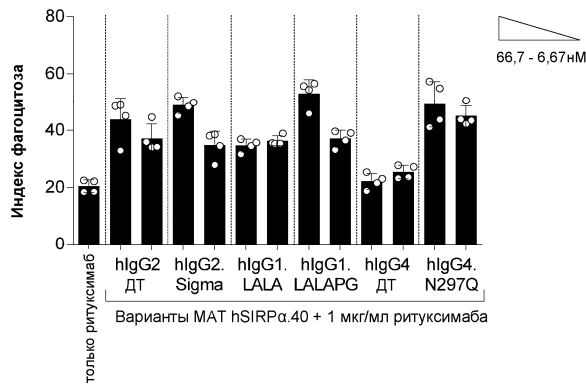


Фиг. 19



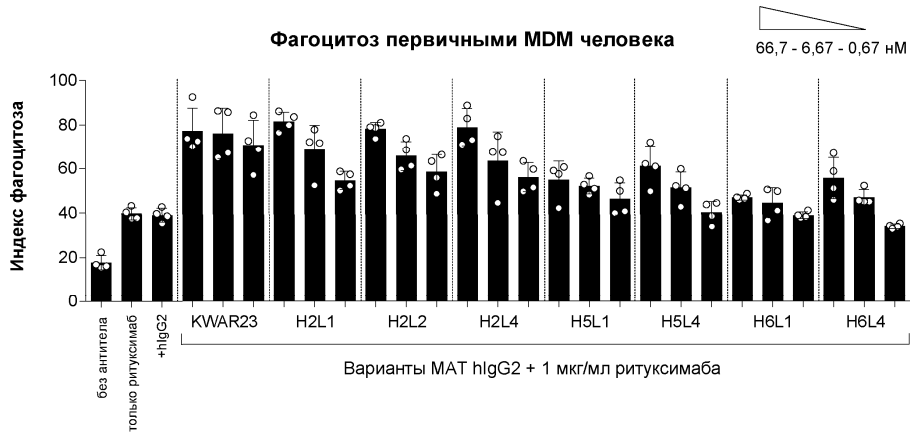
Фиг. 20

Фагоцитоз первичными MDM человека



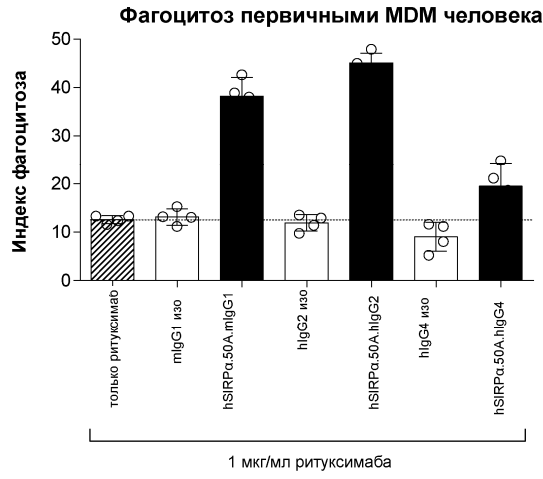
Фиг. 21

Фагоцитоз первичными MDM человека

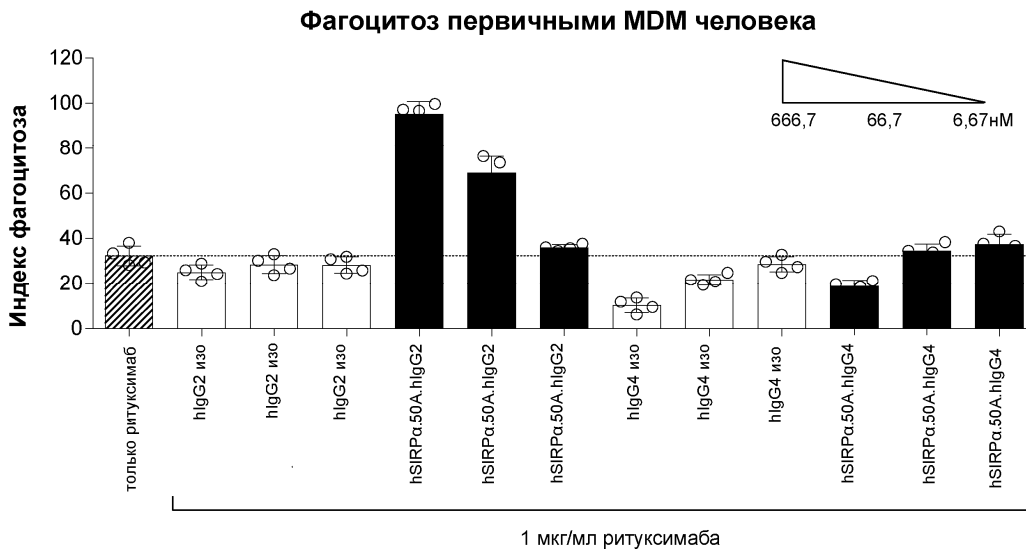


Фиг. 22

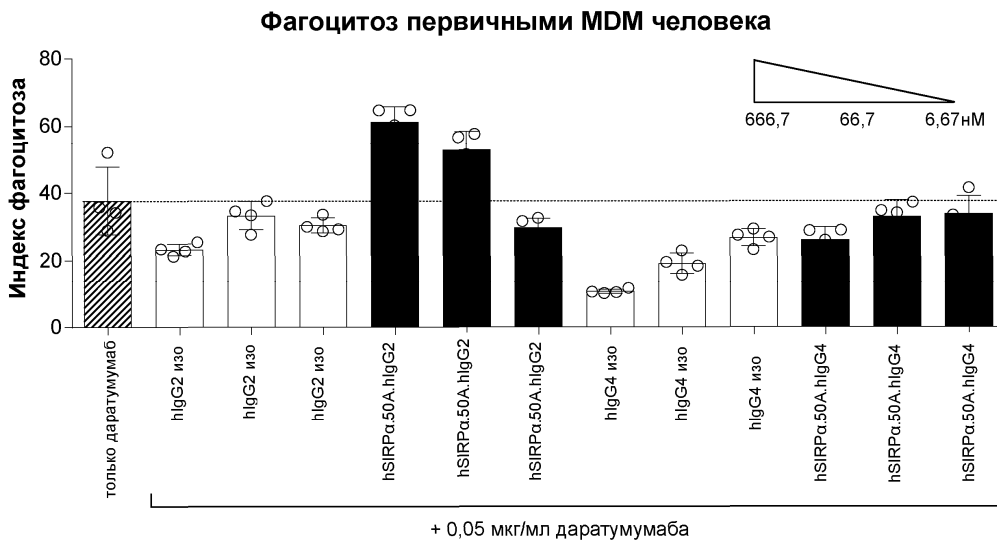
043743



Фиг. 23А

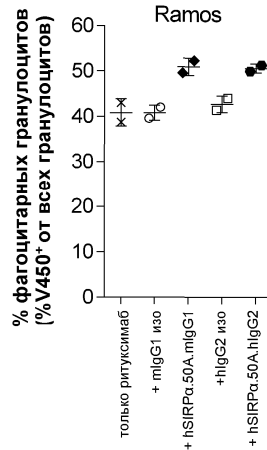


Фиг. 23В



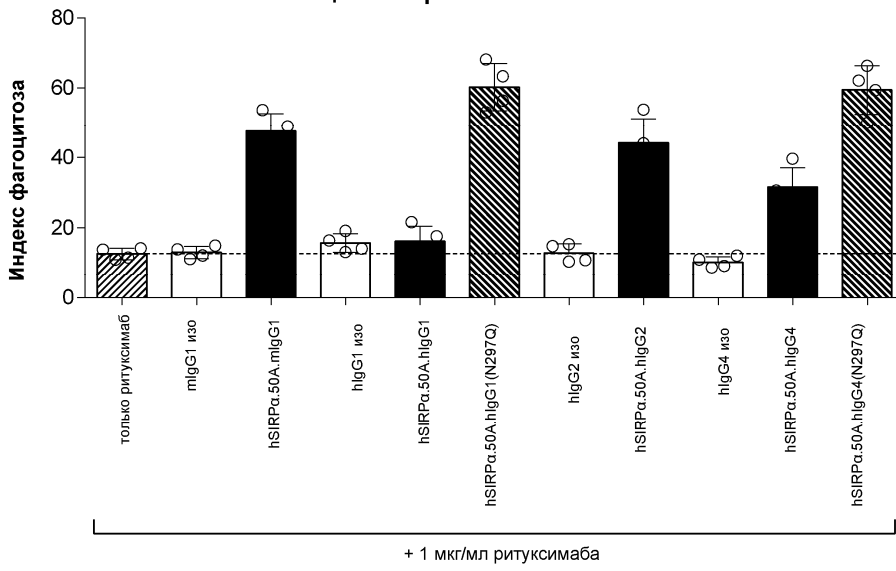
Фиг. 23С

Первичные
гранулоциты человека



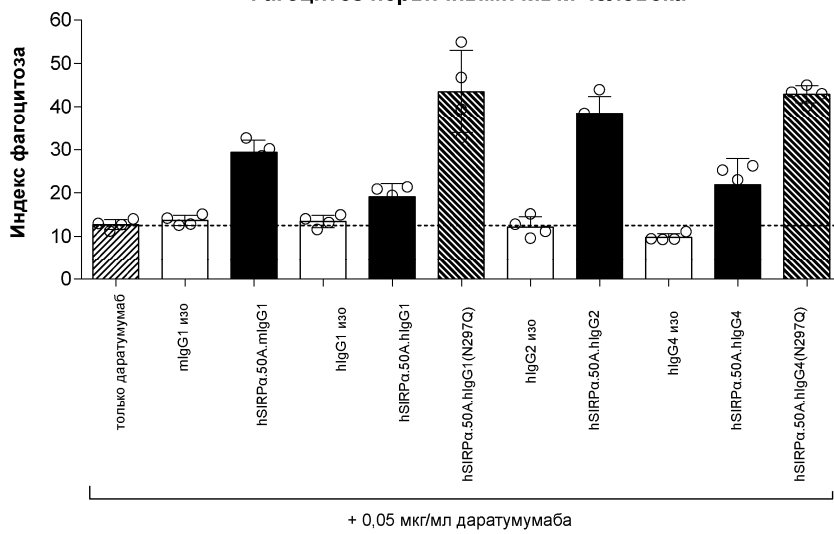
Фиг. 23D

Фагоцитоз первичными MDM человека

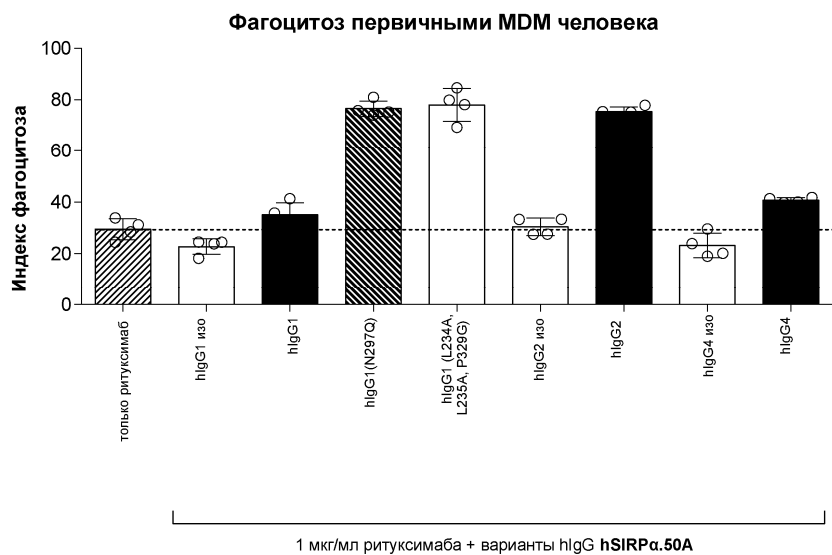


Фиг. 24А

Фагоцитоз первичными MDM человека



Фиг. 24В



Фиг. 25

