

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044628**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.18

(21) Номер заявки
202092825

(22) Дата подачи заявки
2019.05.24

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) **АНТИ-SIRPA АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/676,813**

(32) **2018.05.25**

(33) **US**

(43) **2021.04.22**

(86) **PCT/US2019/033884**

(87) **WO 2019/226973 2019.11.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛЕКТОР ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:
**Пинсетик Эндрю, Хо Вэй-Сень, Калл
Патрисия, Розенталь Арнон (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2018057669**
WO-A1-2018107058
WO-A1-2017068164
WO-A2-2017178653
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), pages 1-15, XP55421877, ISSN: 2379-3708, DOI: 10.1172/jci.insight.89140, the whole document

(57) Изобретение в общем относится к композициям, которые включают антитела, например моноклональные антитела, фрагменты антитела и т.д., которые специфически связывают SIRPA полипептид, например SIRPA млекопитающего или человеческий SIRPA, и применению таких композиций для профилактики, снижения риска или лечения индивида, нуждающегося в таковом.

B1

044628

044628

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В изобретении заявлен приоритет к предварительной заявке на патент США № 62/676,813, поданной 25 мая 2018 г., которая включена в настоящий документ в качестве ссылки для любой цели.

Список последовательностей

Настоящее изобретение содержит список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и включен в настоящий документ в качестве ссылки полностью. Указанная копия ASCII, созданная 14 мая 2019 г., называется 40004-PCIT_SL.txt и имеет размер 99798 байтов.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к анти-SIRP α антителам и терапевтическому применению таких антител.

Уровень техники

Фагоциты, такие как макрофаги (МФ) и дендритные клетки (ДК), отличают здоровые клетки от аномальных с помощью сложного набора рецепторов клеточной поверхности, которые модулируют клеточный статус активации, пролиферацию и/или эффекторные функции. Многие из этих рецепторов распознают различные лиганды, которые либо маркируют нежелательные клетки для удаления (так называемые сигналы "съешь меня"), либо защищают нормальные клетки от разрушения (так называемые сигналы "не ешь меня"). В последние годы ось SIRP α -CD47 стала критическим определителем в программируемом удалении клеток макрофагами в различных клинических условиях, начиная от выживания раковых клеток и заканчивая успешным энgraфтментом трансплантации гемопоэтических клеток. Терапевтические агенты, влияющие на этот путь, могут удовлетворить соответствующую медицинскую потребность в облегчении заболевания, что особенно актуально при многих типах рака человека.

SIRP α (сигнальный регуляторный белок- α) принадлежит к SIRP семейству трансмембранных рецепторов, которые преимущественно экспрессируются в клеточной линии миелоидных клеток (включая МФ, ДК, гранулоциты и т.д.) и характеризуются внеклеточной областью, содержащей 2 проксимальных к мембране IgC домена и дистальный IgV домен. Уникальный среди этого семейства, SIRP α содержит внутриклеточный цитоплазматический иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ИТИМ). При перекрестном связывании рецепторов, тирозин-фосфорилированные ИТИМ сайты привлекают и активируют SHP фосфатазы для отрицательного регулирования клеточных функций, таких как фагоцитоз или выделение воспалительного цитокина. CD47 служит в качестве основного лиганда для SIRP α , и его обширная экспрессия в большинстве клеточных типов, включая эндотелиальные/эпителиальные клетки, лейкоциты и эритроциты, позволяет предположить, что он медирует сигнал "не ешь меня" для защиты здоровых клеток от фагоцит-зависимого клиренса. В поддержку этой точки зрения, несколько исследований показывают, что адоптивный перенос красных кровяных телец или лейкоцитов от CD47-нокаутированных мышей реципиентам дикого типа приводит к быстрому клиренсу CD47-дефицитных клеток. Наоборот, позиционный генетический анализ множества штаммов мышей с ослабленным иммунитетом, получающих человеческие гемопоэтические клетки, идентифицировал аллель Sirp α у мышей NOD как причинный фактор для успешного энgraфтмента в моделях ксенотрансплантации. Последующие исследования показали, что аллельный вариант SIRP α , экспрессируемый только у мышей NOD, сохранял способность связывать человеческий CD47, экспрессированный на человеческих гемопоэтических стволовых клетках, и, таким образом, подавлять макрофагозависимое отторжение трансплантата.

Регулируемая экспрессия SIRP α и CD47 устанавливает механизм гомеостатического контроля для модулирования активности фагоцитов. Например, апоптотические клетки снижают экспрессию CD47, чтобы способствовать поглощению резидентными макрофагами, в то время как живые клетки остаются неповрежденными. Также, воспалительные стимулы, такие как LPS, снижают экспрессию SIRP α в макрофагах и дендритных клетках (ДК) для потенцирования их активации во время воспаления. Однако дисрегуляция экспрессии SIRP α и CD47 способствует иммунопатологическим заболеваниям, как видно при раке. Некоторые опухоли значительно усиливают экспрессию CD47 относительно не раковых клеток того, чтобы избежать механизмов иммунологического надзора, которые обычно удаляют злокачественные клетки. Доклинические исследования показывают, что генетический нокаут CD47 в сингенных опухолевых моделях, таких как B16F10 меланома, является достаточным для ингибирования роста опухоли у иммунокомпетентных мышей. Похожие результаты наблюдали для колоний человеческих раковых клеток с нокаутом CD47, трансплантированных иммунокомпромиссным мышам. Альтернативно, биологические агенты, которые разрывают взаимодействие SIRP α -CD47, такие как анти-CD47 антитела, также улучшают клиренс опухоли в мышинных моделях. При объединении с коммерческими противоопухолевыми антигенными антителами, такими как трастузумаб или ритуксимаб, анти-CD47 антитела способствуют синергетическому повышению противоопухолевого ответа по сравнению со стандартной монотерапией. Еще, учитывая повсеместную экспрессию CD47, анти-CD47 антитела рискуют тяжелым токсическим грузом из-за побочных действий, ограничивающих их терапевтическую эффективность. Тем не менее, эти исследования установили критическое значение пути SIRP α -CD47 в регулировании миелоидных клеток с потенциальным применением в раковой иммунотерапии.

Анти-SIRPA антитела ранее были описаны в, например, Публикациях заявок на международный патент №№: WO 2018/057669, WO 2018/026600, WO 2017/178653, WO 2017/068164, WO 2016/063233, WO 2016/205042, WO 2015/138600, WO 2013/0956352, WO 2009/091547, WO 2009/131453 и WO 2009/046541.

Соответственно, существует потребность в терапевтических анти-SIRPA антителах для лечения заболеваний, расстройств и состояний, связанных с нежелательной активностью SIRPA.

Все цитируемые в настоящем документе ссылки, включая заявки на патенты и публикации, полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение в общем направлено на композиции, которые включают антитела, например, моноклональные, химерные, гуманизированные антитела, фрагменты антител и т.д., которые специфически связывают человеческий SIRPA, и к способам применения таких композиций.

Определенные аспекты данного изобретения основаны, по меньшей мере, частично, на идентификации анти-SIRPA антител с улучшенными и/или усиленными функциональными характеристиками (например, относительно анти-SIRPA антитела с вариабельной областью тяжелой цепи, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID №: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID №: 5, включая, например, улучшенную и/или усиленную способность снижать поверхностные уровни SIRPA на поверхности клеток, и/или иметь улучшенную и/или усиленную кинетику связывания, и/или иметь улучшенную и/или усиленную КД, и/или иметь улучшенные и/или усиленные значения EC50. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения имеют КД для человеческого SIRPA, который, по меньшей мере, 2-кратно, по меньшей мере, 3-кратно, по меньшей мере, 4-кратно, по меньшей мере, 5-кратно, по меньшей мере, 6-кратно, по меньшей мере, 7-кратно, по меньшей мере, 8-кратно, по меньшей мере, 9-кратно или, по меньшей мере, 10-кратно ниже, чем анти-SIRPA антитело, имеющее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 5. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения имеет КД для человеческого SIRPA менее чем 6, менее чем 5, менее чем 4, менее чем 3, менее чем 2, менее чем 1, менее чем 0,9, менее чем 0,8, менее чем 0,7, менее чем 0,6 или менее чем 0,5 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения снижают поверхностноклеточные уровни экспрессии SIRPA *in vitro* с EC50, которое составляет на, по меньшей мере, около 20, по меньшей мере, около 30, по меньшей мере, около 40 или, по меньшей мере, около 50% ниже, чем анти-SIRPA антитело, имеющее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 2 и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 5. Предпочтительно, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения снижает клеточные уровни SIRPA *in vitro* с половинной максимальной эффективной концентрации (EC50), которая варьируется от около 0,4 до около 0,5 нМ. Предпочтительно, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения имеет константу диссоциации (КД) для человеческого SIRPA, которая варьируется от около 0,6 до 0,7 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения связывает человеческий SIRPA v1. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения связывает человеческий SIRPA v2. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения связывает человеческий SIRPB (SIRPбета) v3. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения не связывает человеческий SIRPB v1. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения не связывает мышинный SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения не связывает человеческий SIRPγ. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения связывает SIRPA яванского макака. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения не связывает SIRPB1 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения связывает SIRPA мартышки.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, данное изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело связывает человеческий SIRPA, человеческий SIRPA v1, человеческий SIRPA v2, SIRPA яванского макака, SIRPA мартышки и человеческий SIRPβ3.

человеческим SIRPA, где антитело связывается с ингибирующим Fc рецептором. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, ингибирующим Fc рецептором является ингибирующий Fc-гамма рецептор IIB (FcγRIIB).

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело снижает клеточные уровни FcγRIIB.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело имеет человеческий или мышинный IgG1 изотип и содержит одно или более аминокислотных замещений в Fc области на аминокислотном остатке, выбранном из группы, состоящей из: N297A, D265A, D270A, L234A, L235A, G237A, P238D, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D и любого их сочетания, где нумерация аминокислотных остатков производится согласно нумерации EU, или содержит делецию аминокислоты в области Fc в положении, соответствующем глицину 236.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело содержит одно или более аминокислотных замещений в Fc области на аминокислотном остатке, выбранном из группы, состоящей из: C127S, L234A, L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, E345R, E430G, S440Y и любого их сочетания, где нумерация аминокислотных остатков производится согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA, снижает внутриклеточные уровни SIRPA, снижает общие клеточные уровни SIRPA или любое их сочетание.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело вызывает разложение SIRPA, вызывает расщепление SIRPA, вызывает интернализацию SIRPA, вызывает сбрасывание SIRPA, вызывает отрицательную регуляцию экспрессии SIRPA или любое их сочетание.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело отрицательно регулирует экспрессию SIRPA в человеческих моноцитах.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело отрицательно регулирует экспрессию SIRPA в человеческих макрофагах.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело отрицательно регулирует экспрессию SIRPA в человеческих макрофагах на около 70-95%.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело имеет аффинность (КД) к человеческому SIRPA менее чем 6, менее чем 5, менее чем 4, менее чем 3, менее чем 2 или менее чем 1 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело имеет аффинность (КД) к человеческому SIRPA от около 0,1 до 2 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело имеет аффинность к человеческому SIRPA с КД, которая, по меньшей мере, 2-кратно, по меньшей мере, 3-кратно, по меньшей мере, 4-кратно, по меньшей мере, 5-кратно, по меньшей мере, 6-кратно, по меньшей мере, 7-кратно, по меньшей мере, 8-кратно, по меньшей мере, 9-кратно или по меньшей мере, 10-кратно ниже, чем аффинность к человеческому SIRPA анти-SIRPA ан-

титела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 5.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA *in vitro* с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC50) от около 0,05 до 2 нМ или от около 0,4 до 0,5 нМ, по данным проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA *in vitro* с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC50) от около 0,05 до 0,20 нМ для человеческого SIRPA v1, от около 0,05 до 0,10 нМ для человеческого SIRPA v2, и/или от около 0,05 до 1 нМ для SIRPA яванского макака, по данным проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело связывается с D3 доменом человеческого SIRPA v1 из SEQ ID №: 1.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело связывается с аминокислотными остатками R282, Q284 и G337 человеческого SIRPA v1 из SEQ ID №: 1.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело повышает фагоцитоз опухолевых клеток в макрофагах, повышает фагоцитоз раковых клеток в M1 макрофагах, повышает фагоцитоз раковых клеток в M2 макрофагах, отрицательно регулирует CD14 экспрессию в макрофагах, и/или любое их сочетание.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело улучшает пролиферацию Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело блокирует взаимодействие или связывание SIRPA с поверхностно-активным белком D (SP-D).

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело не блокирует взаимодействие или связывание SIRPA с CD47.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело отрицательно регулирует поверхностноклеточную экспрессию CD32A/B.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело отрицательно регулирует поверхностноклеточную экспрессию CD14.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело улучшает пролиферацию Т-клеток без блокирования взаимодействия SIRP γ и CD47.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело стимулирует образование ROS в моноцитах и/или повышает экспрессию IL-8 в моноцитах.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело ингибирует рост опухоли *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело снижает количество CD14⁺ миелоидных клеток в периферической крови и/или повышает количество CD14⁺ миелоидных клеток в опухоли.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с

человеческим SIRPA, где антитело связывает человеческий SIRPA, но по существу не блокирует связывание CD47 с SIRPA.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело распознает первый и второй антиген, где первым антигеном является SIRPA и вторым антигеном является:

(a) антиген, способствующий транспорту через гематоэнцефалический барьер;

(b) антиген, способствующий транспорту через гематоэнцефалический барьер, выбранный из трансферринового рецептора (TR), инсулинового рецептора (HIR), рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGFR), белков 1 и 2, связанных с рецептором липопротеинов низкой плотности (LPR-1 и 2) и рецептора дифтерийного токсина;

(c) вызывающий заболевание агент, выбранный из вызывающих заболевание пептидов или белков, вызывающих заболевание нуклеиновых кислот, где вызывающими заболевание нуклеиновыми кислотами являются антисмысловые GGCCC (G2C4) РНК экспансии повторов, вызывающие заболевание белки выбирают из амилоида бета, олигомерного амилоида бета, амилоидных бета бляшек, белка-предшественника амилоида или их фрагментов, Тау, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, FUS белка, C9orf72 (открытая рамка считывания 72 хромосомы 9), с9RAN белка, белка приона, PrPSc, хантингтина, кальцитонина, пероксиддисмутаза, атаксина, атаксина 1, атаксина 2, атаксина 3, атаксина 7, атаксина 8, атаксина 10, телец Леви, предсердного натрийуретического фактора, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида А, медины, пролактина, транстиретины, лизозима, бета 2 микроглобулина, желсолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, S-IBM белка, связанных с повтором не-ATG (RAN) продуктом трансляции, пептида дипептидного повтора (DPR), пептида глицин-аланинового (GA) повтора, пептидов глицин-пролинового (GP) повтора, пептидов глицин-аргининового повтора (GR), пептидов пролин-аланинового (PA) повтора, убиквитина и пептидов пролин-аргининового (PR) повтора; и

(d) лиганды и/или белки, экспрессированные на иммунных клетках, где лиганды и/или белки выбирают из PD1/PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, VTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, CD73 и фосфатидилсерина; и белок, липид, полисахарид или гликолипид, экспрессированный на одной или более опухолевых клетках.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело конъюгировано с пептидом, который способствует транспорту через гематоэнцефалический барьер. В некоторых вариантах осуществления, пептид выбирают из CRM197, домена трансдукции белка, TAT, Syn-B, пенетратина, полиаргининового пептида, ангиопеп пептида и ANG1005.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антителом является опсонизирующее антитело.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антителом является конъюгированное антитело.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело конъюгировано с определяемым маркером, токсином или терапевтическим агентом.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело конъюгировано с токсином, выбранным из рицина, А цепи рицина, доксорубина, даунорубина, майтанзиноида, таксола, бромида этидия, митомицина, этопозида, тенопозида, винкристина, винбластина, колхицина, дигидроксиантрациндина, актиномицина, дифтерийного токсина, экзотоксина *Pseudomonas* (PE) А, PE40, абрина, цепи А абрина, цепи А модела, альфа сарцина, желонина, митогеллина, ретстриктоцина, феномицина, еномицина, курицина, кротина, калихеамицина, ингибитора *Saponaria officinalis*, глюкокортикоида, ауристатины, ауромицина, иттрия, висмута, комбрестатина, дуокармицина, доластатина, сс1065 и цисплатина.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где анти-SIRPA антитело применяют в сочетании с одним или более антителами, которые специфически связывают вызывающий заболевание белок, выбранный из амилоида бета, олигомерного амилоида бета, амилоидных бета бляшек, белка-предшественника амилоида или их фрагментов, Тау, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, FUS белка, C9orf72 (открытая рамка считывания 72 хромосомы 9), с9RAN белка, белка приона, PrPSc, хантингтина, кальцитонина, пероксиддисмутаза, атаксина,

атаксина 1, атаксина 2, атаксина 3, атаксина 7, атаксина 8, атаксина 10, телец Леви, предсердного натрийуретического фактора, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида A, медины, пролактина, транстиретина, лизозима, бета 2 микроглобулина, гелсолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, S-IBM белка, связанных с повтором не-ATG (RAN) продуктом трансляции, пептида дипептидного повтора (DPR), пептида глицин-аланинового (GA) повтора, пептидов глицин-пролинового (GP) повтора, пептидов глицин-аргининового повтора (GR), пептидов пролин-аланинового (PA) повтора, убиквитина и пептидов пролин-аргининового (PR) повтора и любого их сочетания; или с одним или более антителами, которые связывают иммуномодулирующий белок, выбранный из группы, состоящей из: PD1/PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, CD73, TREM1, TREM2, CD33, Siglec-5, Siglec-7, Siglec-9, Siglec-11, фосфатидилсерина, вызывающих заболевание нуклеиновых кислот, антисмысловых GGCCC (G2C4) РНК экспансии повтора и любого их сочетания.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет способ профилактики, снижения риска или лечения рака, где способ включает введение индивиду, нуждающемуся в таковом, терапевтически эффективного количества анти-SIRPA антитела по настоящему изобретению, тем самым обеспечивая лечение рака. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет способ профилактики, снижения риска или лечения индивида, имеющего заболевание, расстройство или повреждение, где заболеванием, расстройством или повреждением является рак, где способ включает введение индивиду терапевтически эффективного количества анти-SIRPA антитела по настоящему изобретению, тем самым предотвращая, снижая риск или обеспечивая лечение индивиду.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет способ лечения рака, где способ включает введение индивиду, нуждающемуся в таковом, терапевтически эффективного количества анти-SIRPA антитела настоящего изобретения, где рак выбран из саркомы, рака мочевого пузыря, рака мозга, рака груди, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, рака почек, рака почечной лоханки, лейкоза, рака легких, мелкоклеточного рака легких, меланомы, лимфомы, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака яичников и фибросаркомы, мультиформной глиобластомы; почечной светлоклеточной карциномы; аденокарциномы легкого; аденокарциномы поджелудочной железы, почечно-клеточного рака, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, медленно растущей В-клеточной лимфомы, агрессивной В-клеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (С-лимфоцитарного лейкоза) хронического миелолейкоза (ХМЛ), множественной миеломы, миелодиспластических синдромов, миелопролиферативных новообразований, инвазивной карциномы молочной железы, плоскоклеточного рака шейки матки, эндоцервикальной аденокарциномы, холангиокарциномы, аденокарциномы толстой кишки, плоскоклеточной карциномы шеи, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, карциномы пищевода, плоскоклеточного рака головы и шеи, хромофобного рака почек, папиллярного рака почки, глиомы низкой степени злокачественности, печеночно-клеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы легкого, мезотелиомы, серозной цистаденокарциномы яичника, аденокарциномы поджелудочной железы, феохромоцитомы и параганглиомы, аденокарциномы простаты, аденокарциномы прямой кишки, кожной меланомы, аденокарциномы желудка, опухолей половых клеток яичек, карциномы щитовидной железы, тимомы, эндометриальной карциномы тела матки, карциносаркомы матки и увеальной меланомы.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет способ лечения рака, где способ включает введение индивиду, нуждающемуся в таковом, терапевтически эффективного количества анти-SIRPA антитела настоящего изобретения, где способ дополнительно включает введение терапевтического агента, который ингибирует PD1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39 или CD73. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, терапевтическим агентом является антитело, которое ингибирует PD1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39 или CD73.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет способ лечения рака, где способ включает введение индивиду, нуждающемуся в таковом, терапевтически эффективного количества анти-SIRPA антитела настоящего изобретения, где способ включает введение индивиду, по меньшей мере, одного антитела, которое специфически связывается с молекулой ингибирующей иммунной контрольной точки,

и/или одной или более стандартной или экспериментальной противораковых терапий. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, по меньшей мере, одно антитело, которое специфически связывается с молекулой ингибирующей иммунной контрольной точки, вводят в сочетании с анти-SIRPA антителом. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, по меньшей мере, одно антитело, которое специфически связывается с молекулой ингибирующей контрольной точки, выбирают из анти-PD-L1 антитела, анти-CTLA4 антитела, анти-PD-L2 антитела, анти-PD-1 антитела, анти-B7-H3 антитела, анти-B7-H4 антитела и анти-HVEM антитела, анти- В- и Т-тимфоцитарного аттенюатора (BTLA) антитела, анти-киллерного ингибирующего рецептора (KIR) антитела, анти-GAL9 антитела, анти-TIM-1 антитела, анти-TIM3 антитела, анти-TIM-4 антитела, анти-A2AR антитела, анти-CD39 антитела, анти-CD73 антитела, анти-LAG-3 антитела, анти-фосфатидилсеринового антитела, анти-CD27 антитела, анти-CD30 антитела, анти-TNF α антитела, анти-CD33 антитела, анти-Siglec-5 антитела, анти-Siglec-7 антитела, анти-Siglec-9 антитела, анти-Siglec-11 антитела, антагонистического анти-TREM1 антитела, антагонистического анти-TREM2 антитела, анти-TIGIT антитела, анти-VISTA антитела, анти-CD2 антитела, анти-CD5 антитела и любое их сочетание.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, одну или более стандартных или экспериментальных противораковых терапий выбирают из радиотерапии, цитотоксической химиотерапии, таргетной терапии, терапии иматинибом, терапии трастузумабом, терапии этанерцептом, терапии адоптивным клеточным переносом (АКП), терапии переносом химерного антигенного рецептора Т-клетки (ХАР-Т), вакцинальной терапии и цитокиновой терапии.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет способ лечения рака, где способ включает введение индивиду, нуждающемуся в таковом, терапевтически эффективного количества анти-SIRPA антитела настоящего изобретения, где способ дополнительно включает введение индивиду, по меньшей мере, одного антитела, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, по меньшей мере, одно антитело, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином, вводят в сочетании с анти-SIRPA антителом. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, по меньшей мере, одно антитело, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином, выбирают из анти-CCL2 антитела, анти-CSF-1 антитела, анти-IL-2 антитела и любого их сочетания.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет способ лечения рака, где способ включает введение индивиду, нуждающемуся в таковом, терапевтически эффективного количества анти-SIRPA антитела настоящего изобретения, где способ дополнительно включает введение индивиду, по меньшей мере, одного агонистического антитела, которое специфически связывается со стимулирующим белком иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, по меньшей мере, одно агонистическое антитело, которое специфически связывается со стимулирующим белком иммунной контрольной точки, вводят в сочетании с анти-SIRPA антителом. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, по меньшей мере, одно агонистическое антитело, которое специфически связывается со стимулирующим белком иммунной контрольной точки, выбирают из агониста анти-CD40 антитела, агониста анти-OX40 антитела, агониста анти-ICOS антитела, агониста анти-CD28 антитела, агонистического анти-TREM1 антитела, агонистического анти-TREM2 антитела, агониста анти-CD137/4-1BB антитела, агониста анти-CD27 антитела, агониста анти-глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка GITR антитела, агониста анти-CD30 антитела, агониста анти-BTLA антитела, агониста анти-HVEM антитела, агониста анти-CD2 антитела, агониста анти-CD5 антитела и любого их сочетания.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет способ лечения рака, где способ включает введение индивиду, нуждающемуся в таковом, терапевтически эффективного количества анти-SIRPA антитела настоящего изобретения, где способ дополнительно включает введение индивиду, по меньшей мере, одного стимулирующего цитокина. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один стимулирующий цитокин выбирают из IFN- α 4, IFN- β , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, CRP, членов семейства IL-20, LIF, IFN- γ , OSM, CNTF, GM-CSF, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, CXCL10, IL-33, MCP-1, MIP-1-бета и любое их сочетание.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение представляет выделенную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую анти-SIRPA антитело настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение представляет вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность нуклеи-

новых кислот, кодирующую анти-SIRPA антитело настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение представляет выделенную клетку-хозяина, содержащую вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую анти-SIRPA антитело настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение представляет способ получения антитела, которое связывается с человеческим SIRPA, где способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую анти-SIRPA антитело настоящего изобретения, так, что получают антитело. Данное изобретение также представляет восстановление антитела, произведенного клеткой.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение представляет фармацевтическую композицию, содержащую анти-SIRPA антитело настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 - выравниваемый участок аминокислотной последовательности внеклеточных доменов человеческого SIRPA варианта 1 и SIRPA белков из разных видов. Записанные процент идентичности демонстрирует высокую гомологию во внеклеточной области. Номера доступа: P78324 (человеческий SIRPA вариант 1), XP015313153 (яванский макак), JAB51896 (мартышка), G1U015 (кролик) и XP005634938 (собака). На фиг. 1 описаны SEQ ID №№ 59-63, соответственно, в порядке появления.

На фиг. 2A перечислены потенциальные гуманизированные последовательности варибельного домена тяжелой цепи анти-SIRPA антитела 3F9. Гуманизированная последовательность основана на IGHV3-23*01 акцепторном каркасном участке и IGHJ4*01 соединительной области. На фиг. 2A раскрыты SEQ ID №№ 64-65, 2, 64 и 3-4, соответственно, в порядке появления. На фиг. 2B перечислены потенциальные гуманизированные последовательности варибельного домена легкой цепи анти-SIRPA антитела 3F9. На фиг. 2B раскрыты SEQ ID №№ 66-67, 5, 66 и 68-70, соответственно, в порядке появления.

На фиг. 3 представлены данные, показывающие медиированную антителом отрицательную регуляцию SIRPA на первичных человеческих макрофагах посредством мышинных и гуманизированных анти-SIRPA 3F9 антител.

На фиг. 4A представлены данные, показывающие зависимость медиированной антителом отрицательной регуляции рецептора от N-связанного Fc гликана. На фиг. 4B представлены данные, показывающие зависимость медиированного антителом улучшения фагоцитоза опухолевой клетки от N-связанного Fc гликана.

На фиг. 5A представлены данные, показывающие варианты гуманизированного анти-SIRPA 3F9 IgG4 антитела, которые не смогли вызвать фагоцитоз опухолевых клеток. На фиг. 5B представлены данные, показывающие варианты гуманизированного анти-SIRPA 3F9 IgG4 антитела, которые не смогли отрицательно отрегулировать экспрессию CD14 на макрофагах.

На фиг. 6A показано, что лечение анти-SIRPA антителом 3F9 mIgG1 отрицательно регулирует экспрессию CD32A/B на первичных человеческих макрофагах. На фиг. 6B показано, что лечение анти-SIRPA антителом 3F9 отрицательно регулирует экспрессию CD32A и CD32B на первичных человеческих макрофагах.

На фиг. 7A представлены данные, показывающие, что блокада CD32A/B ингибирует медиированную анти-SIRPA антителом 3F9 отрицательную регуляцию SIRPA на первичных человеческих макрофагах. На фиг. 7B представлены данные, показывающие то, что блокада CD32A/B ингибирует вызванное анти-SIRPA антителом 3F9 улучшение фагоцитоза опухолевых клеток.

На фиг. 8 представлены данные, показывающие, что аллотип CD32A влияет на медиированную анти-SIRPA антителом 3F9 отрицательную регуляцию SIRPA. На фиг. 8A показано, что доноры 507 и 508 являются CD32A-R/H131 гетерозиготными; на фиг. 8B показано, что доноры 516 и 517 являются CD32A-H/H131 гомозиготными.

На фиг. 9A, 9B представлены данные, показывающие, что медиированная антителом отрицательная регуляция рецептора приводит к разложению SIRPA. На фиг. 9A, 5, 10 и 20 мкг лизата цельных клеток загружают в SDS-PAGE и подвергают иммуноблоттингу с анти-SIRPA цитоплазматическим доменом (a-SIRPAct). На фиг. 9B 20 мкг лизата цельных клеток загружают в SDS-PAGE, зондируют с a-SIRPAct и анти-SHP2.

На фиг. 10A, 10B представлены данные сравнения улучшения активности фагоцитов разных вариантов Fc анти-SIRPA антитела 3F9-22. На фиг. 10A первичные человеческие макрофаги обрабатывают анти-SIRPA 3F9-22 антителом на диком типе человеческого IgG1 скелета или на человеческом IgG1, несущем S267E/L328F Fc мутации или на антителе изотипического контроля. На фиг. 10B первичные человеческие макрофаги обрабатывают анти-SIRPA 3F9-22 антителом на человеческом IgG1 скелете, несущем S267E/L328F или A330S/P331S Fc мутации на антителе изотипического контроля.

На фиг. 11A, 11B представлены данные сравнения активности фагоцитов разных вариантов Fc анти-SIRPA 3F9-22 антитела по отношению к анти-CD47 на M1 (фиг. 11B) и M2 (фиг. 11A) макрофагах.

На фиг. 12A и фиг. 12B представлены данные, показывающие, что обработанные анти-SIRPA анти-

телом 3F9-22 макрофаги снижают жизнеспособность клеток солидной опухоли *in vitro*.

На фиг. 13А представлены данные сравнения улучшения пролиферации Т-клетки разными вариантами Fc анти-SIRPA антитела 3F9-22 в 2-факторном MLR анализе. На фиг. 13В представлены данные сравнения улучшения пролиферации Т-клетки разными вариантами Fc анти-SIRPA антитела 3F9-22 и анти-SIRPA антитела 3F9-14 по сравнению с анти-CD47 IgG4 в 2-факторном MLR анализе.

На фиг. 14А представлены данные сравнения улучшения пролиферации Т-клетки разными вариантами Fc анти-SIRPA антитела 3F9-22 относительно анти-CD47 IgG4 в 1-факторном MLR анализе. На фиг. 14В показан типовой график СКАФ из 1-факторного MLR анализа.

На фиг. 15А и фиг. 15В представлены данные сравнения улучшения выделения TNF разными вариантами Fc анти-SIRPA антитела 3F9-22 LPS-примированными макрофагами.

На фиг. 16 представлены данные, показывающие идентификацию и визуализацию "критических" остатков для анти-SIRPA антитела в модели человеческого SIRPA.

На фиг. 17А-17С представлены данные, показывающие действие анти-SIRPA антитела 3F9-22 на ингибирование роста опухоли в сочетании с анти-PD-L1 антителом в синергетической модели карциномы толстой кишки мыши. На фиг. 17А представлены гистограммы СКАФ, показывающие экспрессию мышинового CD47 (верхняя панель) и человеческого CD47 (нижняя панель) в диких и сконструированных колониях клеток MC38. На фиг. 17В представлены данные, показывающие кривые среднего роста опухоли у huSIRPA/huCD47 ВАС трансгенных мышей, которым подкожно имплантированы MC38 клетки, сконструированные для лишения экспрессии мышинового CD47, и которые сверхэкспрессируют человеческий CD47 (MC38-mCD47KO/huCD47+). На фиг. 17С представлены линейные графики каждого отдельного животного в каждой группе лечения с фиг. 17В.

На фиг. 18А, 18В представлены данные, показывающие кинетику медирированной антителом отрицательной регуляции SIRPA в миелоидных клетках имеющих опухоль ВАС трансгенных мышей, леченных повышающимися дозами анти-SIRPA антитела настоящего изобретения. На фиг. 18А представлены данные, показывающие относительное изменение в экспрессии SIRPA с течением времени на инфильтрирующих опухоль миелоидных клетках. На фиг. 18В представлены данные, показывающие относительное изменение экспрессии SIRPA с течением времени на миелоидные клетки селезенки.

На фиг. 19А показаны условия лечения в исследовании медирированной анти-SIRPA антителом отрицательной регуляции SIRPA у гуманизированных NOG-EXL мышей, имеющих А375 опухоли. На фиг. 19В представлены данные, показывающие уровень экспрессии SIRPA на человеческих опухолевых макрофагах как значения СКП (левая панель) или нормализованные значения (правая панель), связанные с лечением анти-SIRPA антителами настоящего изобретения.

На фиг. 20А, 20В показаны уровни экспрессии маркеров М1 макрофагов HLA-DR/MHC класса 2 (фиг. 20А) и CD86 (фиг. 20В) на человеческие опухолевые макрофаги, выделенные из гуманизированных NOG-EXL мышей, имеющих А375 опухоли, после лечения анти-SIRPA антителами настоящего изобретения. На фиг. 20А и фиг. 20В представлены данные, показывающие экспрессию HLA-DR/MHC класса 2 и CD86, соответственно, в виде значений СКП (левые панели) или в виде нормализованных значений (правые панели).

На фиг. 21А, 21В показана отрицательная регуляция человеческого SIRPA в селезеночных моноцитах (фиг. 21А) и моноцитах периферической крови (фиг. 21В), выделенных у гуманизированных NOG-EXL мышей, имеющих А375 опухоли, связанные с введением анти-SIRPA антител настоящего изобретения. На фиг. 21А и фиг. 21В представлены данные, показывающие экспрессию человеческого SIRPA в виде значений СКП (левые панели) или в виде нормализованных значений (правые панели).

На фиг. 22 представлены данные, показывающие медирированную антителом отрицательную регуляцию SIRPA на первичных человеческих макрофагах различными вариантами Fc анти-SIRPA 3F9-22 антител.

На фиг. 23 представлены данные сравнения улучшения активности фагоцитов различных вариантов Fc анти-SIRPA антитела 3F9-22 по сравнению с анти-CD47-блокирующими антителами.

На фиг. 24 представлены данные, показывающие количество красных кровяных клеток и тромбоцитов у яванских макаков, которым вводили контрольное IgG антитело, анти-SIRPA антитело 3F9-22 PS, анти-SIRPA антитело 3F9-22 IgG4, анти-SIRPA антитело 3F9-IgG2 и анти-SIRPA антитело 3F9-22 NSLF.

Следует понимать, что одно, некоторые или все свойства различных вариантов осуществления, описанных в данном документе, могут быть объединены для формирования других вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти и другие аспекты изобретения станут очевидными для специалиста в данной области. Эти и другие варианты осуществления изобретения дополнительно описаны в подробном описании, которое следует ниже.

Подробное описание

Данное изобретение относится к анти-SIRPA антителам (например, моноклональным антителам); способам получения и применения таких антител; фармацевтическим композициям, содержащим такие антитела; нуклеиновым кислотам, кодирующим такие антитела; и клеткам-хозяевам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела.

Методы и процедуры, описанные или упомянутые в данном документе, обычно хорошо понятны и

обычно используются специалистами в данной области с применением традиционной методологии, такой как, например, широко применяемой методологии, описанной в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); серии *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual and Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); и *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

1. Определения.

Термины "SIRPα" или "SIRPα полипептид" или "SIRPA" или "SIRPA полипептид", применяемые здесь взаимозаменяемо, относятся в данном документе к любому природному SIRPA из любого позвоночного источника, включая млекопитающих, таких как приматы (например, человек и яванские макаки) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иначе. В некоторых вариантах осуществления, термин охватывает как последовательности дикого типа, так и существующие в природе варианты последовательности, например, сплайс-варианты или аллельные варианты. В некоторых вариантах осуществления, термин охватывает "полноразмерный" необработанный SIRPA, а также любую форму SIRPA, которую получают при обработке в клетке. В некоторых вариантах осуществления, SIRPA является человеческим SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, последовательностью аминокислот типового SIRPA является Uniprot под № доступа P78324 от 25 апреля 2018. В некоторых вариантах осуществления, последовательностью аминокислот типового человеческого SIRPA v1 является SEQ ID №: 1. В некоторых вариантах осуществления, последовательностью аминокислот типового человеческого SIRPA v2 является GenBank CAA71403.

Термины "анти-SIRPA антитело", "антитело которое связывается с SIRPA" и "антитело, которое специфически связывает SIRPA" относятся к антителу, которое способно связывать SIRPA с достаточной аффинностью так, что антитело становится полезным в качестве диагностического и/или терапевтического агента при нацеливании на SIRPA. В одном варианте осуществления, степень связывания анти-SIRPA антитела с не родственным, не-SIRPA полипептидом составляет менее чем около 10% от связывания антитела с SIRPA по данным, например, радиоиммунного анализа (РИА). В определенных вариантах осуществления, антитело, которое связывается с SIRPA, имеет константу диссоциации (КД) <1 мкМ, <100 нМ, <10 нМ, <1 нМ, <0,1 нМ, <0,01 нМ или <0,001 нМ (например, 10^{-8} М или менее, например от 10^{-8} до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} до 10^{-13} М). В определенных вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело связывается с эпитопом SIRPA, который является консервативным среди SIRPA от разных видов.

Что касается связывания антитела с целевой молекулой, термин "специфическое связывание" или "специфически связывается" или является "специфическим для" конкретного полипептида или эпитопа на конкретной полипептидной цели означает связывание, которое заметно отличается от не специфического взаимодействия. Специфическое связывание может быть измерено, например, посредством определения связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы. Например, специфическое связывание может быть определено конкуренцией с контрольной молекулой, которая подобна цели, например, избытком не меченой цели. В этом случае, специфическое связывание отмечается, если связывание меченой цели с пробой конкурентно ингибируется избытком не меченой цели. Термин "специфическое связывание" или "специфически связывается с" или является "специфическим для" конкретного полипептида или эпитопа на конкретной полипептидной цели, в контексте данного документа, может быть показан, например, молекулой, имеющей КД для цели около любого 10^{-4} или ниже, 10^{-5} или ниже, 10^{-6} или ниже, 10^{-7} или ниже, 10^{-8} или ниже, 10^{-9} или ниже, 10^{-10} или ниже, 10^{-11} или ниже, 10^{-12} М или ниже, или КД в интервале от 10^{-4} до 10^{-6} М или от 10^{-6} до 10^{-10} М или от 10^{-7} до 10^{-9} М. Как будет понятно квалифицированному специалисту, аффинность и значения КД обратно связаны. Высокая аффинность для антигена измеряется низким значением КД. В одном варианте осуществления, термин "специфическое связывание" относится к связыванию, где молекула связывается с конкретным полипептидом или эпитопом конкретного полипептида без существенного связывания с любым другим полипептидом или полипептидным эпитопом.

Термин "иммуноглобулин" (Ig) применяется взаимозаменяемо с "антителом" в данном документе.

Термин "антитело" в данном документе применяется в широчайшем смысле и специально охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), включая те, которые получены из, по меньшей мере, двух интактных антител и фрагментов антитела настолько, насколько они демонстрируют желаемую биологическую активность.

"Нативными антителами" обычно являются гетеротетрамерными гликопротеинами около 150000 Дальтонов, состоящими из двух идентичных легких ("L") цепей и двух идентичных тяжелых ("H") цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как множество дисульфидных связей варьируются среди тяжелых цепей разных изоформ иммуноглобулина. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет равномерно расположенные межцепные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце переменный домен (V_H), за которым следует множество постоянных доменов. Каждая легкая цепь имеет переменный домен на одном конце (V_L) и постоянный домен на другом конце; постоянный домен легкой цепи совпадает с первым постоянным доменом тяжелой цепи, и переменный домен легкой цепи совпадает с переменным доменом тяжелой цепи. Полагают, что конкретные аминокислотные остатки формируют интерфейс между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

Структура и свойства разных классов антител представлены, например, в *Basic and Clinical Immunology*, 8th Ed., Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, страница 71 и глава 6.

Легкая цепь от любого позвоночного вида может быть отнесена к одному из двух четко различимых видов, названных каппа ("κ") и лямбда ("λ"), на основе аминокислотных последовательностей их постоянных доменов. В зависимости от последовательности аминокислот постоянного домена их тяжелых цепей (СН), иммуноглобулины могут быть отнесены к разным классам или изоформам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющих тяжелые цепи, обозначенные альфа ("α"), дельта ("δ"), эпсилон ("ε"), гамма ("γ") и мю ("μ"), соответственно, γ и α классы далее делятся на подклассы (изоформы) на основе относительно незначительной разницы в последовательности и функциях СН, например, человек экспрессирует следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Подъединичные структуры и трехмерные конфигурации разных классов иммуноглобулинов хорошо известны и описаны в общем, например, в Abbas et al., *Cellular and Molecular Immunology*, 4th ed. (W.B. Saunders Co., 2000).

"Переменная область" или "переменный домен" антитела, такого как анти-SIRPA антитело настоящего изобретения, относится к амино-концевым доменам тяжелой и легкой цепи антитела. Переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи могут быть обозначены как " V_H " и " V_L ", соответственно. Эти домены обычно являются наиболее переменными частями антитела (относительно других антител того же класса) и содержат антигенсвязывающие сайты.

Термин "переменный" относится к тому факту, что определенные сегменты переменных доменов значительно различаются по последовательности среди антител, таких как анти-SIRPA антитела настоящего изобретения. Переменный домен медирует антигенное связывание и определяет специфичность конкретного антитела к его конкретному антигену. Однако переменность не распределена равномерно по всей длине переменных доменов. Наоборот, она сконцентрирована в трех сегментах, называемых гиперпеременные области (HVRs) в переменных доменах и легкой цепи и тяжелой цепи. Более консервативные части переменных доменов называют каркасными областями (КО). Каждый из переменных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре КО области, в основном принимающих конфигурацию бета-пласта, соединенных тремя HVR, которые образуют петли, соединяющие, и в некоторых случаях, образующие часть структуры бета-пласта. HVR в каждой цепи держатся вместе в непосредственной близости КО областями и, с HVR из другой цепи, способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Постоянные домены не вовлечены непосредственно в связывание антитела с антигеном, но демонстрирует разные эффекторные функции, такие как участие антитела в антитело-зависимой клеточной токсичности.

Термин "моноклональное антитело" в контексте данного документа относится к антителу, такому как моноклональное анти-SIRPA антитело настоящего изобретения, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е., отдельные антител, составляющие популяцию, идентичны за исключением возможных существующих в природе мутаций и/или пост-трансляционных модификаций (например, изомеризаций, амидирований и т.д.), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела является высоко специфическими, будучи направленными против одного антигенного сайта. В отличие от препаратов поликлонального антитела, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. В дополнение к их специфичности, моноклональные антитела являются преимущественными в том, что они синтезированы культурой гибридомы, без примеси других иммуноглобулинов. Модификатор "моноклональное" означает характер антитела, как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и не должен быть истолкован как требующий

получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, применяемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены множеством методов, включая, например, метод гибридомы, методы рекомбинантной ДНК и методики получения человеческих или подобных человеческим антител у животных, которые имеют часть или все человеческие иммуноглобулиновые локусы или гены, кодирующие последовательность человеческого иммуноглобулина. Например, моноклональные антитела, применяемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены множеством методик, включая, например, технологии фагового дисплея (см., например, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-472 (2004); and Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), метод гибридомы (например, Kohler and Milstein., *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongoet al., *Hybridoma*, 14 (3):253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2d ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), методы рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4,816,567), технологии дрожжевого презентирования (см., например, WO 2009/036379A2; WO 2010105256; WO 2012009568 и Xu et al., *Protein Eng. Des. Sel.*, 26(10): 663-70 (2013) и методики получения человеческих и подобных человеческим антител у животных, которые имеют части или все человеческие иммуноглобулиновые локусы или гены, кодирующие последовательности человеческого иммуноглобулина (см., например, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); патенты США №№ 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; и 5,661,016; Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996); и Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995).

Термины "полноразмерное антитело", "интактное антитело" или "цельное антитело" применяют взаимозаменяемо для обозначения антитела, такого как анти-SIRPA антитело настоящего изобретения, в его по существу нетронутой форме, в отличие от фрагмента антитела. Специфически, цельные антитела включают антитела с тяжелыми и легкими цепями, включающими Fc область. Постоянные домены могут быть постоянными доменами нативной последовательности (например, постоянные домены человеческой нативной последовательности) или их варианты аминокислотной последовательности. В некоторых случаях, интактное антитело может иметь одну или более эффекторных функций.

"Фрагменты антитела" относятся к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связано интактное антитело. Примеры фрагментов антитела включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv фрагменты; диатела; линейные антитела (см. патент США № 5641870, пример 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 (1995)); молекулы одноцепочечного антитела и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антитела.

Папаиновый перевар антител, таких как анти-SIRPA антитела настоящего изобретения, дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых "Fab" фрагментами, и остаточный "Fc" фрагмент, где обозначение отражает способность к легкой кристаллизации. Fab фрагмент состоит из полной легкой цепи вместе с доменом варибельной области тяжелой цепи (V_H) и первого постоянного домена одной тяжелой цепи (C_{H1}). Каждый Fab фрагмент является одновалентным относительно антигенного связывания, т.е., он имеет один антигенсвязывающий сайт. Пепсиновая обработка антитела дает один большой F(ab')₂ фрагмент, который примерно соответствует двум связанным дисульфидом Fab фрагментам, имеющим разную антигенсвязывающую активность, а также способны к перекрестному связыванию антигена. Fab' фрагменты отличаются от Fab фрагментов тем, что имеют несколько дополнительных остатков на карбокси окончании C_{H1} домена, включающих один или более цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH является обозначением для Fab', в котором цистеиновые остатки постоянных доменов несут три тиольные группы. F(ab')₂ фрагменты антитела изначально получают как пары Fab' фрагментов, которые имеют шарнирные цистеины между ними. Другие химические сочетания фрагментов антитела также известны.

Fc фрагмент содержит карбокси-концевые части обеих тяжелых цепей, которые держатся вместе дисульфидами. Эффекторные функции антител определяются последовательностями в Fc области, область, которая также распознается Fc рецепторами (FcR) найдена на определенных типах клеток.

"Функциональные фрагменты" антител, таких как анти-SIRPA антитела настоящего изобретения, содержат часть интактного антитела, обычно включающую антигенсвязывающую или варибельную область интактного антитела, или Fc область антитела, которое сохраняет или имеет модифицированную способность к FcR связыванию. Примеры фрагментов антитела включают линейное антитело, молекулы одноцепочечного антитела и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Термин "диатела" относится к маленькому фрагменту антитела, полученному конструированием sFv фрагментов (см. предшествующий параграф) с короткими линкерами (около 5-10 остатков) между V_H и V_L доменами так, что достигается межцепочечное, а не внутрицепочечное спаривание варибельных доменов, тем самым получая двухвалентный фрагмент, т.е. фрагмент, имеющий два антигенсвязывающих сайта.

вающих сайта. Биспецифические диатела являются гетеродимерами двух "кроссоверных" sFv фрагментов, в которых V_H и V_L домены двух антител присутствуют на разных полипептидных цепях.

В контексте данного документа, "химерное антитело" относится к антителу (иммуноглобулину), такому как химерное анти-SIRPA антитело настоящего изобретения, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи идентичная или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретных видов, или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антитела, а остаток цепь(ей) идентичны или гомологичны соответствующим последовательностям в антителах, полученных из других видов, или принадлежащих другому классу или подклассу антитела, а также фрагментах таких антител, пока они демонстрируют желаемую биологическую активность. Представляющие интерес химерные антитела включают PRIMATIZED® антитела, где антигенсвязывающую область антитела получают из антитела, полученного, например, иммунизацией макака представляющим интерес антигеном. В контексте данного документа, "гуманизованное антитело" применяют как подвид "химерного антитела".

"Гуманизованные" формы не-человеческих (например, мышинных) антител, такие как гуманизованные формы анти-SIRPA антител настоящего изобретения, являются химерными антителами, содержащими аминокислотные остатки из не-человеческих HVR и аминокислотные остатки из человеческих КО. В определенных вариантах осуществления, гуманизованное антитело будет содержать по существу все из, по меньшей мере, одного и, обычно, двух переменных доменов, в которых все или по существу все HVR (например, ОК) соответствуют им же не-человеческого антитела, и все или по существу все КО соответствуют им же человеческого антитела. Гуманизованное антитело необязательно может содержать, по меньшей мере, часть постоянной области антитела, полученного из человеческого антитела. "Гуманизованная форма" антитела, например, не-человеческого антитела, относится к антителу, которое прошло гуманизацию.

"Человеческим антителом" является такое, которое обладает аминокислотной последовательностью, соответствующей последовательности антитела, такого как анти-SIRPA антитело настоящего изобретения, произведенное человеком и/или полученное с применением любой методики для получения человеческого антитела, как раскрыто здесь. Это определение человеческого антитела намеренно исключает гуманизованное антитело, содержащее не-человеческие антигенсвязывающие остатки. Человеческие антитела могут быть получены с применением разных методик, известных в данной области техники, включая фаг-дисплейные библиотеки и дрожжи-дисплейные библиотеки. Человеческие антитела могут быть получены введением антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для вырабатывания таких антител в ответ на провокацию антигеном, но эндогенные локусы которого были отключены, например, иммунизированной ксеномыши, а также созданы посредством технологии человеческой В-клеточной гибридомы. Человеческие антитела могут быть получены с применением разных методик, известных в данной области техники, включая фаг-дисплейные библиотеки. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Также доступны для приготовления человеческих моноклональных антител способы, описанные у Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Смотрите также van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001). Человеческие антитела могут быть получены введением антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для вырабатывания таких антител в ответ на провокацию антигеном, но эндогенные локусы которого были отключены, например, иммунизированной ксеномыши (см., например, патенты США №№ 6,075,181 и 6,150,584 относительно технологии XENOMOUSE™). Смотрите также, например, Li et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) относительно человеческих антител, созданных посредством технологии человеческой В-клеточной гибридомы. Альтернативно, человеческие антитела также могут быть получены с применением дрожжевых библиотек

и способов, описанных в, например, WO 2009/036379A2; WO 2010105256; WO 2012009568; и Xu et al., *Protein Eng. Des. Sel.*, 26(10): 663-70 (2013).

Термин "гипервариабельная область", "HVR" или "HV" при применении в данном документе относится к областям переменного домена антитела, такого как анти-SIRPA антитело настоящего изобретения, которые гипервариабельны в последовательности и/или образуют структурно определенные петли. Обычно антитела содержат шесть HVR; три в V_H (H1, H2, H3) и три в V_L (L1, L2, L3). В нативных антителах, H3 и L3 демонстрируют наибольшее разнообразие шести HVR, и считается, что H3, в частности, играет уникальную роль в придании высокой специфичности антителам. Существующие в природе камелидные антитела, состоящие из только тяжелой цепи, являются функциональными и стабильными в отсутствие легкой цепи.

Множество HVR трансдифференцировок используются и охватываются здесь. В некоторых вариантах осуществления, HVR могут быть областями, определяющими комплементарность Кэбота (ОКО) на основе вариабельности последовательности, и наиболее часто используются (Kabat et al., *supra*). В некоторых вариантах осуществления, HVR могут быть Чотиа ОК. Чотиа вместо этого относится к расположению структурных петель (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). В некоторых вариантах осуществления, HVR могут быть AbM HVR. AbM HVR представляют компромисс между Кэбот ОК и

Чотиа структурными петлями и применяются в программе моделирования AbM антител Oxford Molecular's. В некоторых вариантах осуществления, HVR могут быть "контактными" HVR. "Контактные" HVR основаны на анализе доступных сложных кристаллических структур. Остатки из каждой из этих HVR указаны ниже.

Петля	Кэбот	AbM	Чотиа	Контактные
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (нумерация Кэбота)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (нумерация Чотиа)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

HVR могут содержать "растянутые HVR" следующим образом: 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 или 89-96 (L3) в VL и 26-35 (H1), 50-65 или 49-65 (предпочтительный вариант осуществления) (H2) и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3) в VH. Остатки варибельного домена пронумерованы согласно Kabat et al., supra для каждого из этих определений растянутого HVR.

"Каркасными" или "КО" остатками являются такие остатки варибельного домена, которые отличаются от HVR остатков, как определено в данном документе.

Фраза "нумерация остатков варибельного домена по EU или Кэботу" или [0076] "нумерация положений аминокислоты по EU или Кэботу" и ее варианты относятся к

системе нумерации, применяемой для варибельных доменов тяжелой цепи или варибельных доменов легкой цепи компиляции антител в EU или по Kabat et al., supra. С применением этой системы нумерации, актуальная линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество или дополнительные аминокислоты, соответствующие сокращению или вставке в КО или HVR варибельного домена. Например, тяжелая цепь варибельного домена может включать одну аминокислотную вставку (остаток 52a по Кэботу) после остатка 52 H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c, и т.д. по Кэботу) после остатка 82 тяжелой цепи КО. Нумерация остатков по EU или Кэботу может быть определена для данного антитела выравниванием в областях гомологии последовательности антитела со "стандартной" нумерацией последовательности по Кэботу.

Нумерацию системы по EU и Кэботу обычно применяют при обращении к остатку в [0077] варибельном домене (приблизительно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "Система нумерации по EU или Кэботу" или "индекс EU" обычно применяют в отношении остатка в постоянной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU, описанный у Kabat et al., supra). "Индекс EU как у Кэбота" относится к нумерации остатков человеческого IgG1 EU антитела. Если не указано здесь иначе, ссылки на номера остатков в варибельном домене антител означает нумерацию остатков по системе нумерации Кэбота. Если не указано здесь иначе, ссылки на номера остатков в постоянном домене антитела означает нумерацию остатков по системе нумерации EU или Кэбота (например, см. публикацию патента США № 2010-280227).

"Акцепторным человеческим каркасным участком" в контексте данного документа является каркасный участок, содержащий V_L или V_H каркасный участок последовательности аминокислот получают из каркасного участка человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусного каркасного участка. Акцепторный человеческий каркасный участок "полученный из" каркасного участка человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусного каркасного участка может содержать ту же его аминокислотную последовательность, или может содержать уже существующие изменения аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, количество уже существующих изменений аминокислот составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее. Если уже существующие изменения аминокислот присутствуют в VH, предпочтительно, такие изменения возникают только в трех, двух или одном положении 71H, 73H и 78H; например, аминокислотными остатками в этих положениях могут быть 71A, 73T и/или 78A. В одном варианте осуществления, V_L акцепторный человеческий каркасный участок идентичен в последовательности V_L последовательности каркасного участка человеческого иммуноглобулина или последовательности человеческого консенсусного каркасного участка.

"Человеческим консенсусным каркасным участком" является каркасный участок, который представляет наиболее часто существующие аминокислотные остатки в селекции человеческих V_L или V_H последовательностей каркасного участка иммуноглобулина. В общем, селекция V_L или V_H последовательностей человеческого иммуноглобулина происходит из подгруппы последовательностей варибельного домена. В общем, подгруппой последовательностей является подгруппа как в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Например, для V_L , подгруппой может быть подгруппа каппа I, каппа II, каппа III или каппа

IV как в Kabat et al., supra. Дополнительно, для V_H , подгруппой может быть подгруппа I, подгруппа II или подгруппа III как в Kabat et al., supra.

"Модификация аминокислоты" в определенном положении, например, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения, относится к замещению или делеции определенного остатка или вставке, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка, соседнего к определенному остатку. Вставка "соседняя" к определенному остатку означает вставку в пределах одного или двух остатков. Вставка может быть N-концевой или C-концевой к определенному остатку. Предпочтительной модификацией аминокислоты здесь является замещение.

"Аффинно-зрелым" антителом, таким как аффинно-зрелое анти-SIRPA антитело настоящего изобретения, является антитело с одним или более изменениями его HVR, которые дают улучшение аффинности антитела к антигену, по сравнению с исходным антителом, которое не обладает такими изменениями. В одном варианте осуществления, аффинно зрелое антитело имеет наномолярные или даже пиколярные аффинности для целевого антигена. Аффинно-зрелые антитела получают методиками, известными в данной области техники. Например, Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) описывает созревание аффинности посредством перестановки V_H - и V_L -домена. Рандомный мутагенез HVR и/или остатков каркасного участка описан у, например: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al. *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); и Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

"Fv" является минимальным фрагментом антитела, который содержит полный сайт антигенного распознавания и связывания. Этот фрагмент состоит из димера одного домена варибельной области тяжелой и легкой цепи в тесной не ковалентной ассоциации. Из складывания этих двух доменов получается шесть гиперварибельных петель (3 петли из каждой, H и L цепей), которые используют аминокислотные остатки для антигенного связывания и придают антигенсвязывающую специфичность антителу. Однако даже один варибельный домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфических для антигена) имеет способность распознавать и связывать антиген, хотя с более низкой аффинностью, чем полный связывающий сайт.

"Одноцепочечными Fv" также называемыми "sFv" или "scFv", являются фрагменты антител, которые содержат V_H и V_L домены антитела, соединенные в одну полипептидную цепь. Предпочтительно, sFv полипептид дополнительно содержит полипептидный линкер между V_H и V_L доменами, которые позволяют sFv формировать желаемую структуру для антигенного связывания.

"Эффекторные функции" антитела относятся к биологической активности, присущей Fc области (нативной последовательности Fc области или вариантной аминокислотной последовательности Fc области) антитела и варьируются в зависимости от изоформа антитела.

Термин "Fc область" в данном документе применяют для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая Fc области с нативной последовательностью и варианты Fc области. Хотя границы Fc области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, тяжелую цепь Fc области человеческого IgG обычно определяют как вытянутую от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230, до его карбоксильного окончания. C-концевой лизин (остаток 447 согласно системе нумерации EU) Fc области может быть удален, например, во время получения или очистки антитела или рекомбинантным конструированием нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Следовательно, композиция интактного антитела может содержать популяции антитела со всеми удаленными K447 остатками, популяции антитела с отсутствием K447 остатков и популяции антитела, имеющей смесь антител с или без K447 остатка. Подходящие Fc области с нативной последовательностью для применения в антителах настоящего изобретения включают человеческий IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

"Нативная последовательность Fc области" содержит последовательность аминокислот, идентичную последовательности аминокислот Fc области, найденной в природе. Нативная последовательность человеческих Fc областей включает нативную последовательность Fc области человеческого IgG1 (не-A и A аллотипы); нативную последовательность Fc области человеческого IgG2; нативную последовательность Fc области человеческого IgG3; и нативную последовательность Fc области человеческого IgG4, а также их вариантов, существующих в природе.

"Вариантная Fc область" содержит последовательность аминокислот, которая отличается от нативной последовательности Fc области благодаря, по меньшей мере, одной модификации аминокислоты, предпочтительно, одному или более замещениями аминокислоты. Предпочтительно, вариантная Fc область имеет, по меньшей мере, одно замещение аминокислоты по сравнению с нативной последовательностью Fc области или с Fc областью исходного полипептида, например, от около одного до около десяти аминокислотных замещений и, предпочтительно, от около одной до около пяти аминокислотных замещений в нативной последовательности Fc области, или в Fc области исходного полипептида. Вариантная Fc область в данном документе предпочтительно имеет, по меньшей мере, около 80% гомологию с нативной последовательностью Fc области и/или с Fc областью исходного полипептида, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, около 90% гомологию с ними, более предпочтительно, по меньшей мере, около 95% гомологию с ними.

"Fc рецептор" или "FcR" описывает рецептор, который связывается с Fc областью антитела. Пред-

почтительным FcR является нативная последовательность человеческого FcR. Более того, предпочтительный FcR является таким, который связывает IgG антитело (гамма рецептор) и включает рецепторы подклассов Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов, Fc γ RII рецепторы включают Fc γ RIIA ("активирующий рецептор") и Fc γ RIIB ("ингибирующий рецептор"), которые имеют одинаковые аминокислотные последовательности, которые отличаются в первую очередь их цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор Fc γ RIIA содержит иммунорецепторный тирозиновый активационный мотив ("ИТАМ") в его цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор Fc γ RIIB содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив ("ИТИМ") в его цитоплазматическом домене. Другие FcRs, включая те, которые будут идентифицированы в будущем, охватываются термином "FcR" в данном документе. FcR также могут повышать период полужизни антител в сыворотке.

Связывание с FcRn *in vivo* и период полужизни в сыворотке человеческих FcRn высокоаффинных связывающих полипептидов может анализироваться, например, у трансгенных мышей или в трансфицированных человеческих колониях клеток, экспрессирующих человеческий FcRn, или у приматов, которым введены полипептиды, имеющие вариантную Fc область. В WO 2004/42072 (Presta) описаны варианты антитела с улучшенным или ухудшенным связыванием с FcRs. Смотрите также, например, Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

В контексте данного документа, "процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" и "гомология" по отношению к последовательности пептида, полипептида или антитела, относится к проценту аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которая идентична аминокислотным остаткам в определенной последовательности пептида или полипептида, после выравнивания последовательностей и вводящих гэпов, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательности и не рассматривая любые консервативные замещения как часть идентичности последовательности. Выравнивание для целей определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными путями, которые находятся в пределах компетенции в данной области техники, например, с применением общедоступных компьютерных программ, таких как BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGN™ (DNASTAR). Специалист в данной области техники сможет определить подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, известные в данной области техники, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Термин "конкурировать" при применении в контексте антител (например, нейтрализующих антител), которые конкурируют за один и тот же эпитоп, означает конкуренцию между антителом по данным анализа, в котором тестируемое антитело предотвращает или ингибирует (например, снижает) специфическое связывание сылочной молекулы (например, лиганда или сылочного антитела) с общим антигеном (например, SIRPA или его фрагментом). Множество типов анализов конкурентного связывания может применяться для определения того, конкурирует ли антитело с другим, например: твердофазный прямой или косвенный радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или косвенный ферментный иммуноанализ (ФИА), конкурентный сэндвич-анализ (см., например, Stahl et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); твердофазный прямой биотин-авидиновый ФИА (см., например, Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619), твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (см., например, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный РИА с прямым мечением с применением 1-125 метки (см., например, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15); твердофазный прямой биотин-авидиновый ФИА (см., например, Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552); и РИА с прямым мечением (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82). Обычно такой анализ включает применение очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью или клетками, несущими любой из не меченного тестируемого антитела и меченого сылочного антитела. Конкурентное ингибирование измеряют через определение количества меток, связанных с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого антитела. Обычно тестируемое антитело присутствует в избытке. Антитела, идентифицированные конкурентным анализом (конкурирующие антитела) включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и сылочное антитело, и антитела, связывающиеся с соседним эпитопом, достаточно близким к эпитопу, связанному сылочным антителом для возникновения пространственного затруднения. Дополнительные подробности, относящиеся к способам определения конкурентного связывания, представлены в данном документе. Обычно, если конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно будет ингибировать (например, снижать) специфическое связывание сылочного антитела с общим антигеном на, по меньшей мере, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97,5 и/или около 100%.

В контексте данного документа, "взаимодействие" между SIRPA полипептидом и вторым полипептидом охватывает, без ограничений, взаимодействие белок-белок, физическое взаимодействие, химическое взаимодействие, связывание, ковалентное связывание и ионное связывание. В контексте данного документа, антитело "ингибирует взаимодействие" между двумя полипептидами, если антитело разрывает, снижает или полностью исключает взаимодействие между двумя полипептидами. Антитело настоя-

шего изобретения "ингибирует взаимодействие" между двумя полипептидами, если антитело связывается с одним из двух полипептидов. В некоторых вариантах осуществления, взаимодействие может быть ингибировано на, по меньшей мере, около любого из 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97,5 и/или около 100%.

Термин "эпитоп" включает любую детерминанту, способную быть связанной антителом. Эпитоп является областью антигена, которая связана антителом, которое поражает этот антиген, и если антигеном является полипептид, включает определенные аминокислоты, которые непосредственно контактируют с антителом. Наиболее часто, эпитопы расположены на полипептидах, но в некоторых случаях, могут быть расположены на других типах молекул, таких как нуклеиновые кислоты. Эпитопные детерминанты могут включать химически активные поверхностные группировки молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахара, фосфорильные или сульфонильные группы, и могут иметь определенные трехмерные структурные характеристики, и/или определенные характеристики заряда. Обычно, антитела, специфические для конкретного целевого антигена, будут преимущественно распознавать эпитоп на целевом антигене в сложной смеси полипептидов и/или макромолекул.

"Агонистическим" антителом или "активирующим" антителом является антитело, которое вызывает (например, повышает) одну или более активностей или функций антигена после связывания антитела с антигеном.

"Антагонистическим" антителом или "блокирующим" антителом или "ингибирующим" антителом является антитело, которое снижает, ингибирует и/или исключает (например, снижает) антигенное связывание одного или более лигандов после связывания антитела с антигеном, и/или снижает, ингибирует и/или исключает (например, снижает) одну или более активностей или функций антигена после связывания антитела с антигеном. В некоторых вариантах осуществления, антагонистические антитела или блокирующие антитела или ингибирующие антитела по существу или полностью ингибируют антигенное связывание с одним или более лигандами и/или одну или более активностей или функций антигена.

"Выделенным" антителом, таким как выделенное анти-SIRPA антитело настоящего изобретения, является такое, которое было идентифицировано, отделено и/или восстановлено из компонента его продуктивной среды (например, природно или рекомбинантно). Предпочтительно, выделенное антитело не имеет ассоциации со всеми другими контаминантными компонентами из его продуктивной среды. Контаминантные компоненты из его продуктивной среды, являются продуктами, которые обычно будут вмешиваться в исследовательское, диагностическое или терапевтическое применение антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или не белковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления, антитело будет очищено: (1) до более чем 95% массовых антитела по данным, например, метода Лоури, и в некоторых вариантах осуществления, до более чем 99% массовых; (2) до степени, достаточной для получения, по меньшей мере, 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности посредством применения секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) гомогенности с применением SDS-PAGE в не восстанавливающих или восстанавливающих условиях с применением кумасси синего или, предпочтительно, серебрянки. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в пределах рекомбинантных Т-клеток так как, по меньшей мере, один компонент природной среды антитела не будет присутствовать. Обычно, однако, выделенный полипептид или антитело будет получено с применением, по меньшей мере, одной стадии очистки.

"Выделенной" молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, такое как анти-SIRPA антитело настоящего изобретения, является молекула нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена из, по меньшей мере, одной контаминантной молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно ассоциирована в окружающей среде, в которой ее получают. Предпочтительно, выделенная нуклеиновая кислота не имеет ассоциации со всеми компонентами, ассоциированными с продуктивной средой. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды и антитела в данном документе, имеют форму, отличную от формы или набора, в котором они находятся в природе. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты поэтому отличаются от нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды и антитела в данном документе, существующие в клетках в природе.

Термин "вектор" в контексте данного документа относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой он связан. Одним типом вектора является "плазмида", которая относится к кольцевой двухцепочечной ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является фаговый вектор. Другим типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальное происхождение репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, не эписомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина и, тем самым, реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, определенные векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе "рекомбинантные векторы экспрессии" или просто "векторы экспрессии". В общем, векторы экспрессии, применяемые в методах рекомбинантной ДНК, часто имеют форму плазмид. В настоящем описании, "плазмида" и "вектор" могут применять-

ся взаимозаменяемо, так как плаزمид является наиболее часто используемой формой вектора.

"Полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота", применяемые здесь взаимозаменяемо, относятся к полимерам нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотидами могут быть дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания, и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть введен в полимер посредством ДНК или РНК полимеразы или посредством синтетической реакции.

"Клетка-хозяин" включает отдельную клетку или клеточную культуру, которая может быть или является реципиентом для вектора(ов) для введения полинуклеотидных вставок. Клетки-хозяева включают потомство одной клетки-хозяина, и потомство не обязательно может быть полностью идентичным (по морфологии или в комплементе геномной ДНК) с оригинальной исходной клеткой благодаря природной, случайной или преднамеренной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные *in vivo* полинуклеотидом(ами) настоящего изобретения.

"Носители" в контексте данного документа включают фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы, которые нетоксичны для клетки или млекопитающего, подвергающегося их воздействию в используемых дозировках и концентрациях. Часто физиологически приемлемым носителем является водный рН-буферный раствор. Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярный (менее около 10 остатков) полипептид; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и PLURONICS™.

В контексте данного документа, термин "профилактика" включает обеспечение профилактики в отношении возникновения или рецидива конкретного заболевания, расстройства или состояния у индивида. Индивид может быть предрасположен к, быть восприимчив к конкретному заболеванию, расстройству или состоянию, или быть подверженным риску развития такого заболевания, расстройства или состояния, но еще не иметь диагностированного заболевания, расстройства или состояния.

В контексте данного документа, индивид "подверженный риску" развития конкретного заболевания, расстройства или состояния может иметь или не иметь выявляемое заболевание или симптомы заболевания и может проявлять или не проявлять выявляемое заболевание или симптомы заболевания до способов лечения, описанных в настоящем документе. "Подверженность риску" означает, что у человека есть один или несколько факторов риска, которые являются измеряемыми параметрами, которые коррелируют с развитием конкретного заболевания, расстройства или состояния, как известно в данной области. Индивид, имеющий один или несколько из этих факторов риска, имеет более высокую вероятность развития конкретного заболевания, расстройства или состояния, чем индивид без одного или нескольких из этих факторов риска.

В контексте данного документа, термин "лечение" относится к клиническому вмешательству, предназначенному для изменения естественного курса индивида, подвергающегося лечению, в течение курса клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают снижение скорости прогрессирования, улучшение или смягчение патологического состояния и ремиссию или улучшение прогноза конкретного заболевания, расстройства или состояния. Индивида успешно "лечат", например, если один или несколько симптомов, связанных с конкретным заболеванием, расстройством или состоянием, смягчены или устранены.

"Эффективное количество" относится к, по меньшей мере, количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата. Эффективное количество может быть обеспечено за одно или несколько введений. Эффективное количество в данном документе может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и вес индивида и способность лечения вызывать желаемый ответ у индивида. Эффективным количеством также является количество, в котором любой токсичный или вредный эффекты лечения перевешиваются терапевтически полезными эффектами. Для профилактического использования полезные или желаемые результаты включают такие результаты, как устранение или снижение риска, уменьшение тяжести или отсрочка начала заболевания, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, проявляющиеся во время развития болезни. Для терапевтического использования полезные или желаемые результаты включают клинические результаты, такие как уменьшение одного или нескольких симптомов, вызванных заболеванием, повышение качества жизни людей, страдающих этим заболеванием, снижение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, усиление эффекта другого лекарственного средства, например, через нацеливание, замедление прогрессирования заболевания и/или продление выживаемости. Эффективное количество лекарственного

средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для осуществления профилактического или терапевтического лечения прямо или косвенно. Как понимается в клиническом контексте, эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может быть достигнуто или не достигнуто в сочетании с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, "эффективное количество" можно рассматривать в контексте введения одного или нескольких терапевтических агентов, и можно считать, что один агент вводится в эффективном количестве, если в сочетании с одним или несколькими другими агентами может быть достигнут или уже достигнут желаемый результат.

"Индивид" в целях лечения, профилактики или снижения риска относится к любому животному, классифицированному как млекопитающее, в том числе человеку, домашним и сельскохозяйственным животным и животным из зоопарка, спортивным или питомцам, таким как собаки, лошади, кролики, крупный рогатый скот, свиньи, хомяки, песчанки, мыши, хорьки, крысы, кошки и подобные. В некоторых вариантах осуществления, индивидом является человек.

В контексте данного документа, введение "в сочетании" с другим соединением или композицией включает одновременное введение и/или введение в разное время. Введение в сочетании также охватывает введение в виде совместного состава или введение в виде отдельных композиций, в том числе с разными частотами или интервалами дозирования и с использованием одного и того же пути введения или разных путей введения. В некоторых вариантах осуществления, введением в сочетании является введение как часть одной и той же схемы лечения.

Термин "около" в контексте данного документа относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известному специалисту в данной области техники. Ссылка на "около" значения или параметра в данном документе включает (и описывает) варианты, которые связаны с этим значением или параметром *per se*.

В контексте данного документа и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа "a", "an" и "the" включают ссылку во множественном числе, если контекст явно не указывает иное. Например, ссылка на "антитело" представляет собой ссылку на от одного до многих антител, таких как молярные количества и включает их эквиваленты, известные специалистам в данной области, и так далее.

Понятно, что аспект и варианты осуществления настоящего изобретения, описанные здесь, включают "содержащие", "состоящие из" и "состоящие по существу из" аспектов и вариантов осуществления.

Анти-SIRPA антитела.

Анти-SIRPA антителосвязывающие области.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения могут связывать конформационный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения могут связывать прерывистый SIRPA эпитоп. В некоторых вариантах осуществления, прерывистый SIRPA эпитоп содержит два или более пептидов, три или более пептидов, четыре или более пептидов, пять или более пептидов, шесть или более пептидов, семь или более пептидов, восемь или более пептидов, девять или более пептидов или 10 или более пептидов. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения могут связывать SIRPA эпитоп, содержащий один или более пептидов. Как раскрыто в данном документе, SIRPA эпитопы могут содержать один или более пептидов, содержащих пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, 10 или более, 11 или более, 12 или более, 13 или более 14 или более, 15 или более, 16 или более, 17 или более, 18 или более, 19 или более или 20 или более аминокислотных остатков последовательности аминокислот SEQ ID №: 1 или пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, 10 или более, 11 или более, 12 или более, 13 или более 14 или более, 15 или более, 16 или более, 17 или более, 18 или более, 19 или более или 20 или более аминокислотных остатков на SIRPA белке млекопитающих, соответствующем последовательности аминокислот SEQ ID №: 1.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения связываются с эпитопом человеческого SIRPA, который является таким же или перекрывается с SIRPA эпитопом, связанным анти-SIRPA антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 5, анти-SIRPA антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 6, анти-SIRPA антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 7, анти-SIRPA антителом, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 8, анти-SIRPA антителом, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 4, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 6, анти-SIRPA антителом, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 4, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 7, или анти-SIRPA антите-

четания. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения конкурирует с одним или более антителами, выбранными из m3F9, h3F9 H1/L1 (14,70,1), h3F9 H1/L2 (14,70,2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14,70,4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25 и любого их сочетания, за связывание с SIRPA, когда анти-SIRPA антитело снижает связывание одного или более антител, выбранных из m3F9, h3F9 H1/L1 (14,70,1), h3F9 H1/L2 (14,70,2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14,70,4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25 и любого их сочетания, с SIRPA на количество в интервале от около 50 до 100%, по сравнению со связыванием с SIRPA в отсутствие анти-SIRPA антитела. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения конкурирует с одним или более антителами, выбранными из m3F9, h3F9 H1/L1 (14,70,1), h3F9 H1/L2 (14,70,2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14,70,4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25 и любого их сочетания за связывание с SIRPA, когда анти-SIRPA антитело снижает связывание одного или более антител, выбранных из m3F9, h3F9 H1/L1 (14,70,1), h3F9 H1/L2 (14,70,2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14,70,4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25 и любого их сочетания с SIRPA на, по меньшей мере, 50, по меньшей мере, 55, на, по меньшей мере, 60, по меньшей мере, 65, по меньшей мере, 70, по меньшей мере, 75, по меньшей мере, 80, по меньшей мере, 85, по меньшей мере, 90, по меньшей мере, 95 или 100%, по сравнению со связыванием с SIRPA в отсутствие анти-SIRPA антитела. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения, которое снижает связывание одного или более антител, выбранных из m3F9, h3F9 H1/L1 (14,70,1), h3F9 H1/L2 (14,70,2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14,70,4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25 и любого их сочетания, с SIRPA на 100% показывает, что анти-SIRPA антитело практически полностью блокирует связывание одного или более антител, выбранных из m3F9, h3F9 H1/L1 (14,70,1), h3F9 H1/L2 (14,70,2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14,70,4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25 и любого их сочетания, с SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело и одно или более антител, выбранных из m3F9, h3F9 H1/L1 (14,70,1), h3F9 H1/L2 (14,70,2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14,70,4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25 и любого их сочетания, присутствуют в количестве, которое соответствует 10:1 отношению, 9:1 отношению, 8:1 отношению, 7:1 отношению, 6:1 отношению, 5:1 отношению, 4:1 отношению, 3:1 отношению, 2:1 отношению, 1:1 отношению, 0,75:1 отношению, 0,5:1 отношению, 0,25:1 отношению, 0,1:1 отношению, 0,075:1 отношению, 0,050:1 отношению, 0,025:1 отношению, 0,01:1 отношению, 0,0075: отношению, 0,0050:1 отношению, 0,0025:1 отношению, 0,001: отношению, 0,00075:1 отношению, 0,00050:1 отношению, 0,00025:1 отношению, 0,0001: отношению, 1:10 отношению, 1:9 отношению, 1:8 отношению, 1:7 отношению, 1:6 отношению, 1:5 отношению, 1:4 отношению, 1:3 отношению, 1:2 отношению, 1:0,75 отношению, 1:0,5 отношению, 1:0,25 отношению, 1:0,1 отношению, 1:0,075 отношению, 1:0,050 отношению, 1:0,025 отношению, 1:0,01 отношению, 1:0,0075 отношению, 1:0,0050 отношению, 1:0,0025 отношению, 1:0,001 отношению, 1:0,00075 отношению, 1:0,00050 отношению, 1:0,00025 отношению или 1:0,0001 отношению анти-SIRPA антитела к одному или более антителам, выбранным из m3F9, h3F9 H1/L1 (14,70,1), h3F9 H1/L2 (14,70,2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14,70,4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25 и любого их сочетания. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело присутствует в избытке в количестве, которое варьируется от около 1,5-кратного до 100-кратного или более чем 100-кратного по сравнению с количеством одного или более антител, выбранных из m3F9, h3F9 H1/L1 (14,70,1), h3F9 H1/L2 (14,70,2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14,70,4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25 и любого их сочетания. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело присутствует в количестве, которое составляет около 2-кратный, 3-кратный, 4-кратный, 5-кратный, 6-кратный, 7-кратный, 8-кратный, 9-кратный, 10-кратный, 15-кратный, 20-кратный, 25-кратный, 30-кратный, 35-кратный, 40-кратный, 45-кратный, 50-кратный, 55-кратный, 60-кратный, 65-кратный, 70-кратный, 75-кратный, 80-кратный, 85-кратный, 90-кратный, 95-кратный или 100-кратный избыток по сравнению с количеством одного или более антител, выбранных из m3F9, h3F9 H1/L1 (14,70,1), h3F9 H1/L2 (14,70,2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14,70,4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18,

3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25 и любого их сочетания.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения связываются с эпитопом человеческого SIRPA, который является таким же или перекрывается с SIRPA эпитопом, связанным, по меньшей мере, одним антителом, выбранным из любого из антител, перечисленных в табл. 4, 5, 7, 8 и 10. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения связываются с эпитопом человеческого SIRPA, который является таким же или перекрывается с SIRPA эпитопом, связанным с, по меньшей мере, одним антителом, выбранным из m3F9, h3F9 H1/L1 (14,70,1), h3F9 H1/L2 (14,70,2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14,70,4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-

12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения связывают преимущественно тот же SIRPA эпитоп, связанный, по меньшей мере, одним антителом, выбранным из любого из антител, перечисленных в табл. 4, 5, 7, 8 и 10. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения связываются преимущественно с тем же SIRPA эпитопом, связанным, по меньшей мере, одним антителом, выбранным из m3F9, h3F9 H1/L1 (14,70,1), h3F9 H1/L2 (14,70,2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14,70,4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25. Подробные типовые способы для картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлены в Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," d Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения конкурируют с одним или более антителами, выбранными из m3F9, h3F9 H1/L1 (14,70,1), h3F9 H1/L2 (14,70,2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14,70,4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25 и любого их сочетания для связывания с SIRPA.

Любой подходящий конкурентный анализ или анализ связывания SIRPA, известный в данной области техники, такой как анализ BIAcore, анализ ELISA или проточная цитометрия, может применяться для определения того, конкурирует ли анти-SIRPA антитело с одним или более антителами, выбранными из m3F9, h3F9 H1/L1 (14,70,1), h3F9 H1/L2 (14,70,2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14,70,4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25 и любого их сочетания для связывания с SIRPA. В типовом конкурентном анализе, иммобилизованный SIRPA или клетки, экспрессирующие SIRPA на поверхности клетки, инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с SIRPA (например, человеческого или не человеческого примата) и второе не меченое антитело, для которого тестируют способность конкурировать с первым антителом за связывание с SIRPA. Второе антитело может присутствовать в надосадочной жидкости гибридомы. В качестве контроля, иммобилизованный SIRPA или клетки, экспрессирующие SIRPA, инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не второе, не меченое антитело. После инкубирования в условиях, позволяющих связывание первого антитела с SIRPA, избыток не связанного антитела удаляют, и измеряют количество меток, ассоциированных с иммобилизованным SIRPA или клетками, экспрессирующими SIRPA. Если количество меток, ассоциированных с иммобилизованным SIRPA или клетками, экспрессирующими SIRPA по существу снижено в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом, это означает, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с SIRPA. См., Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch,14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

В некоторых вариантах осуществления, в данном документе представлены анти-SIRPA антитела, содержащие, по меньшей мере, один, два, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из (a) HVR-H1, содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 20; (b) HVR-H2, содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 21; (c) HVR-H3, содержащего последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID №№: 22, 23 и 24; (d) HVR-L1, содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 9; (e) HVR-L2, содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 10; и (f) HVR-L3, содержащего последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID №№: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 и 19.

В некоторых вариантах осуществления, в данном документе представлены анти-SIRPA антитела, содержащие, по меньшей мере, один, два, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из: (a) HVR-H1, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID №: 20; (b) HVR-H2, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID №: 21; (c) HVR-H3, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID №: 22; (d) HVR-L1, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID №: 9; (e) HVR-L2, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID №: 10; и (f) HVR-L3, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID №: 11; (a) HVR-H1, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID №: 20; (b) HVR-H2, содержащей

33, 34 и 35, содержит замещения (например, консервативные замещения), вставки или делеции относительно ссылочной последовательности, но анти-SIRPA антитело, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с SIRPA. В определенных вариантах осуществления, всего от 1 до 10 аминокислот замещено, вставлено и/или удалено в SEQ ID №: 33, SEQ ID №: 34 или SEQ ID №: 35. В определенных вариантах осуществления, всего от 1 до 5 аминокислот замещено, вставлено и/или удалено в SEQ ID №: 33, SEQ ID №: 34 или SEQ ID №: 35. В определенных вариантах осуществления, замещения, вставки и делеции происходят в областях вне HVR (т.е., в KO). Необязательно, анти-SIRPA антитело содержит V_H последовательность SEQ ID №: 33, SEQ ID №: 34 или SEQ ID №: 35, включая пост-трансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления, V_H содержит одну, две или три HVR, выбранных из: (a) HVR-H1, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID №: 20, (b) HVR-H2, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID №: 21 и (c) HVR-H3, содержащей последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID №№: 22, 23 и 24.

В другом аспекте, представлено анти-SIRPA антитело, где антитело содержит варибельный домен легкой цепи (V_L), имеющий, по меньшей мере, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности к последовательности аминокислот, выбранной из SEQ ID №№: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 и 44. В определенных вариантах осуществления, V_L последовательность, имеющая, по меньшей мере, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность к последовательности аминокислот, выбранной из SEQ ID №№: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 и 44, содержит замещения (например, консервативные замещения), вставки или делеции относительно ссылочной последовательности, но анти-SIRPA антитело, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, всего от 1 до 10 аминокислот замещено, вставлено и/или удалено в SEQ ID №: 36, SEQ ID №: 37, SEQ ID №: 38, SEQ ID №: 39, SEQ ID №: 40, SEQ ID №: 41, SEQ ID №: 42, SEQ ID №: 43 или SEQ ID №: 44. В определенных вариантах осуществления, всего от 1 до 5 аминокислот замещено, вставлено и/или удалено в SEQ ID №: 36, SEQ ID №: 37, SEQ ID №: 38, SEQ ID №: 39, SEQ ID №: 40, SEQ ID №: 41, SEQ ID №: 42, SEQ ID №: 43 или SEQ ID №: 44. В определенных вариантах осуществления, замещения, вставки и делеции происходят в областях вне HVR (т.е., в KO). Необязательно, анти-SIRPA антитело содержит V_L последовательность SEQ ID №: 36, SEQ ID №: 37, SEQ ID №: 38, SEQ ID №: 39, SEQ ID №: 40, SEQ ID №: 41, SEQ ID №: 42, SEQ ID №: 43 или SEQ ID №: 44, включая пост-трансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления, V_L содержит одну, две или три HVR, выбранные из (a) HVR-L1, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID №: 9, (b) HVR-L2, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID №: 10 и (c) HVR-L3, содержащей последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID №№: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 и 19.

В некоторых вариантах осуществления, представлено анти-SIRPA антитело, где антитело содержит V_H как в любом из вариантов осуществления, представленных выше, и V_L как в любом из вариантов осуществления, представленных выше. В некоторых вариантах осуществления, в данном документе представлены анти-SIRPA антитела, где антитело содержит V_H как в любом из вариантов осуществления, представленных выше, и V_L как в любом из вариантов осуществления, представленных выше. В одном варианте осуществления, антитело содержит V_H и V_L последовательности в SEQ ID №№: 33, 34 или 35 и SEQ ID №№: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления, в данном документе представлены анти-SIRPA антитела, содержащие тяжелую цепь варибельного домена (V_H) и варибельный домен легкой цепи (V_L), где V_H и V_L выбирают из группы, состоящей из: V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 33 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 36; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 33 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 37; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 33 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 38; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 33 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 39; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 33 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 40; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 33 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 41; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 33 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 42; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 33 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 43; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 33 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 44; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 34 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 36; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 34 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 38; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 34 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 39; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 34 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 40; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 34 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 41; V_H , содержащего последовательность

аминокислот SEQ ID №: 34 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 42; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 34 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 43; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 34 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 44; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 35 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 36; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 35 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 38; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 35 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 39; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 35 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 40; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 35 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 41; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 35 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 42; V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 35 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 43; и V_H , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 35 и V_L , содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 44.

Дополнительно, в данном документе представлены анти-SIRPA антитела, которые конкурентно ингибируют связывание, и/или конкурируют за связывание с анти-SIRPA антигеном содержащим (a) V_H домен, содержащий (i) HVR-H1, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 20, (ii) HVR-H2, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 21 и (iii) HVR-H3, содержащую последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID №№: 22, 23 и 24 и (b) V_L домен, содержащий (i) HVR-L1, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 9, (ii) HVR-L2, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 10 и (c) HVR-L3, содержащую последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID №№: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 и 19. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит V_H и V_L последовательности в SEQ ID №№: 33, 34 или 35 и SEQ ID №№: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44, соответственно.

В данном документе представлены анти-SIRPA антитела, которые связываются эпитопом человеческого SIRPA, который является таким же или перекрывается с эпитопом, связанным анти-SIRPA антигеном, содержащим (a) V_H домен, содержащий (i) HVR-H1, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 20, (ii) HVR-H2, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 21 и (iii) HVR-H3, содержащую последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID №№: 22, 23 и 24, и (b) V_L домен, содержащий (i) HVR-L1, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 9, (ii) HVR-L2, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 10 и (c) HVR-L3, содержащую последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID №№: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 и 19. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит V_H и V_L последовательности в SEQ ID №№: 33, 34 или 35 и SEQ ID №№: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 и 44, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, эпитоп человеческого SIRPA является тем же эпитопом, который связан анти-SIRPA антигеном.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антигеном согласно любому из вышеуказанных вариантов осуществления является моноклональное антитело, включая гуманизированное и/или человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антигеном является фрагмент антитела, например, Fv, Fab, Fab', scFv, диатело или F(ab')₂ фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антигеном является по существу полноразмерное антитело, например, IgG1 антитело, IgG2a антитело или другой класс или изотип антител, как определено в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело согласно любому из вышеуказанных вариантов осуществления может принимать любую из характеристик, отдельно или в сочетании, как описано в данном документе.

В данном документе представлены анти-SIRPA антитела. Представленные антитела полезны, например, для диагностики или лечения SIRPA медирированных расстройств.

Данное изобретение относится, частично, к анти-SIRPA антителам, которые демонстрируют одну или более улучшенных и/или усиленных функциональных характеристик (например, относительно анти-SIRPA антитела, имеющего переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 2, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 5), включая, например, анти-SIRPA антитела, способные снижать клеточные уровни SIRPA, анти-SIRPA антитела, способные снижать поверхностноклеточные уровни SIRPA, анти-SIRPA антитела, способные разрушать SIRPA, анти-SIRPA антитела, способные снижать клеточные уровни CD32A/B, анти-SIRPA антитела, способные повышать или улучшать фагоцитоз, анти-SIRPA антитела, способные повышать или улучшать фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами, анти-SIRPA антитела, способные повышать или улучшать противоопухолевую активность противораковых терапий, анти-SIRPA антитела, способные повышать или улучшать пролиферацию Т-клетки, анти-SIRPA антитела, способные повышать или улучшать выделение провоспалительного цитокина из макрофагов, и/или анти-SIRPA антитела, способные связывать человеческий SIRPA с улучшенной/усиленной кинетикой; способам получения и применения таких анти-SIRPA антител; фармацевтическим композициям, содержащим такие анти-SIRPA антитела; нуклеиновым кислотам, кодирующим такие анти-SIRPA антитела; и клеткам-хозяевам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие такие анти-SIRPA антитела.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения могут иметь одну или более активностей, которые существуют благодаря, по меньшей мере, частично, способности антител снижать клеточную экспрессию (например, поверхностноклеточную экспрессию) SIRPA, вызывая разрушение, отрицательное регулирование, расщепление, десенсибилизацию рецептора и/или лизосомное поражение SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антителом настоящего изобретения, которое снижает клеточные уровни SIRPA, является антитело, которое демонстрирует одну или более из следующих характеристик: (1) ингибирует или снижает одну или более SIRPA активностей; (2) способность снижать экспрессию SIRPA (такую как на уровне мРНК и/или на уровне белка) в экспрессирующих SIRPA клетках; (3) способность взаимодействовать, связываться или распознавать белок SIRPA; (4) способность специфически взаимодействовать с или связываться с белком SIRPA; и (5) способность лечить, облегчать или предотвращать любой аспект заболевания или расстройства, описанного или рассматриваемого здесь.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела демонстрируют одно или более из следующих свойств: а) имеют константу диссоциации (КД) для человеческого SIRPA, которая ниже таковой для анти-SIRPA антитела, имеющего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 5; б) связываются с человеческими клетками, такими как человеческие моноциты и макрофаги; в) снижают поверхностноклеточные уровни SIRPA (например, снижают поверхностноклеточные уровни SIRPA на человеческих макрофагах *in vitro* с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC50), которая ниже таковой анти-SIRPA антитела, имеющего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 5; д) имеют константу диссоциации (КД) для человеческого SIRPA, которая может варьироваться от около 0,6 до около 0,7 нМ; и/или е) снижают поверхностноклеточные уровни SIRPA (например, снижают поверхностноклеточные уровни SIRPA на человеческих макрофагах *in vitro* с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC50), которая может варьироваться от около 0,4 до около 0,5 нМ. Как описано в данном документе, полумаксимальная эффективная концентрация (EC50) относится к концентрации, при которой анти-SIRPA антитело настоящего изобретения снижает клеточные уровни SIRPA на клетке или в клетке на половину уровня необработанных клеток, или к концентрации, при которой антитело достигает полумаксимального связывания с SIRPA на клетке.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA *in vitro* с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC50) к человеческому SIRPA v1 от около 0,40 нМ до около 0,5 нМ по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA *in vitro* с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC50) к человеческому SIRPA v1 около 5, около 4, около 3, около 2, около 1, около 0,9, около 0,8, около 0,7, около 0,6, около 0,5, около 0,4, около 0,3, около 0,2 или около 0,1 нМ по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA *in vitro* с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC50) к человеческому SIRPA v1 в интервале от около 5 до 1 нМ, от около 1 до 0,9 нМ, от около 1 до 0,8 нМ, от около 1 до 0,7 нМ, от около 1 до 0,6 нМ, от около 1 до 0,5 нМ, от около 1 до 0,4 нМ, от около 1 до 0,3 нМ, от около 1 до 0,2 нМ, от около 1 до 0,1 нМ, от около 0,9 до 0,8 нМ, от около 0,9 до 0,7 нМ, от около 0,9 до 0,6 нМ, от около 0,9 до 0,5 нМ, от около 0,9 до 0,4 нМ, от около 0,9 до 0,3 нМ, от около 0,9 до 0,2 нМ, от около 0,9 до 0,1 нМ, от около 0,8 до 0,6 нМ, от около 0,8 до 0,5 нМ, от около 0,8 до 0,4 нМ, от около 0,8 нМ до 0,3 нМ, от около 0,8 нМ до 0,2 нМ, от около 0,8 нМ до 0,1 нМ, от около 0,7 до 0,5 нМ, от около 0,7 до 0,4 нМ, от около 0,7 до 0,3 нМ, от около 0,7 до 0,2 нМ, от около 0,7 до 0,1 нМ, от около 0,6 до 0,4 нМ, от около 0,6 до 0,3 нМ, от около 0,6 до 0,2 нМ, от около 0,6 до 0,1 нМ, от около 0,5 до 0,3 нМ, от около 0,5 до 0,2 нМ, от около 0,5 до 0,1 нМ, от около 0,4 до 0,2 нМ, от около 0,4 до 0,1 нМ или от около 0,3 до 0,1 нМ по данным проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA *in vitro* с полумаксимальной эффективной концентрации (EC50) к человеческому SIRPA v1 около 0,093 нМ, к человеческому SIRPA v2 около 0,080 нМ, и/или к SIRPA яванского макака около 0,879 нМ по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA *in vitro* с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC50) к человеческому SIRPA v1 или к человеческому SIRPA v2

в интервале от около 2 до 0,05 нМ, от около 1 до 0,05 нМ, от около 0,9 до 0,05 нМ, от около 0,8 до 0,05 нМ, от около 0,7 до 0,05 нМ, от около 0,6 до 0,05 нМ, от около 0,5 до 0,05 нМ, от около 0,4 до 0,05 нМ, от около 0,3 до 0,05 нМ, от около 0,20 до 0,05 нМ, от около 0,15 до 0,05 нМ, от около 0,10 до 0,05 нМ, от около 0,09 до 0,05 нМ, от около 0,08 нМ до 0,05 нМ, от около 0,07 до 0,05 нМ, от около 0,06 до 0,05 нМ, от около 0,20 до 0,06 нМ, от около 0,15 до 0,06 нМ, от около 0,10 до 0,06 нМ, от около 0,09 до 0,06 нМ, от около 0,08 до около 0,06 нМ, от около 0,07 до 0,06 нМ, от около 0,20 до 0,07 нМ, от около 0,15 до 0,07 нМ, от около 0,10 до около 0,07 нМ, от около 0,09 до 0,07 нМ, от около 0,08 до 0,7 нМ, от около 0,20 до 0,08 нМ, от около 0,15 до 0,08 нМ, от около 0,10 до 0,08 нМ, от около 0,09 до 0,08 нМ, от около 0,20 до 0,09 нМ, от около 0,15 до 0,09 нМ или от около 0,10 до 0,9 нМ по данным проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми из вариантов осуществления здесь, настоящее изобретение представляет выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA *in vitro* с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC50) к человеческому SIRPA v1 около 0,107 нМ, к человеческому SIRPA v2 около 0,082 нМ, и/или к SIRPA яванского макака около 0,107 нМ по данным проточной цитометрии.

Предпочтительно, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения снижают поверхностноклеточную экспрессию SIRPA более эффективно (например, с меньшей EC50) по сравнению с контрольным анти-SIRPA антителом (например, контрольным анти-SIRPA антителом, имеющим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 5). Более того, предпочтительно, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения имеют более высокую аффинность (например, вплоть до приблизительно 100-кратно более высокую аффинность) для SIRPA (например, более низкое значение КД по данным поверхностного плазмонного резонанса) по сравнению с контрольным анти-SIRPA антителом (например, контрольным анти-SIRPA антителом, имеющим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 5).

Определенные аспекты настоящего изобретения основаны, по меньшей мере, частично на идентификации анти-SIRPA антител, которые демонстрируют одну или более улучшенных и/или усиленных функциональных характеристик (например, по отношению к анти-SIRPA антителу, имеющему вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 5), включая улучшенную/усиленную способность снижать поверхностноклеточные уровни SIRPA на клетках, приводящую к снижению, нейтрализации, профилактике или контролю одной или более активностей SIRPA, включая, без ограничений, снижение роста моноцитов, макрофагов, Т-клеток, дендритных клеток и/или микроглии; снижение пролиферации Т-клетки, вызванной дендритными клетками, дендритными клетками, полученными из костного мозга, моноцитами, микроглией, M1 микроглией, активированной M1 микроглией, M2 микроглией, макрофагами, M1 макрофагами, активированными M1 макрофагами и/или M2 макрофагами; снижение выживания нейтрофилов, дендритных клеток, дендритных клеток, полученных из костного мозга, макрофагов, M1 макрофагов, активированных M1 макрофагов, M2 макрофагов, моноцитов, остеокластов, Т-клеток, Т-хелперных клеток, цитотоксических Т-клеток, гранулоцитов, микроглии, M1 микроглии, активированной M1 микроглии и/или M2 микроглии; снижение пролиферации нейтрофилов, дендритных клеток, дендритных клеток, полученных из костного мозга, макрофагов, M1 макрофагов, активированных M1 макрофагов, M2 макрофагов, моноцитов, остеокластов, Т-клеток, Т-хелперных клеток, цитотоксических Т-клеток, гранулоцитов, микроглии, M1 микроглии, активированной M1 микроглии и/или M2 микроглии; ингибирование миграции нейтрофилов, дендритных клеток, дендритных клеток, полученных из костного мозга, макрофагов, M1 макрофагов, активированных M1 макрофагов, M2 макрофагов, моноцитов, остеокластов, Т-клеток, Т-хелперных клеток, цитотоксических Т-клеток, гранулоцитов, микроглии, M1 микроглии, активированной M1 микроглии и/или M2 микроглии; снижение одной или более функций нейтрофилов, дендритных клеток, дендритных клеток, полученных из костного мозга, макрофагов, M1 макрофагов, активированных M1 макрофагов, M2 макрофагов, моноцитов, остеокластов, Т-клеток, Т-хелперных клеток, цитотоксических Т-клеток, гранулоцитов, микроглии, M1 микроглии, активированной M1 микроглии и/или M2 микроглии; снижение пролиферации моноцитов, макрофагов, Т-клеток, дендритных клеток, нейтрофилов и/или микроглии; ингибирование положительного иммунного ответа на различные типы рака, выбранного из рака мочевого пузыря, рака мозга, рака груди, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, рака почки, почечно-клеточного рака, рака почечной лоханки, лейкоза, рака легких, меланомы, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака яичников, фибросаркомы и рака щитовидной железы; ингибирование положительного иммунного ответа на различные типы неврологических расстройств, выбранных из деменции, лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, сосудистой деменции, смешанной деменции, болезни Крейтцфельда-Якоба, нормотензивной гидроцефалии, бокового амиотрофического склероза, болезни Хантингтона, таупатии, болезни

Насу-Хакола, инсульта, острой травмы, хронической травмы, эссенциального тремора, болезни Бехчета, болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии, синдрома Шая-Драгера, прогрессирующего надъядерного паралича, кортикально-базальной ганглионарной дегенерации, остро диссеминированного энцефаломиелимита, гранулематозных заболеваний, саркоидоза, болезней пожилого возраста, судорог, повреждения спинного мозга, травматического повреждения мозга, возрастной дегенерации желтого пятна, глаукомы, пигментной дистрофии сетчатки, дегенерации сетчатки и рассеянного склероза; связывание с лигандом SIRPA на опухолевых клетках; связывание с лигандом SIRPA на дендритных клетках, дендритных клетках, полученных из костного мозга, моноцитов, микроглии, Т-клеток, нейтрофилов и/или макрофагов; ингибирование уничтожения опухолевых клеток одной или более из микроглии, макрофагов, дендритных клеток, дендритных клеток, полученных из костного мозга, нейтрофилов, Т-клеток, Т-хелперных клеток или цитотоксических Т-клеток; ингибирование активности пролиферации противоопухолевой клетки одной или более из микроглии, макрофагов, дендритных клеток, дендритных клеток, полученных из костного мозга, нейтрофилов, Т-клеток, Т-хелперных клеток или цитотоксических Т-клеток; ингибирование активности противоопухолевых клеточных метастазов одной или более из микроглии, макрофагов, дендритных клеток, дендритных клеток, полученных из костного мозга, нейтрофилов, Т-клеток, Т-хелперных клеток или цитотоксических Т-клеток; модулированная экспрессия одного или более воспалительных рецепторов, таких как CD86, экспрессированных на одной или более из микроглии, макрофагов, дендритных клеток, дендритных клеток, полученных из костного мозга, нейтрофилов, Т-клеток, Т-хелперных клеток или цитотоксических Т-клеток; улучшение инфильтрации одной или более иммуносупрессорных дендритных клеток, иммуносупрессорных макрофагов, супрессорных клеток, полученных из миелоида, опухоль-ассоциированных макрофагов, иммуносупрессорных нейтрофилов и регуляторных Т-клеток в опухоль; повышение количества способствующих опухоли миелоидных/гранулоцитарных иммуносупрессорных клеток в опухоли, в периферической крови или другом лимфоидном органе; улучшение способствующей опухоли активности полученных из миелоида супрессорных клеток; снижение активации опухоль-специфических Т-лимфоцитов с потенциалом к уничтожению опухоли; снижение инфильтрации опухоль-специфических Т-лимфоцитов с потенциалом к уничтожению опухоли; повышение скорость роста опухоли; повышение степени рецидива опухоли; снижение эффективности одной или более иммунотерапий, которые модулируют ответы противоопухолевых Т-клеток, необязательно, где одной или более иммунотерапиями являются иммунотерапии, таргетированные на один или более белков, выбранных из CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD39, CD70, TREM1, TREM2, Siglec-5, Siglec-7, Siglec-9, Siglec-11, SirpA, CD447, CSF-1 рецептора и любого их сочетания, или одного ли более химиотерапевтических агентов и/или противораковых вакцин.

В некоторых вариантах осуществления, лечение рака анти-SIRPA антителами, как описано в данном документе, может: (i) повысить количество инфильтрующих в опухоль CD3+ Т-клеток; (ii) снизить клеточные уровни SIRPA в не озлокачественных CD14+ миелоидных клетках, необязательно, где не озлокачественные CD14+ миелоидные клетки являются инфильтрующими в опухоль клетками или, необязательно, где не озлокачественные CD14+ миелоидные клетки присутствуют в крови; (iii) снизить количество не озлокачественных CD14+ миелоидных клеток, необязательно, где не озлокачественные CD14+ миелоидные клетки являются инфильтрующими в опухоль клетками или, необязательно, где не озлокачественные CD14+ миелоидные клетки присутствуют в крови; (iv) снизить уровни PD-L1, PD-L2, B7-H7, B7-H3, CD200R, CD163 и/или CD206 в одной или более клетках, необязательно, где одна или более клеток являются не озлокачественными миелоидными супрессорными клетками (МЛСК); (v) снизить скорость роста опухоли при солидных опухолях; (vi) снизить объем опухоли; (vii) повысить эффективность одного или более PD-1 ингибиторов; (viii) повысить эффективность одной или более терапий, ингибирующих иммунную контрольную точку и/или иммуномодулирующих терапий, где одна или более терапий, ингибирующих иммунную контрольную точку и/или иммуномодулирующих терапий таргетирована на один или более из CTL4, аденозинового пути, PD-L1, PD-L2, OX40, TIM3, LAG3 или любого их сочетания; (ix) повысить эффективность одного или более химиотерапевтических агентов, необязательно где одним или более химиотерапевтическими агентами являются гемцитабин, капецитабин, антрациклины, доксорубин (Adriamycin®), эпирубин (Ellence®), таксаны, паклитаксел (Taxol®), доцетаксел (Taxotere®), 5-фторурацил (5-FU), циклофосфамид (Cytoxan®), карбоплатин (Paraplatin®) и любое их сочетание; (x) повысить пролиферацию Т-клеток в присутствии не озлокачественных миелоидных супрессорных клеток (МЛСК); (xi) ингибировать дифференциацию, выживание и/или одну или более функций не озлокачественных миелоидных супрессорных клеток (МЛСК); и (xii) уничтожить CD33-экспрессирующие иммуносупрессорные не озлокачественные миелоидные клетки и/или не озлокачественные CD14-экспрессирующие клетки в солидных опухолях и связанных с ними кровеносных сосудах при конъюгации с химическим или радиоактивным токсином.

В некоторых вариантах осуществления, миелоидные клетки настоящего изобретения включают, без ограничения, CD45+CD14+ миелоидные клетки, CD14+ миелоидные клетки и миелоидные супрессорные

клетки (МЛСК). В некоторых вариантах осуществления, миелоидные клетки настоящего изобретения являются не озлокачественными миелоидными клетками. Иммуносупрессорные клетки иногда также называют миелоидными супрессорными клетками (МЛСК). У человека, МЛСК могут быть определены одним из следующих сочетаний маркеров: (1) CD14+ HLA-DR^{low}/-, (2) CD14+ IL4R α +, (3) CD14+ HLA-DR- IL4R α +, (4) CD34+ CD14+ CD11b+ CD33+, (5) CD11b+ CD14+ CD33+, (6) CD33+ HLA-DR-, (7) Lin- HLA-DR-, (8) Lin- HLA-DR-CD33+, (9) Lin- HLA-DR- CD33+ CD11b+, (10) Lin- CD33+ CD11b+ CD15+, (11) Lin-HLA-DR- CD33+ CD11b+ CD14- CD15+, (12) CD11b+ CD14- CD33+, (13) CD11b+ CD14- HLA-DR- CD33+ CD15+, (14) CD33+ HLA-DR- CD15+, (15) CD15+ IL4R α +, (16) CD11b+ CD15+ CD66b+, (17) CD15+ FSC_{низк}.SSC_{высок}., (18) CD15^{high} CD33+, (19) CD11b+ CD14- CD15+, (20) CD66b+ SSC_{высок} и (21) CD11b+ CD15+ (см. также Solito S et al. Annals of the NY Academy of Sciences, 2014). У мышей, МЛСК могут быть определены экспрессией поверхностных маркеров CD45+, CD11b+, Gr1+ и/или IL4R α +. Дополнительные типовые иммуносупрессорные моноцитные колонии включают CD45+, CD11b+, Gr1^{low}; и CD45+, CD11c+.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA, снижает внутриклеточные уровни SIRPA, снижает общие клеточные уровни SIRPA или любое их сочетание, только в присутствии природных лигандов SIRPA или партнеров по связыванию.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения предотвращает, снижает или ингибирует медиаторную SIRPA активность лиганда SIRPA или партнера по связыванию, включая, например, лиганд SIRPA или партнер по связыванию CD47, поверхностно-активный белок A и/или поверхностно-активный белок D.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения селективно связывается с человеческим SIRPA, включая человеческие аллельные варианты, также называемые здесь "полиморфные" варианты, включая человеческий SIRPA v1 и человеческий SIRPA v2, связывает человеческий SIRP β 3, связывает SIRPA яванского макака и связывает SIRPA мартышки. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения не связывает мышинный SIRPA, не связывается с SIRPB v1 (SIRP β 1), не связывает кроличий SIRPA и не связывает крысиный SIRPA.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения селективно связывается с человеческим SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения селективно связывается с человеческим SIRPA и SIRPA яванского макака. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения связывается с человеческим SIRPA v1, человеческим SIRPA v2 и SIRPA яванского макака. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения связывается с человеческим SIRPA v1, человеческим SIRPA v2 и SIRPA яванского макака, но не связывается с мышинным SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения связывается с человеческим SIRPA v1, человеческим SIRPA v2 и SIRPA яванского макака, но не связывается с SIRP β 1. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения связывается с человеческим SIRPA v1, человеческим SIRPA v2 и SIRPA яванского макака, но не связывается с мышинным SIRPA и не связывается с человеческим SIRP β 1. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения связывается с человеческим SIRPA v1, человеческим SIRPA v2, SIRPA яванского макака и человеческим SIRP β 3, но не связывает мышинный SIRPA и не связывает человеческий SIRP β 1. В любом сочетании вышеуказанных вариантов осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения не блокирует связывание или взаимодействие SIRPA и CD47.

Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к анти-SIRPA антителам, которые отрицательно регулируют, т.е. снижают клеточные уровни SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело снижает клеточные уровни SIRPA без ингибирования, блокирования или снижения взаимодействия (например, связывания) между SIRPA и одним или более лигандами SIRPA, например, CD47.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения могут иметь одну или более активностей, которые возникают, по меньшей мере, частично благодаря способности антител снижать клеточные уровни (например, поверхностноклеточную экспрессию) SIRPA посредством разрушения, отрицательной регуляции, расщепления, десенсибилизации рецептора и/или лизосомного таргетирования SIRPA.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения отрицательно регулирует экспрессию SIRPA в клетках. В некоторых вариантах осуществления, отрицательная регуляция экспрессии SIRPA в клетках снижает поверхностноклеточную экспрессию SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения отрицательно регулирует экспрессию SIRPA в моноцитах (например, человеческих моноцитах). В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения отрицательно регулирует экспрессию SIRPA в макрофагах (например, человеческих макрофагах). В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения отрицательно регулирует поверхностноклеточную экспрессию SIRPA на

макрофаге на более чем 70%, на более чем 75%, на более чем 80%, на более чем 85% или на более чем 95% по сравнению с уровнем поверхностноклеточной экспрессии SIRPA в макрофагах, не обработанных анти-SIRPA антителом настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения отрицательно регулирует поверхностноклеточную экспрессию SIRPA на макрофаге на около 70-90%, на около 70-85%, на около 70-80%, на около 70-75%, на около 75-90%, на около 75-85%, на около 75-80% на около 80-90%, на около 80-85% или на около 85-95% по сравнению с уровнем поверхностноклеточной экспрессии SIRPA в макрофагах, не обработанных анти-SIRPA антителом настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления, макрофагами являются человеческие макрофаги, включающие, но не ограниченные ими, человеческие M1 макрофаги и человеческие M2 макрофаги.

Клеточные уровни SIRPA могут относиться к, без ограничения, поверхностноклеточным уровням SIRPA, внутриклеточным уровням SIRPA и общим уровням SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, снижение клеточных уровней SIRPA включает снижение поверхностноклеточных уровней SIRPA. В контексте данного документа, анти-SIRPA антитело снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA, если оно вызывает снижение на 25% или более поверхностноклеточных уровней SIRPA по данным любых *in vitro* клеточных анализов или подходящей *in vivo* модели, описанной в данном документе или известной в данной области техники, например, по данным проточной цитометрии, такой как сортировка клеток, активированных флуоресценцией (СКАФ), для измерения поверхностноклеточных уровней SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, снижение клеточных уровней SIRPA включает снижение внутриклеточных уровней SIRPA. В контексте данного документа, анти-SIRPA антитело снижает внутриклеточные уровни Siglec-9, если оно вызывает снижение на 25% или более внутриклеточных уровней SIRPA по данным любых *in vitro* клеточных анализов или подходящей *in vivo* модели, описанной в данном документе или известной в данной области техники, например, по данным иммуноокрашивания, вестерн-блоттинга, совместной иммунопреципитации и клеточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления, снижение клеточных уровней SIRPA включает снижение общих уровней SIRPA. В контексте данного документа, анти-SIRPA антитело снижает общие уровни SIRPA, если оно вызывает снижение на 25% или более общих уровней SIRPA по данным любых *in vitro* клеточных анализов или подходящей *in vivo* модели, описанной в данном документе или известной в данной области техники, например, иммуноокрашивания, вестерн-блоттинга, совместной иммунопреципитации и клеточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела вызывают разрушение SIRPA, расщепление SIRPA, интернализацию SIRPA, сбрасывание SIRPA, отрицательную регуляцию SIRPA экспрессии или любое их сочетание. В некоторых вариантах осуществления, клеточные уровни SIRPA измеряют на первичных клетках (например, дендритных клетках, дендритных клетках, полученных из костного мозга, моноцитах, микроглии и макрофагах) или на колониях клеток с применением клеточного анализа SIRPA.

В некоторых вариантах осуществления, отрицательная регуляция анти-SIRPA антитела имеет IC₅₀ 200 нМ или менее, обычно, 100 нМ или менее (отрицательно регулируется 50% SIRPA, экспрессированного на поверхности клетки), через 4 часа обработки человеческих макрофагов антителом при 37°C. В некоторых вариантах осуществления, SIRPA остается отрицательно регулируемым в течение, по меньшей мере, 24 часов обработки антителом настоящего изобретения. Клетки могут быть анализированы на поверхностную экспрессию SIRPA с применением любой методики, например, проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения снижают клеточные уровни SIRPA на, по меньшей мере, 25, по меньшей мере, 26, по меньшей мере, 27, по меньшей мере, 28, по меньшей мере, 29, по меньшей мере, 30, по меньшей мере, 31, по меньшей мере, 32, по меньшей мере, 33, по меньшей мере, 34, по меньшей мере, 35, по меньшей мере, 36, по меньшей мере, 37, по меньшей мере, 38, по меньшей мере, 39, по меньшей мере, 40, по меньшей мере, 41%, по меньшей мере, 42%, по меньшей мере, 43%, по меньшей мере, 44%, по меньшей мере, 45, по меньшей мере, 46, по меньшей мере, 47, по меньшей мере, 48, по меньшей мере, 49, по меньшей мере, 50, по меньшей мере, 51, по меньшей мере, 52, по меньшей мере, 53, по меньшей мере, 54, по меньшей мере, 55, по меньшей мере, 56, по меньшей мере, 57, по меньшей мере, 58, по меньшей мере, 59, по меньшей мере, 60, по меньшей мере, 61, по меньшей мере, 62, по меньшей мере, 63, по меньшей мере, 64, по меньшей мере, 65, по меньшей мере, 66, по меньшей мере, 67, по меньшей мере, 68, по меньшей мере, 69, по меньшей мере, 70, по меньшей мере, 71, по меньшей мере, 72, по меньшей мере, 73, по меньшей мере, 74, по меньшей мере, 75, по меньшей мере, 76, по меньшей мере, 77, по меньшей мере, 78, по меньшей мере, 79, по меньшей мере, 80, по меньшей мере, 81, по меньшей мере, 82, по меньшей мере, 83, по меньшей мере, 84, по меньшей мере, 85, по меньшей мере, 86, по меньшей мере, 87, по меньшей мере, 88, по меньшей мере, 89, по меньшей мере, 90, по меньшей мере, 91, по меньшей мере, 92, по меньшей мере, 93, по меньшей мере, 94, по меньшей мере, 95, по меньшей мере, 96, по меньшей мере, 97, по меньшей мере, 98, по меньшей мере, 99% или более по сравнению с клеточными уровнями SIRPA в отсутствие анти-SIRPA антитела.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любой из активностей отрицательного регулирования, суммированных в предшествующих параграфах, анти-SIRPA антитело

настоящего изобретения ингибирует поверхностноклеточное скопление SIRPA.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения отрицательно регулирует SIRPA, но не блокирует, ингибирует или снижает связывание лиганда SIRPA, например, CD47, с SIRPA. В контексте настоящего изобретения, антитело, направленное против SIRPA, которое не блокирует связывание

CD47 с SIRPA, относится к антителу, которое не вызывает значительное снижение связывания CD47 с SIRPA при инкубировании антитела с CD47 и клетками, экспрессирующими SIRPA. "Значительное снижение" в контексте связывания CD47 с SIRPA относится к снижению связывания на 30% или менее, обычно, по меньшей мере, 25, по меньшей мере, 20, по меньшей мере, 15 или по меньшей мере, 10% или менее по сравнению со связыванием CD47 с SIRPA в присутствии изотипически сходного контрольного антитела, которое не связывает SIRPA. Иллюстративный анализ для оценки блокирующей активности представлен в примерах в данном документе. Например, клетки, которые экспрессируют человеческий SIRPA, например, человеческие макрофаги, или клетки, такие как CHO клетки, которые модифицированы для рекомбинантной экспрессии человеческого SIRPA, высевают в количестве 10 клеток/лунку в 96-луночный планшет, промывают и инкубируют в 100 мкл буфера для сортировки клеток, активированной флуоресценцией, содержащего 1,0 мкг/мл моноклонального антитела или изотипического контроля. Клетки затем промывают и инкубируют с растворимым человеческим CD47 в течение 30 минут на льду. Затем клетки анализируют на поверхностно-связанный CD47.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения отрицательно регулирует экспрессию CD32A/B в клетках (т.е. FcγRIIA/FcγRIIB). В некоторых вариантах осуществления, отрицательная регуляция экспрессии CD32A/B (т.е. FcγRIIA/FcγRIIB) в клетках снижает поверхностноклеточную экспрессию CD32A/B (т.е. FcγRIIA/FcγRIIB). В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения отрицательно регулирует экспрессию CD32A/B в макрофагах (например, человеческих макрофагах). В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRP антитело настоящего изобретения отрицательно регулирует экспрессию CD32A (т.е. FcγRIIA) в макрофагах (например, человеческих макрофагах). В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения отрицательно регулирует экспрессию CD32B (т.е. FcγRIIB) в макрофагах (например, человеческих макрофагах). В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения отрицательно регулирует поверхностноклеточную экспрессию CD32A (т.е. FcγRIIA) в человеческих макрофагах на около 75, на около 80 или на около 85% по сравнению с уровнем поверхностноклеточной экспрессии CD32A в человеческих макрофагах, не обработанных анти-SIRPA антителом настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения отрицательно регулирует поверхностноклеточную экспрессию CD32A в человеческих макрофагах на около 70-85% по сравнению с уровнем поверхностноклеточной экспрессии CD32A в человеческих макрофагах, не обработанных анти-SIRPA антителом настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения отрицательно регулирует поверхностноклеточную экспрессию CD32B (т.е. FcγRIIB) в человеческих макрофагах до неопределяемых уровней.

В одном аспекте, настоящее изобретение представляет антитела, такие как выделенные (например, моноклональные) антитела, которые взаимодействуют с или другим образом связываются с областью, такой как эпитоп, в белке SIRPA настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления, антитела взаимодействуют с или другим образом связываются с областью, такой как эпитоп, в белке SIRPA настоящего изобретения с улучшенной/усиленной кинетикой (например, относительно анти-SIRPA антитела, имеющего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 5). В некоторых вариантах осуществления, антитела взаимодействуют с или другим образом связываются с областью, такой как эпитоп, в белке SIRPA на человеческих клетках, таких как дендритные клетки, миелоидные клетки, моноциты, макрофаги и т.д. с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC₅₀), которая ниже, чем таковая контрольного антитела (например, относительно анти-SIRPA антитела, имеющего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 5). В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения связываются с белком SIRPA и модулируют одну или более активностей SIRPA после связывания с белком SIRPA, например, активность, связанную с экспрессией SIRPA на клетке. Белки SIRPA настоящего изобретения включают, без ограничения, белок SIRPA млекопитающего, человеческий белок SIRPA, мышный белок SIRPA, белок SIRPA яванского макака и крысиный белок SIRPA.

В некоторых вариантах осуществления, антитела настоящего изобретения могут связывать SIRPA pH независимым образом. В некоторых вариантах осуществления, антитела настоящего изобретения могут связываться с SIRPA при нейтральном pH и быть интернализированными без отделения от белка SIRPA. Альтернативно, при кислом pH, антитела настоящего изобретения могут отделяться от SIRPA как только они были интернализированы, и затем разрушаться эндосомным/лизосомным путем. В опреде-

ленных вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело связывает SIRPA при интервалах рН, которые варьируются от 5,5 до 8,0, от 5,5 до 7,5, от 5,5 до 7,0, от 5,5 до 6,5, от 5,5 до 6,0, от 6,0 до 8,0, от 6,5 до 8,0, от 7,0 до 8,0, от 7,5 до 8,0, от 6,0 до 7,5, от 6,0 до 7,0, от 6,5 до 7,5. В определенных вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело отделяется от SIRPA при рН менее чем 6,0, менее чем 5,5, менее чем 5,0, менее чем 4,5, менее чем 4,0, менее чем 3,5, менее чем 3,0, менее чем 2,5 или менее чем 2,0.

SIRPA является белком, пронизывающим мембрану один раз, I типа. В последовательности аминокислот человеческого SIRPA (SEQ ID №: 1), внеклеточный домен расположен на аминокислотных остатках 31-373; трансмембранный домен расположен на аминокислотных остатках 374-394; и внутриклеточный домен расположен на аминокислотных остатках 395-504. Человеческий SIRPA содержит один V-набор и два C1-набора доменов Ig суперсемейства (IgSF), названные D1 домен, D2 домен и D3 домен, соответственно. D1 домен содержит аминокислотные остатки 32-137 человеческого SIRPA; D2 домен содержит аминокислотные остатки 148-247 человеческого SIRPA; и D3 домен содержит аминокислотные остатки 254-348 человеческого SIRPA. Специалист в данной области техники поймет, что начальные и конечные остатки доменов настоящего изобретения могут варьироваться при применении программы компьютерного моделирования или способа, применяемого для определения домена.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения связывается с D3 доменом SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения связывается с D3 доменом человеческого SIRPA, содержащим аминокислотные остатки 254-348 аминокислотной последовательности SEQ ID №: 1 человеческого SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения связывается с эпитопом в D3 домене человеческого SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения связывается с эпитопом в D3 домене человеческого SIRPA, где эпитоп содержит последовательность аминокислот, выбранную из аминокислотных остатков 254-348, аминокислотных остатков 254-274, аминокислотных остатков 264-279, аминокислотных остатков 274-289, аминокислотных остатков 273-331, аминокислотных остатков 281-315, аминокислотных остатков 281-337, аминокислотных остатков 284-299, аминокислотных остатков 294-309, аминокислотных остатков 304-319, аминокислотных остатков 314-329, аминокислотных остатков 324-339 и аминокислотных остатков 334-348 аминокислотной последовательности SEQ ID №: 1 человеческого SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения связывается с эпитопом в D3 домене человеческого SIRPA, где эпитоп включает аминокислотные остатки R282, Q284 и G337 аминокислотной последовательности (SEQ ID №: 1) человеческого SIRPA v1. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения связывается с эпитопом в D3 домене человеческого SIRPA, где эпитоп включает аминокислотные остатки Q281, R282, Q284, L285, W287, R295, E297, V302 и W315 аминокислотной последовательности (SEQ ID №: 1) человеческого SIRPA v1.

В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с D3 доменом SIRPA, например, человеческого SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения связывается с тем же эпитопом SIRPA или частью эпитопа SIRPA, связанного антителом, имеющим ОКО антитела, обозначенного как m3F9, как описано в данном документе. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления, антитело настоящего изобретения связывается с тем же эпитопом SIRPA или частью эпитопа SIRPA, связанного антителом, имеющим ОКО антитела, обозначенного как m3F9, как описано в данном документе.

Определенные аспекты настоящего изобретения основаны, по меньшей мере, частично на идентификации анти-SIRPA антител, которые демонстрируют одну или более улучшенных и/или усиленных функциональных характеристик (например, относительно анти-SIRPA антитела, имеющего варируемую область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 2, и варируемую область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 5), включая улучшенную/усиленную способность снижать поверхностноклеточные уровни SIRPA на клетках, вызывающую снижение, нейтрализацию, профилактику или контроль одной или более активностей SIRPA включающих, без ограничения, снижение роста моноцитов, макрофагов, Т-клеток, дендритных клеток и/или микроглии; снижение пролиферации Т-клетки, вызванной дендритными клетками, дендритными клетками, полученными из костного мозга, моноцитами, микроглией, М1 микроглией, активированной М1 микроглией, М2 микроглией, макрофагами, М1 макрофагами, активированными М1 макрофагами и/или М2 макрофагами; снижение выживания нейтрофилов, дендритных клеток, дендритных клеток, полученных из костного мозга, макрофагов, М1 макрофагов, активированных М1 макрофагов, М2 макрофагов, моноцитов, остеокластов, Т-клеток, Т-хелперных клеток, цитотоксических Т-клеток, гранулоцитов, микроглии, М1 микроглии, активированной М1 микроглии и/или М2 микроглии; снижение пролиферации нейтрофилов, дендритных клеток, дендритных клеток, полученных из костного мозга, макрофагов, М1 макрофагов, активированных М1 макрофагов, М2 макрофагов, моноцитов, остеокластов, Т-клеток, Т-хелперных клеток, цитотоксических Т-клеток, гранулоцитов, микроглии, М1 микроглии, активированной М1 микроглии и/или М2 микроглии; ингибирование миграции нейтрофилов, дендритных клеток, дендритных клеток, полученных из костного мозга, макрофагов, М1 макрофагов, активированных М1 макрофагов, М2 макрофагов, моноцитов, остеокластов, Т-клеток, Т-хелперных клеток, цитотоксических Т-

клеток, гранулоцитов, микроглии, M1 микроглии, активированной M1 микроглии и/или M2 микроглии; снижение одной или более функций нейтрофилов, дендритных клеток, дендритных клеток, полученных из костного мозга, макрофагов, M1 макрофагов, активированных M1 макрофагов, M2 макрофагов, моноцитов, остеокластов, Т-клеток, Т-хелперных клеток, цитотоксических Т-клеток, гранулоцитов, микроглии, M1 микроглии, активированной M1 микроглии и/или M2 микроглии; снижение пролиферации моноцитов, макрофагов, Т-клеток, дендритных клеток, нейтрофилов и/или микроглии; снижение общей функциональности моноцитов, макрофагов, Т-клеток, дендритных клеток, нейтрофилов и/или микроглии; ингибирование положительного иммунного ответа на различные типы рака, выбранного из рака мочевого пузыря, рака мозга, рака груди, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, рака почки, почечно-клеточного рака, рака почечной лоханки, лейкоза, рака легких, меланомы, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака яичников, фибросаркомы и рака щитовидной железы; ингибирование положительного иммунного ответа на различные типы неврологических расстройств, выбранных из деменции, лобно-височной деменции, болезни Крейтцфельда-Якоба, болезни Альцгеймера, сосудистой деменции, смешанной деменции, болезни Крейтцфельда-Якоба, нормотензивной гидроцефалии, бокового амиотрофического склероза, болезни Хантингтона, таупатии, болезни Насу-Хакола, инсульта, острой травмы, хронической травмы, эссенциального тремора, болезни Бехчета, болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии, синдрома Шая-Драгера, прогрессирующего надъядерного паралича, кортикально-базальной ганглионарной дегенерации, острого диссеминированного энцефаломиелимита, гранулематозных заболеваний, саркоидоза, болезней пожилого возраста, судорог, повреждения спинного мозга, травматического повреждения мозга, возрастной дегенерации желтого пятна, глаукомы, пигментной дистрофии сетчатки, дегенерации сетчатки и рассеянного склероза; связывание с лигандом SIRPA на опухолевых клетках; связывание с лигандом SIRPA на дендритных клетках, дендритных клетках, полученных из костного мозга, моноцитов, микроглии, Т-клеток, нейтрофилов и/или макрофагов; ингибирование уничтожения опухолевых клеток одной или более из микроглии, макрофагов, дендритных клеток, дендритных клеток, полученных из костного мозга, нейтрофилов, Т-клеток, Т-хелперных клеток или цитотоксических Т-клеток; ингибирование активности пролиферации противоопухолевой клетки одной или более из микроглии, макрофагов, дендритных клеток, дендритных клеток, полученных из костного мозга, нейтрофилов, Т-клеток, Т-хелперных клеток или цитотоксических Т-клеток; ингибирование активности противоопухолевых клеточных метастазов одной или более из микроглии, макрофагов, дендритных клеток, дендритных клеток, полученных из костного мозга, нейтрофилов, Т-клеток, Т-хелперных клеток или цитотоксических Т-клеток; модулированная экспрессия одного или более воспалительных рецепторов, таких как CD86, экспрессированных на одной или более из микроглии, макрофагов, дендритных клеток, дендритных клеток, полученных из костного мозга, нейтрофилов, Т-клеток, Т-хелперных клеток или цитотоксических Т-клеток; улучшение инфильтрации одной или более иммуносупрессорных дендритных клеток, иммуносупрессорных макрофагов, супрессорных клеток, полученных из миелоида, опухоль-ассоциированных макрофагов, иммуносупрессорных нейтрофилов и регуляторных Т-клеток в опухоль; повышение количества способствующих опухоли миелоидных/гранулоцитарных иммуносупрессорных клеток в опухоли, в периферической крови или другом лимфоидном органе; улучшение способствующей опухоли активности полученных из миелоида супрессорных клеток; снижение активации опухоль-специфических Т-лимфоцитов с потенциалом к уничтожению опухоли; снижение инфильтрации опухоль-специфических Т-лимфоцитов с потенциалом к уничтожению опухоли; повышение скорость роста опухоли; повышение степени рецидива опухоли; снижение эффективности одной или более иммунотерапий, которые модулируют ответы противоопухолевых Т-клеток, необязательно, где одной или более иммунотерапиями являются иммунотерапии, таргетированные на один или более белков, выбранных из CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD39, CD70, TREM1, TREM2, Siglec-5, Siglec-7, Siglec-9, Siglec-11, SirpA, CD447, CSF-1 рецептора и любого их сочетания, или одного ли более химиотерапевтических агентов и/или противораковых вакцин.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из других вариантов осуществления выше, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения вызывает, улучшает или повышает одну или более активностей, включающих: (i) повышение количества инфильтрующих в опухоль CD3+ Т-клеток; (ii) снижение клеточных уровней SIRPA в не озлокачествленных CD14+ миелоидных клетках, необязательно, где не озлокачествленные CD14+ миелоидные клетки являются инфильтрующими в опухоль клетками или, необязательно, где не озлокачествленные CD14+ миелоидные клетки присутствуют в крови; (iii) снижение количества не озлокачествленных CD14+ миелоидных клеток, необязательно, где не озлокачествленные CD14+ миелоидные клетки являются инфильтрующими в опухоль клетками или, необязательно, где не озлокачествленные CD14+ миелоидные клетки присутствуют в крови; (iv) снижение уровней PD-L1, PD-L2, B7-H7, B7-H3, CD200R, CD163 и/или CD206 в одной или более клетках, необязательно, где одна или более клеток являются не озлокачествленными миелоидными супрессорными клетками (МЛСК); (v) снижение скорости роста опухоли при солидных опухолях; (vi) снижение объема опухоли; (vii) повышение эффективности одного или более PD-1 ингибиторов; (viii) по-

вышение эффективности одной или более терапий, ингибирующих иммунную контрольную точку и/или иммуномодулирующих терапий, где одна или более терапий, ингибирующих иммунную контрольную точку и/или иммуномодулирующих терапий таргетирована на один или более из CTL4, аденозинового пути, PD-L1, PD-L2, OX40, TIM3, LAG3 или любого их сочетания; (ix) повышение эффективности одного или более химиотерапевтических агентов, необязательно где одним или более химиотерапевтическими агентами являются гемцитабин, капецитабин, антрациклины, доксорубин (Adriamycin®), эпирубицин (Ellence®), таксаны, паклитаксел (Taxol®), доцетаксел (Taxotere®), 5-фторурацил (5-FU), циклофосфамид (Cytoxan®), карбоплатин (Paraplatin®) и любое их сочетание; (x) повышение пролиферации Т-клеток в присутствии не озлокачественных миелоидных супрессорных клеток (МЛСК); (xi) ингибирование дифференциации, выживания и/или одной или более функций не озлокачественных миелоидных супрессорных клеток (МЛСК); и (xii) уничтожение CD33-экспрессирующих иммуносупрессорных не озлокачественных миелоидных клеток и/или не озлокачественных CD14-экспрессирующих клеток в солидных опухолях и связанных с ними кровеносных сосудах при конъюгации с химическим или радиоактивным токсином.

В некоторых вариантах осуществления, ан анти-SIRPA антитело настоящего изобретения снижает активность, функциональность или выживаемость регуляторных Т-клеток, включенных в опухоль иммуносупрессорных дендритных клеток, включенных в опухоль иммуносупрессорных макрофагов, миелоидных супрессорных клеток, ассоциированных с опухолью макрофагов, клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), клеток хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) или хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ).

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения вызывает или способствует выживанию, созреванию, функциональности, миграции или пролиферации одной или более иммунных клеток, например, одной или более иммунных клеток, выбранных из дендритных клеток, макрофагов, нейтрофилов, NK клеток, микроглии, Т-клеток, Т-хелперных клеток, цитотоксических Т-клеток и любого их сочетания у индивида.

Связывающая аффинность анти-SIRPA антитела.

В некоторых вариантах осуществления любых антител, представленных здесь, антитело имеет константу диссоциации (K_d) $<1 \mu\text{M}$, $<100 \text{ nM}$, $<10 \text{ nM}$, $<1 \text{ nM}$, $<0,1 \text{ nM}$, $<0,01 \text{ nM}$ или $<0,001 \text{ nM}$ (например, 10^{-8} M или менее, например, от 10^{-8} M до 10^{-13} M , например, от 10^{-9} M до 10^{-13} M). Константы диссоциации могут быть определены любым аналитическим методом, включая любой биохимический или биофизический метод, такой как ELISA, поверхностный плазмонный резонанс (ППР), биослойная интерферометрия (см., например, Octet System от ForteBio), изотермическая титрационная калориметрия (ИТК), дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), циркулярный дихроизм (ЦД), анализ методом остановленной струи и калориметрический или флуоресцентный анализы плавления белка. В одном варианте осуществления, K_d измеряют анализом связывания радиомеченного антигена (РИА). В некоторых вариантах осуществления, РИА проводят с Fab версией представляющего интерес антитела и его антигена, например, как описано у Chen et al. *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). В некоторых вариантах осуществления, K_d изменяют с применением BIACORE анализа поверхностным плазмонным резонансом, например, анализа с применением BIACORE-2000 или BIACORE-3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) проводят при 25°C с иммобилизованными антигенными CM5 чипами при ~ 10 единицах ответа (ЕО). В некоторых вариантах осуществления, КД определяют с применением одновалентного антитела (например, Fab) или полноразмерного антитела. В некоторых вариантах осуществления, КД определяют с применением полноразмерного антитела в одновалентной форме.

Фрагменты антител.

В некоторых вариантах осуществления любых антител, представленных здесь, антителом является фрагмент антитела. Фрагменты антител включают, но не ограничены ими, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv и scFv фрагменты и другие фрагменты, описанные ниже. Обзор определенных фрагментов антитела представлен в Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Обзор фрагментов scFv представлен в, например, WO 93/16185; и патентах США №№ 5571894 и 5587458. Обсуждение Fab и F(ab')₂ фрагментов, содержащих остатки эпитопа связывания рецептора реутилизации и имеющих повышенный период полужизни *in vivo*, см. в патенте США № 5869046.

Диатела являются фрагментами антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые могут быть двухвалентными или биспецифическими. См., например, EP404097; WO 1993/01161; Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Триатела и тетраатела также описаны в Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Однодоменными антителами являются фрагменты антител, содержащие всю или часть тяжелой цепи варибельного домена всей или части легкой цепи варибельного домена антитела. В определенных вариантах осуществления, однодоменным антителом является человеческое однодоменное антитело (см., например, патент США № 6248516).

Фрагменты антител могут быть получены разными методами, включая, но не ограничиваясь ими, протеолитическое расщепление интактного антитела, а также выработка рекомбинантными клетками-хозяевами (например, *E. coli* или фагом), как описано в данном документе.

Химерные и гуманизированные антитела.

В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных здесь, антителом является химерное антитело. Определенные химерные антитела описаны, например, в патенте США № 4816567. В одном примере, химерное антитело содержит не человеческую вариабельную область (например, вариабельную область, полученную от мыши, крысы, хомяка, кролика или не человеческого примата, такого как обезьяна) и человеческую постоянную область. В другом примере, химерным антителом является антитело "переключенного класса" в котором класс или подкласс был изменен по сравнению с исходным антителом. Химерные антитела включают их антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных здесь, антителом является гуманизированное антитело. Обычно не человеческое антитело гуманизируют для снижения иммуногенности к человеку, при этом сохраняя специфичность и аффинность исходного не человеческого антитела. В определенных вариантах осуществления, гуманизированное антитело является по существу не иммуногенным в человеке. В определенных вариантах осуществления, гуманизированное антитело имеет по существу ту же аффинность к цели, как и антитело от другого вида, от которого получено гуманизированное антитело. См., например, патент США № 5530101, 5693761; 5693762; и 5585089. В определенных вариантах осуществления, аминокислоты вариабельного домена антитела, которое может быть модифицировано без уменьшения природной аффинности антигенсвязывающего домена при снижении его иммуногенности, идентифицированы. См., например, патенты США №№ 5766886 и 5869619. В общем гуманизированное антитело содержит один или более вариабельных доменов, в которых HVR (или их части) получают из не человеческого антитела и КО (или их части) получают из последовательностей человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно также содержит, по меньшей мере, часть человеческой постоянной области. В некоторых вариантах осуществления, некоторые остатки КО в гуманизированном антителе замещены соответствующими остатками из не человеческого антитела (например, антитела, из которого получены остатки HVR), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

Гуманизированные антитела и способы из получения обсуждаются, например, в Almagro et al. *Front. Biosci.* 13:161 9-1633 (2008) и также описаны, например, в патентах США №№ 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409. Человеческие каркасные области, которые могут применяться для гуманизации, включают, но не ограничены ими: каркасные области, выбранные с применением способа "оптимальной подгонки" (см., например, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); каркасные области, полученные из консенсусной последовательности человеческого антитела конкретной подгруппы вариабельных областей легкой или тяжелой цепей (см., например, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); и Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623 (1993)); человеческие зрелые (соматически мутированные) каркасные области или человеческие зародышевые каркасные области (см., например, Almagro и Fransson *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); и каркасные области, полученные скринингом КО библиотек (см., например, Vasa et al. *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) и Rosok et al. *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

Человеческие антитела.

В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных здесь, антителом является человеческое антитело. Человеческие антитела могут быть получены с применением разных методов, известных в данной области техники. Человеческие антитела описаны в общем в van Dijk et al. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001) и Lonberg *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Человеческие антитела могут быть получены введением иммуногена трансгенному животному, которое модифицировано для того, чтобы вырабатывать интактные человеческие антитела или интактные антитела с человеческими вариабельными областями в ответ на провокацию антигеном. Можно сконструировать мышинные штаммы с дефицитом вырабатывания мышинового антитела с большими фрагментами локусов человеческого Ig, ожидая, что такая мышь будет вырабатывать человеческие антитела в отсутствие мышинных антител. Большие фрагменты человеческого Ig могут сохранить большое разнообразие вариабельных генов, а также должную регуляцию вырабатывания и экспрессии антитела. Используя мышинный механизм для диверсификации и выбора антитела, и отсутствие иммунологической толерантности к человеческим белкам, воспроизведенный репертуар человеческого антитела в этих мышинных штаммах может дать высокую аффинность полностью человеческих антител против любого вызывающего интерес антигена, включая человеческие антигены. Применяя методику гибридомы, могут быть выработаны и выбраны антиген-специфические человеческие mAbs с желаемой специфичностью. Определенные типовые способы описаны в патенте США № 5545807, EP 546073 и EP 546073. Смотрите также, например, патенты США №№ 6075181 и 6150584, описывающие технологию XENOMOUSE™; патент США № 5770429, описывающий технологию HUMAB®; Патент США № 7041870, описывающий технологию K-M MOUSE® и публикацию заявки на патент США № US 2007/0061900, описывающую технологию VELOCIMOUSE®. Человеческие вариабельные области их интактного антитела, созданного такими животными, могут быть далее модифицированы, например, объединением с разными человеческими постоянными областями.

Человеческие антитела также могут быть получены способами на основе гибридомы. Были описаны

колонии клеток человеческой миеломы и мышино-человеческой гетеромиеломы для выработки человеческих моноклональных антител. (См., например, Kozbor J. *Immunol.* 133:3001 (1984) и Boerner et al. *J. Immunol.* 147:86 (1991)). Человеческие антитела, созданные через технологию человеческой В-клеточной гибридомы, также описаны в Li et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Дополнительные способы включают такие, которые описаны, например, в Патенте США № 7189826 (описывающем получение моноклональных человеческих IgM антител из колоний клеток гибридомы). Технология человеческой гибридомы (технология Триомы) также описана в Vollmers et al. *Histology and Histopathology* 20(3):927-937 (2005) и Vollmers et al. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27(3):185-91 (2005). Человеческие антитела также могут быть созданы для выделения Fv клон последовательностей вариабельного домена, выбранного из человеческих фаг-дисплейных библиотек. Такие последовательности вариабельного домена затем могут быть объединены с желаемым человеческим постоянным доменом. Методы выбора человеческих антител из библиотек антител описаны ниже.

В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных здесь, антителом является человеческое антитело, выделенное *in vitro* способами и/или скринингом комбинаторных библиотек на антитела с желаемой активностью или активностями. Подходящие примеры включают, но не ограничены ими, фаговый дисплей (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (ранее Proliferon), Affimed), рибосомный дисплей (CAT), дрожжевой дисплей (Adimab) и подобные. В определенных способах фагового дисплея, репертуары VH и VL генов отдельно клонируют полимеразной цепной реакцией (ПЦР) и рекомбинируют произвольно в фаговые библиотеки, которые затем подвергают скринингу в отношении антигенсвязывающего фага как описано в Winter et al. *Ann. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994). Например, множество способов известно в данной области техники для создания фаг-дисплейных библиотек и скрининга таких библиотек в отношении антител, обладающих желаемыми характеристиками связывания. Смотрите также Sidhu et al. *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310, 2004; Lee et al. *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093, 2004; Fellouse *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); и Lee et al. *J. Immunol. Methods* 284(-2):119-132 (2004). Фаг обычно демонстрирует фрагменты антител либо в виде Fv (scFv) фрагментов, либо в виде Fab фрагментов. Библиотеки из иммунизированных источников обеспечивают высокую аффинность антитела к иммуногену без требования конструирования гибридом. Альтернативно, интактный репертуар может быть клонирован (например, от человека) с получением единственного источника антител к широкому спектру не своих, а также аутоантигенов без какой-либо иммунизации, как описано у Griffiths et al. *EMBO J.* 12:725-734 (1993). наконец, интактные библиотеки также могут быть получены синтетически клонированием неперегруппированных сегментов V-гена из стволовых клеток и с применением ПЦР праймеров, содержащих произвольные последовательности для кодирования высоко вариабельных HVR3 областей и для завершения перегруппировки *in vitro*, как описано у Hoogenboom et al. *J. Mol. Biol.*, 227:381-388, 1992. Патентные публикации, описывающие фаговые библиотеки человеческого антитела включают, например: патент США № 5750373 и публикации патентов США №№ 2007/0292936 и 2009/0002360. Антитела, выделенные из библиотек человеческого антитела, считаются человеческими антителами или фрагментами человеческих антител в данном документе.

Постоянные области, включающие Fc области.

В некоторых вариантах осуществления любого из анти-SIRPA антител, представленных здесь, антитело содержит Fc. В некоторых вариантах осуществления, Fc является человеческим IgG1, IgG2, IgG3 и/или IgG4 изотипов. В некоторых вариантах осуществления, антителом является IgG класс, IgM класс или IgA класс.

В определенных вариантах осуществления любого из анти-SIRPA антител, представленных здесь, антитело имеет IgG2 изотип. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело содержит постоянную область человеческого IgG2. В некоторых вариантах осуществления, постоянная область человеческого IgG2 включает Fc область. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело вызывает одну или более SIRPA активностей или, независимо, связывание с Fc рецептором. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело связывает ингибирующий Fc рецептор. В определенных вариантах осуществления, ингибирующим Fc рецептором является ингибирующий Fc-гамма рецептор IIB (FcγIIB).

В определенных вариантах осуществления любого из антител, представленных здесь, антитело имеет IgG1 изотип. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело содержит постоянную область мышинового IgG1. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело содержит постоянную область человеческого IgG1. В некоторых вариантах осуществления, постоянная область человеческого IgG1 включает Fc область. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело связывает ингибирующий Fc рецептор. В определенных вариантах осуществления, ингибирующим Fc рецептором является ингибирующий Fc-гамма рецептор IIB (FcγIIB).

В определенных вариантах осуществления любого из анти-SIRPA антител, представленных здесь, антитело имеет IgG4 изотип. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело содержит постоянную область человеческого IgG4. В некоторых вариантах осуществления, постоянная область человеческого IgG4 включает Fc область. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело

связывает ингибирующий Fc рецептор. В определенных вариантах осуществления, ингибирующим Fc рецептором является ингибирующий Fc-гамма рецептор ПВ (FcγIIb).

В определенных вариантах осуществления любого из анти-SIRPA антител, представленных здесь, антитело имеет гибридный IgG2/4 изотип. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело включает последовательность аминокислот, содержащую аминокислоты 118-260 согласно нумерации EU человеческого IgG2, и аминокислоты 261-447 согласно нумерации EU человеческого IgG4 (WO 1997/11971; WO 2007/106585).

В некоторых вариантах осуществления, Fc область вызывает скопление без активирующего компонента по сравнению с соответствующим антителом, содержащим Fc область, которая не содержит аминокислотные замещения. В некоторых вариантах осуществления, антитело вызывает одну или более активностей цели, специфически связанной антителом. В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с SIRPA.

Также может быть желательно модифицировать анти-SIRPA антитело настоящего изобретения для модификации эффекторной функции и/или для повышения периода полужизни антитела в сыворотке. Например, сайт связывания Fc рецептора на постоянной области может быть модифицирован или мутирован для устранения или снижения связывающей аффинности с определенными Fc рецепторами, такими как FcγRI, FcγRII и/или FcγRIII, для снижения антитело-зависимой медирированной клеткой цитотоксичности. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная функция ослабляется при удалении N-гликозилирования Fc области (например, в CH2 домене IgG) антитела. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная функция ослабляется модификацией областей, таких как 233-236, 297 и/или 327-331 человеческого IgG, как описано в WO 99/58572 и Armour et al. *Molecular Immunology* 40: 585-593 (2003); Reddy et al. *J. Immunology* 164:1925-1933 (2000). В других вариантах осуществления, также может быть желательно модифицировать анти-SIRPA антитело настоящего изобретения для модификации эффекторной функции для повышения определяющей селективности в отношении ИТИМ-содержащей FcγRIIb (CD32b) для повышения скопления SIRPA антител на соседних клетках без активации гуморальных ответов, включая антитело-зависимую медирированную клеткой цитотоксичность и антитело-зависимый клеточный фагоцитоз.

Для повышения периода полужизни антитела в сыворотке, можно ввести эпитоп связывания рецептора реутилизации в антитело (особенно, фрагмент антитела) как описано в патент США № 5739277, например. В контексте данного документа, термин "эпитоп связывания рецептора реутилизации" относится к эпитопу Fc области IgG молекулы (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄), которая отвечает за повышение *in vivo* периода полужизни IgG молекулы.

Полиспецифические антитела.

Полиспецифическими являются антитела, которые имеют специфичность связывания в отношении, по меньшей мере, двух разных эпитопов, включая таковые на одном или другом полипептиде (например, один или более SIRPA полипептидах настоящего изобретения). В некоторых вариантах осуществления, полиспецифическим антителом может быть биспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления, полиспецифическим антителом может быть триспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления, полиспецифическим антителом может быть тетраспецифическое антитело. Такие антитела могут быть получены из полноразмерных антител или фрагментов антител (например, F(ab')₂ биспецифических антител). В некоторых вариантах осуществления, полиспецифическое антитело содержит первую антигенсвязывающую область, которая связывается с первым сайтом SIRPA, и содержит вторую антигенсвязывающую область, которая связывается со вторым сайтом SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, полиспецифические антитела содержат первую антигенсвязывающую область, которая связывается с SIRPA, и вторую антигенсвязывающую область, которая связывается со вторым полипептидом.

В данном документе представлены полиспецифические антитела, содержащие первую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область содержит шесть HVR антител, описанных в данном документе, которые связываются с SIRPA, и вторую антигенсвязывающую область, которая связывается со вторым полипептидом. В некоторых вариантах осуществления, первая антигенсвязывающая область содержит V_H или V_L антитела, описанного в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления любого из полиспецифических антител, вторым полипептидом является антиген, способствующий транспорту через гематоэнцефалический барьер. Множество антигенов и пептидов известно в данной области техники, которые способствуют транспорту через гематоэнцефалический барьер (см., например, Gabathuler R. *Neurobiol. Dis.* 37:48-57 (2010)). Такие вторые антигены и пептиды включают, без ограничения, трансферриновый рецептор (TR), инсулиновый рецептор (HIR), рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGFR), белки 1 и 2, связанных с рецептором липопротеинов низкой плотности (LPR-1 и 2), рецептор дифтерийного токсина, включая CRM197 (не токсичный мутант дифтерийного токсина), TMEM 30(A) (флиппазу), домены трансдукции белка, такие как TAT, Syn-B или пенетратин, полиаргининовые или обычно положительно заряженные пептиды, Ангиопеп пептиды, такие как ANG1005 (см., например, Gabathuler, 2010) и другие белки поверхности клеток,

которые обогащены эндотелиальными клетками гематоэнцефалического барьера (см., например, Dane-man et al. PLoS One 5(10):e13741 (2010)).

В некоторых вариантах осуществления любого из полиспецифических антител, вторым полипептидом является вызывающий заболевание белок, выбранный из амилоида бета, олигомерного амилоида бета, амилоидных бета бляшек, белка-предшественника амилоида или их фрагментов, Тау, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, FUS белка, C9orf72 (открытая рамка считывания 72 хромосомы 9), с9RAN белка, белка приона, PrPSc, хантингтина, кальцитонина, пероксиддисмутаза, атаксина, атаксина 1, атаксина 2, атаксина 3, атаксина 7, атаксина 8, атаксина 10, телец Леви, предсердного натрийуретического фактора, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида A, медиана, пролактина, транстиретина, лизозима, бета 2 микроглобулина, желсолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, S-IBM белка, связанных с повтором не-ATG (RAN) продуктом трансляции, пептида дипептидного повтора (DPR), пептида глицин-аланинового (GA) повтора, пептидов глицин-пролинового (GP) повтора, пептидов глицин-аргининового повтора (GR), пептидов пролин-аланинового (PA) повтора, убиквитина и пептидов пролин-аргининового (PR) повтора; (d) лигандов и/или белков, экспрессированных на иммунных клетках, где лиганды и/или белки выбирают из CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA-4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, BTLA, KIR, GAL9, TIM3, A2AR, LAG-3 и фосфатидилсерина; и/или (e) белка, липида, полисахарида или гликолипида, экспрессированного на одной или более опухолевых клетках, и любого их сочетания.

Мультивалентные антитела могут распознавать SIRPA антиген, а также, без ограничения, дополнительные антигены, такие как A β пептидный антиген, антиген α -синуклеинового белка, антиген Тау белка, антиген TDP-43 белка, антиген белка приона, антиген белка хантингтина, антиген продуктов трансляции RAN (включая дипептидные повторы, (DPR пептиды) состоящие из глицина-аланина (GA), глицина-пролина (GP), глицина-аргинина (GR), пролина-аланина (PA) или пролина-аргинина (PR)), инсулиновый рецептор, рецептор инсулиноподобного фактора роста или трансферринового рецептора или любого другого антигена, который способствует переносу антитела через гематоэнцефалический барьер. В некоторых вариантах осуществления, вторым полипептидом является трансферрин. В некоторых вариантах осуществления, вторым полипептидом является Тау. В некоторых вариантах осуществления, вторым полипептидом является A β . В некоторых вариантах осуществления, вторым полипептидом является TREM2. В некоторых вариантах осуществления, вторым полипептидом является α -синуклеин.

Мультивалентное антитело содержит, по меньшей мере, одну полипептидную цепь (и, предпочтительно, две полипептидных цепи), где полипептидная цепь или цепи содержат два или более переменных домена. Например, полипептидная цепь или цепи могут содержать VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, где VD1 является первым переменным доменом, VD2 является вторым переменным доменом, Fc является одной полипептидной цепью Fc области, X1 и X2 представляет аминокислоту или полипептид и n равно 0 или 1. Также, полипептидная цепь или цепи могут содержать цепь V_H-C_H1-гибкий линкер-V_H-C_H1-Fc области; или цепь V_H-C_H1-V_H-C_H1-Fc области. Мультивалентное антитело здесь предпочтительно дополнительно содержит, по меньшей мере, две (и, предпочтительно, четыре) переменных домена легкой цепи полипептидов. Мультивалентное антитело в данном документе может, например, содержать от около двух до около восьми переменных доменов легкой цепи полипептидов. Переменный домен легкой цепи полипептидов, рассматриваемый здесь, может содержать переменный домен легкой цепи и, необязательно, дополнительно содержит CL домен.

Методики получения полиспецифических антител включают, но не ограничены ими, рекомбинантную со-экспрессию двух пар тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулина, имеющих разную специфичность (см. Milstein and Cuello Nature 305: 537 (1983), WO 93/08829 и Traunecker et al. EMBO J. 10:3655 (1991)) и конструирование "выступ-во-впадину" (см., например, Патент США № 5731168). Смотрите также WO 2013/026833 (CrossMab). Мультиспецифические антитела также могут быть получены конструированием белков с использованием эффекта электростатического взаимодействия для получения Fc-гетеродимерных молекул антитела (WO 2009/089004A1); перекрестным связыванием двух или более антител (см., например, патент США № 4676980); применением лейцина; применением технологии "диате-ла" для получения биспецифических фрагментов антител (см., например, Hollinger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)); и применением одноцепочечных Fv (scFv) димеров (см., например, Gruber et al. J. Immunol. 152:5368 (1994)); и получением триспецифических антител как описано, например, в Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

Сконструированные антитела с тремя или более функциональными антигенсвязывающими сайтами, включая антитела-"осьминоги", также включены в данный документ (см., например, US 2006/0025576). В данном документе антитело также включает "FAB двойного действия" или "DAF", содержащее антигенсвязывающий сайт, которое связывается с множеством SIRPA (см. US 2008/0069820, например).

Варианты антитела.

В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных здесь, рассматриваются варианты аминокислотных последовательностей антител. Например, может быть желательно улучшать связывающую аффинность и/или другие биологические свойства антитела.

Варианты замещения, вставки и делеции.

В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных здесь, представлены варианты антитела, имеющие одно или более аминокислотных замещений. Варианты аминокислотных последовательностей антитела могут быть получены введением подходящих модификаций в нуклеотидные последовательности, кодирующие антитело, или пептидным синтезом. Такие модификации включают, например, делеции из и/или вставки в и/или замещения остатков в аминокислотных последовательностях антитела.

Таблица 1

Аминокислотные замещения

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

Значительные модификации биологических свойств антитела проводятся выбором замещений, которые значительно отличаются их эффектом сохранения (а) структуры полипептидного скелета в области замещения, например, в виде листовой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте или (c) объема боковой цепи. Существующие в природе остатки делят на группы на основе общих свойств боковой цепи:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) щелочные His, Lys, Arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Например, не консервативные замещения могут включать обмен члена одного из этих классов на член из другого класса. Такие замещенные остатки могут быть введены, например, в области человеческого антитела, которые гомологичны с не-человеческим антителом, или в не гомологичные области молекулы.

При проведении изменений полипептида или антитела, описанных в данном документе, согласно определенным вариантам осуществления, может учитываться индекс гидрофобности аминокислот. Каждая аминокислота имеет индекс гидрофобности на основе характеристик ее гидрофобности и заряда. Они включают: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9); и аргинин (-4,5).

Важность индекса гидрофобности аминокислоты в придании интерактивной биологической функции белку понятна в данной области техники. Kyte et al. *J. Mol. Biol.*, 157:105-131 (1982). Известно, что определенные аминокислоты могут быть замещены другими аминокислотами, имеющими похожий ин-

декс гидрофобности или показатель и все еще сохраняет похожую биологическую активность. При проведении изменений на основе индекса гидрофобности, в определенных вариантах осуществления, включено в пределах ± 2 . В определенных вариантах осуществления, включены такие, которые составляют ± 1 , и включены такие, которые составляют $\pm 0,5$.

Также понятно в данной области техники, что замещение подобных аминокислот может эффективно проводиться на основе гидрофильности, в частности, где создаваемый таким образом биологически функциональный белок или пептид предназначен для применения в иммунологических вариантах осуществления, как в данном случае. В определенных вариантах осуществления, наибольшая местная средняя гидрофильность белка, управляемая гидрофильностью его соседних аминокислот, коррелирует с иммуногенностью и антигенностью, т.е. с биологическим свойством белка.

Следующие значения гидрофильности присвоены этим аминокислотным остаткам: аргинин (+3,0); лизин (+3,0 \pm 1); аспарат (+3,0 \pm 1); глутамат (+3,0 \pm 1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5 \pm 1); аланин (-0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5) и триптофан (-3,4). При проведении изменений на основе похожих значений гидрофильности, в определенных вариантах осуществления, включено замещение аминокислот, значения гидрофильности которых составляют в пределах ± 2 , в определенных вариантах осуществления, включены такие, которые составляют ± 1 , и в определенных вариантах осуществления, включены такие, которые в пределах $\pm 0,5$. Можно идентифицировать эпитопы из первичных аминокислотных последовательностей на основе гидрофильности. Эти области также называются "эпитопные коровые области".

В определенных вариантах осуществления, замещения, вставки или делеции могут возникать в пределах одного или более HVR настолько, насколько эти изменения по существу не снижают способность антитела связывать антиген. Например, консервативные изменения (например, консервативные замещения, как представлено в данном документе), которые по существу не снижают связывающую аффинность, могут быть проведены в HVR. Такие изменения могут, например, быть вне контактирующих с антигеном остатков в HVR. В определенных вариантах осуществления вариантных VH и VL последовательностей, представленных выше, каждый HVR либо не изменен, либо содержит не более одного, двух или трех аминокислотных замещений.

Вставки аминокислотной последовательности включают amino- и/или карбокси-концевые слияния, варьирующиеся по длине от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или множества аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метиониновым остатком. Другие варианты вставок молекулы антитела включают слияние с N- или C-окончанием антитела с ферментом (например, для ADEPT) или полипептидом, которое повышает период полужизни антитела в сыворотке.

Любой цистеиновый остаток, не вовлеченный в сохранение должной конформации антитела, также может быть замещен, обычно серином, для улучшения окислительной стабильности молекулы и предотвращения aberrантного перекрестного связывания. Наоборот, цистеиновые связи могут быть добавлены к антителу для улучшения его стабильности (в частности, если антителом является фрагмент антитела, такой как Fv фрагмент).

Варианты гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных здесь, антитело изменяют для повышения или снижения степени гликозилирования антитела. Добавление или делеция сайтов гликозилирования к антителу может удобным образом сопровождаться изменением аминокислотной последовательности так, что один или более сайтов гликозилирования создается или удаляется.

Гликозилирование антител обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводной группы к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X является любой аминокислотой за исключением пролина, являются последовательностями распознавания для ферментного присоединения углеводной группы боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, наиболее часто, серину или треонину, хотя также могут применяться 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление сайтов гликозилирования к антителу удобным образом проводят через изменение аминокислотной последовательности, так, что она содержит один или более из вышеописанных трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования). Изменения также могут быть сделаны добавлением или замещением одного или более сериновых или треониновых остатков к последовательности исходного антитела (для O-связанных сайтов гликозилирования).

Если антитело содержит Fc область, присоединенный к нему углевод может быть изменен. Нативные антитела, выработанные клетками млекопитающих, обычно содержат разветвленный биантенарный олигосахарид, который обычно присоединен N-связью с Asn297 согласно нумерации по Кэботу CH2 до-

мена Fc области. Олигосахарид может включать различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в "стволе" биантенарной структуры олигосахаридов. В некоторых вариантах осуществления, модификации олигосахаридов в антителе настоящего изобретения могут быть проведены для создания вариантов антитела с определенными улучшенными свойствами.

В одном варианте осуществления, представлены варианты антитела, имеющие углеводную структуру, которая не имеет фукозу, присоединенную (прямо или косвенно) к Fc области. Смотрите, например, публикации патентов США №№ 2003/0157108 и 2004/0093621. Примеры публикаций, относящихся к "дефукозилированным" или "фукоза-дефицитным" вариантам антитела включают: US 2003/0157108; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004). Примеры колоний клеток, способных производить дефукозилированные антитела, включают Led 3 CHO клетки с дефицитом белка фукозилрования (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); US 2003/0157108) и нокаутированные CHO клетки (см., например, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004) и Kanda et al. Biotechnol. Bioeng. 94(4):680-688 (2006)).

Модифицированные постоянные области.

В некоторых вариантах осуществления любого из анти-SIRPA антител, представленных здесь, антителом Fc являются изотипы и/или модификации антитела Fc. В некоторых вариантах осуществления, изотип и/или модификация антитела Fc способна связываться с Fc гамма рецептором.

Типовые изотипы и модификации антитела Fc представлены в табл. 2 ниже. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения способно связывать Fc гамма рецептор, имеющий Fc изотип, перечисленный в табл. 2 ниже.

Таблица 2

Типовые изотипы анти-SIRPA антитела Fc, которые способны связывать Fc гамма рецептор

Fc Изотип	Мутация (схема нумерации EU)
IgG1	N297A
IgG1	D265A и N297A
IgG1	D270A
IgG1	L234A и L235A L234A и G237A L234A и L235A и G237A
IgG1	D270A, и/или P238D, и/или L328E, и/или E233D, и/или G237D и/или H268D, и/или P271G, и/или A330R
IgG1	P238D и L328E и E233D и G237D и H268D и P271G и A330R
IgG1	P238D и L328E и G237D и H268D и P271G и A330R

IgG1	P238D и S267E и L328F и E233D и G237D и H268D и P271G и A330R
IgG1	P238D и S267E и L328F и G237D и H268D и P271G и A330R
IgG2	V234A и G237A
IgG4	L235A и G237A и E318A
IgG4	S228P и L236E
IgG2/4 гибрид	IgG2 aa 118 до 260 и IgG4 aa 261 до 447
	H268Q и V309L; и A330S и P331S
IgG1	C226S и C229S и E233P и L234V и L235A
IgG1	L234F и L235E и P331S
IgG2	C232S или C233S
IgG2	A330S и P331S
IgG1	S267E и L328F S267E только
IgG2	S267E и L328F
IgG4	S267E и L328F
IgG2	WT HC с Каппа (легкая цепь) LC HC C127S с Каппа LC Каппа LC C214S Каппа LC C214S и HC C233S Каппа LC C214S и HC C232S Любая из вышеперечисленных мутаций вместе с P330S и P331S мутациями F(ab') ₂ фрагмент WT IgG1 и любая из вышеперечисленных мутаций
IgG1	Замещение постоянной тяжелой 1 (CH1) и шарнирной области IgG1 с CH1 и шарнирной областью IgG2 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVK KCCVECPPCP (SEQ ID №: 58) С Каппа LC
IgG1	Любая из вышеперечисленных мутаций вместе с A330L/A330S и/или L234F и/или L235E и/или P331S
IgG1, IgG2 или IgG4	Любая из вышеперечисленных мутаций вместе с M252Y и/или S254T и/или T256E
Мышиный IgG1, мышиный IgG2a, мышиный IgG2b	Для мышиных моделей болезней
IgG4	WT
IgG1	Любая из вышеперечисленных мутаций вместе с E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, S440W и/или любое их сочетание.
IgG2	Любая из вышеперечисленных мутаций вместе с E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, S440W и/или любое их сочетание.

В дополнение к изотипам, описанным в табл. 2, и не желая быть привязанными к теории, считают, что антитела с человеческими IgG1 или IgG3 изотипами и их мутантами (например, Strohl (2009) Current Opinion in Biotechnology 2009, 20:685-691), которые связывают Fcγ рецепторы I, IIА, IIС, IIIА, IIIВ в человеческих и/или Fcγ рецепторах I, III и IV у мышей, также могут действовать в качестве транзистентных агонистических антител.

В некоторых вариантах осуществления, связывающее Fc гамма рецептор антитело принадлежит к IgG классу, IgM классу или IgA классу. В некоторых вариантах осуществления, связывающее Fc гамма

рецептор антитело имеет IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 изотип. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит один или более (например, один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, 10 или более, 11 или более, 12 или более или все тринадцать) аминокислотных замещений в Fc области на положениях остатков, выбранных из группы, состоящей из: C127S, L234A, L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, E345R, E430G, S440Y в любом сочетании (положение остатка согласно нумерации EU или Кэбота). В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положении E430G. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях L243A, L235A и P331A. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях L243A, L235A, P331A. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях K322A и E430G. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях P331S и E430G. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях A330S, P331S и E430G. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях K322A, A330S и P331S. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях K322A, P331S и E430G. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях A330S, P331S и E430G. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях S267E и L328F. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положении C127S. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях E345R, E430G и S440Y.

В определенных вариантах осуществления, связывающее Fc гамма рецептор антитело имеет IgG2 изотип. В некоторых вариантах осуществления, связывающее Fc гамма рецептор антитело содержит постоянную область человеческого IgG2. В некоторых вариантах осуществления, постоянная область человеческого IgG2 включает Fc область. В некоторых вариантах осуществления, связывающее Fc гамма рецептор антитело связывает ингибирующий Fc рецептор. В определенных вариантах осуществления, ингибирующим Fc рецептором является ингибирующий Fc-гамма рецептор IIВ (FcγIIВ). В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит одно или более аминокислотных замещений (например, относительно дикого типа Fc области того же изотипа). В некоторых вариантах осуществления, одно или более аминокислотных замещений выбирают из V234A (Alegre et al., (1994) *Transplantation* 57:1537-1543. 31; Xu et al., (2000) *Cell Immunol*, 200:16-26). G237A (Cole et al. (1999) *Transplantation*, 68:563-571). H268Q, V309L, A330S, P331S (US 2007/0148167; Armour et al. (1999) *Eur J Immunol* 29: 2613-2624; Armour et al. (2000) *The Haematology Journal* 1 (Suppl.1):27; Armour et al. (2000) *The Haematology Journal* 1(Suppl.1):27), C232S, и/или C233S (White et al.(2015) *Cancer Cell* 27, 138-148). S267E, L328F (Chu et al., (2008) *Mol Immunol*, 45:3926-3933), M252Y, S254T, и/или T256E, где положение аминокислоты указано в соответствии с системой нумерации EU или Кэбота.

В некоторых вариантах осуществления, связывающее Fc гамма рецептор антитело имеет IgG2 изотип с тяжелой цепью постоянного домена, которая содержит C127S аминокислотное замещение, где положение аминокислоты указано в соответствии с системой нумерации EU или Кэбота (White et al., (2015) *Cancer Cell* 27, 138-148; Lightle et al., (2010) *PROTEIN SCIENCE* 19:753-762; и WO 2008079246).

В некоторых вариантах осуществления, связывающее Fc гамма рецептор антитело имеет IgG2 изотип с каппа легкой цепью постоянного домена, которая содержит C214S аминокислотное замещение, где положение аминокислоты указано в соответствии с системой нумерации EU или Кэбота (White et al., (2015) *Cancer Cell* 27, 138-148; Lightle et al., (2010) *PROTEIN SCIENCE* 19:753-762; и WO 2008079246).

В определенных вариантах осуществления, связывающее Fc гамма рецептор антитело имеет IgG1 изотип. В некоторых вариантах осуществления, связывающее Fc гамма рецептор антитело содержит постоянную область мышинового IgG1. В некоторых вариантах осуществления, связывающее Fc гамма рецептор антитело содержит постоянную область человеческого IgG1. В некоторых вариантах осуществления, постоянная область человеческого IgG1 включает Fc область. В некоторых вариантах осуществления, связывающее Fc гамма рецептор антитело связывает ингибирующий Fc рецептор. В определенных вариантах осуществления, ингибирующим Fc рецептором является ингибирующий Fc-гамма рецептор IIВ (FcγIIВ). В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит одно или более аминокислотных замещений (например, относительно Fc области дикого типа того же изотипа). В некоторых вариантах осуществления, одно или более аминокислотных замещений выбирают из N297A (Bolt S et al. (1993) *Eur J Immunol* 23:403-411), D265A (Shields et al. (2001) *R. J. Biol. Chem.* 276, 6591-6604), D270A, L234A, L235A (Hutchins et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:11980-11984; Alegre et al., (1994) *Transplantation* 57:1537-1543. 31; Xu et al., (2000) *Cell Immunol*, 200:16-26), G237A (Alegre et al. (1994) *Transplantation* 57:1537-1543. 31; Xu et al. (2000) *Cell Immunol*, 200:16-26), P238D, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E (McEarchern et al., (2007) *Blood*, 109:1185-1192),

P331S (Sazinsky et al., (2008) Proc Natl Acad Sci USA 2008, 105:20167-20172), S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A и/или T394D, где положение аминокислоты указано в соответствии с системой нумерации EU или Кэбота.

В некоторых вариантах осуществления, антитело включает постоянный домен тяжелой цепи 1(CH1) и шарнирную область IgG2 изотипа (White et al., (2015) Cancer Cell 27, 138-148). В определенных вариантах осуществления, CH1 и шарнирная область IgG2 изотипа содержит последовательность аминокислот ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSS GLYS-LSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVCPSP (SEQ ID №: 58). В некоторых вариантах осуществления, Fc область антитела содержит S267E аминокислотное замещение, L328F аминокислотное замещение или оба, и/или N297A или N297Q аминокислотное замещение, где положение аминокислоты указано в соответствии с системой нумерации EU или Кэбота.

В определенных вариантах осуществления, связывающее Fc гамма рецептор антитело имеет IgG4 изотип. В некоторых вариантах осуществления, связывающее Fc гамма рецептор антитело содержит постоянную область человеческого IgG4. В некоторых вариантах осуществления, постоянная область человеческого IgG4 включает Fc область. В некоторых вариантах осуществления, связывающее Fc гамма рецептор антитело связывает ингибирующий Fc рецептор. В определенных вариантах осуществления, ингибирующим Fc рецептором является ингибирующий Fc-гамма рецептор IIB (FcγIIB). В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит одно или более аминокислотных замещений (например, относительно Fc область дикого типа того же изотипа). В некоторых вариантах осуществления, одно или более аминокислотных замещений выбирают из L235A, G237A, S228P, L236E (Reddy et al., (2000) J Immunol, 164:1925-1933), S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T и/или T256E, где положение аминокислоты указано в соответствии с системой нумерации EU или Кэбота.

В определенных вариантах осуществления, связывающее Fc гамма рецептор антитело имеет гибридный IgG2/4 изотип. В некоторых вариантах осуществления, связывающее Fc гамма рецептор антитело включает последовательность аминокислот, содержащую аминокислоты 118-260 согласно EU или нумерации по Кэботу человеческого IgG2, и аминокислоты 261-447 согласно EU или нумерации по Кэботу человеческого IgG4 (WO 1997/11971; WO 2007/106585).

В определенных вариантах осуществления, антитело содержит постоянную область мышинового IgG4 (Bartholomaeus, et al. (2014). J. Immunol. 192, 2091-2098).

В некоторых вариантах осуществления, Fc область дополнительно содержит одно или более дополнительных аминокислотных замещений, выбранных из A330L, L234F; L235E, и P331S согласно EU или нумерации по Кэботу; и любое их сочетание.

В определенных вариантах осуществления, антитело содержит одно или более аминокислотных замещений в Fc области в положении остатка, выбранном из C127S, L234A, L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, E345R, E430G, S440Y и любого их сочетания, где нумерацию остатков производят согласно EU или нумерации по Кэботу. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях E430G, L243A, L235A и P331S, где нумерацию остатков производят согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях E430G и P331S, где нумерацию остатков производят согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях E430G и K322A, где нумерацию остатков производят согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях E430G, A330S и P331S, где нумерацию остатков производят согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях E430G, K322A, A330S и P331S, где нумерацию остатков производят согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях E430G, K322A и A330S, где нумерацию остатков производят согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях E430G, K322A и P331S, где нумерацию остатков производят согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях E430G, K322A и P331S, где нумерацию остатков производят согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях S267E и L328F, где нумерацию остатков производят согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положении C127S, где нумерацию остатков производят согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях E345R, E430G и S440Y, где нумерацию остатков производят согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, которые связывают SIRPA белок, могут включать антитела, которые снижают клеточные уровни SIRPA (например, поверхностноклеточные уровни SIRPA), ингибируют взаимодействие (например, связывание) между SIRPA и/или одним или более лигандов SIRPA и ингибирует одну или более активностей белка SIRPA. Такие антитела ингибируют одну или более активностей белка SIRPA либо через предотвращение взаимодействия (например, связывания) между SIRPA и одним или более лигандами SIRPA, либо через предотвращение трансдукции сигнала от внеклеточного домена SIRPA в цитоплазму клетки в присутствии одного или более лигандов SIRPA. Ан-

титела также могут ингибировать одну или более активностей белка SIRPA через снижение поверхностно-клеточных уровней SIRPA, вызывая разрушение SIRPA, десенсибилизацию SIRPA, расщепление SIRPA, интернализацию SIRPA, сбрасывание SIRPA, отрицательную регуляцию экспрессии SIRPA и/или лизосомное разрушение SIRPA. В некоторых вариантах осуществления, такие анти-SIRPA антитела не могут временно активировать SIRPA.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения могут иметь специфичность к эпитопу транзитного агонистического анти-SIRPA антитела настоящего изобретения, но имеют Fc домен, который не способен связывать Fc γ рецепторы и, следовательно, не способен, например, временно накапливать и активировать SIRPA.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения имеют, без ограничения, одну или более следующих активностей: способность снижать связывание белка SIRPA с одним или более лигандами SIRPA, такими как содержащие сиаловую кислоту гликолипиды или содержащие сиаловую кислоту гликобелки, способность снижать связывание белка супрессора цитокиновых сигналов (SOCS) (например, белка SOCS3) с белком SIRPA, способность повышать протеасомальное разрушение белка SIRPA, способность снижать функциональную экспрессию SIRPA на поверхности циркулирующих дендритных клеток, макрофагов, моноцитов, Т-клеток и/или микроглии, способность снижать фосфорилирование Tug-340 и Tug-358 посредством тирозинкиназы семейства Src, такой как LCK и FYN, способность снижать рекрутинг и связывание с фосфатазами SHP1 и SHP2 тирозин-специфического белка, способность снижать рекрутинг и связывание с PLC-g1, который действует как фактор обмена гуаниновых нуклеотидов для Dynamin-1, способность снижать рекрутинг и связывание с Crk1, способность снижать рекрутинг и связывание с селезеночной тирозинкиназой Syk, способность снижать рекрутинг и связывание с SH3-SH2-SH3 связанным с рецептором фактора роста белком 2 (Grb2), способность снижать рекрутинг и связывание с множеством SH2, содержащих белки, способность повышать внутриклеточную мобилизацию кальция, способность модулировать образование провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-8 и TNF- α , способность снижать активацию фосфоинозитид 3-киназы, способность повышать рост моноцитов, макрофагов, дендритных клеток, Т-клеток и/или микроглии, способность повышать выживаемость моноцитов, макрофагов, дендритных клеток, Т-клеток и/или микроглии, способность повышать фосфорилирование тирозина на множестве клеточных белков, способность повышать фагоцитарную активность моноцитов, макрофагов, дендритных клеток и/или микроглии, способность повышать клеточную пролиферацию моноцитов, макрофагов, дендритных клеток, Т-клеток и/или микроглии, способность повышать фосфорилирование сигнальных молекул, которые медируют подачу сигнала ИТАМ, способность повышать функцию рецепторов распознавания структур, способность повышать функцию толл-подобных рецепторов, способность повышать функцию рецепторов молекулярного фрагмента, ассоциированного с повреждением (DAMP), способность модулировать экспрессию С-С хемокинового рецептора 7 (CCR7) и способность повышать клеточный и белковый дебрис.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения имеют Fc область, которая демонстрирует пониженное связывание с одним или более Fc γ рецепторами. Примеры таких Fc областей и модификаций представлены в табл. 3 ниже. В некоторых вариантах осуществления, антитело имеет Fc изотип, перечисленный в табл. 3 ниже.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения с пониженным связыванием с Fc гамма рецепторами, имеют Fc изотип, перечисленный в табл. 3 ниже.

Таблица 3

Типовые Fc изотипы анти-SIRPA антитела с пониженным связыванием с Fc гамма рецептором

Fc изотип	Мутация (схема нумерации EU)
IgG1	N297A или N297Q и/или D270A
IgG1	D265A, D270A и/или N297A
IgG1	L234A и L235A
IgG2	V234A и G237A
IgG4	F235A и G237A и E318A E233P и/или F234V N297A или N297Q
IgG4	S228P и L236E S241P S241P и L248E S228P и F234A и L235A
IgG2	H268Q и V309L и A330S и P331S
IgG1	C220S и C226S и C229S и P238S
IgG1	C226S и C229S и E233P и L234V и L235A
IgG1	E233P и L234V и L235A и G236-удален P238A D265A N297A A327Q или A327G P329A
IgG1	K322A и L234A и L235A
IgG1	L234F и L235E и P331S
IgG1 или IgG4	T394D
IgG2	C232S или C233S N297A или N297Q
IgG2	V234A и G237A и P238S и H268A и V309L и A330S и P331S
IgG1, IgG2 или IgG4	дельта a, b, c, ab, ac, g модификации
IgG1	Любые из вышеперечисленных мутаций вместе с A330L или L234F и/или L235E и/или P331S
IgG1, IgG2 или IgG4	Любые из вышеперечисленных мутаций вместе с M252Y и/или S254T и/или T256E

В определенных вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело имеет IgG1 изотип. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит постоянную область мышинового IgG1. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит постоянную область человеческого IgG1. В некоторых вариантах осуществления, постоянная область человеческого IgG1 включает Fc область. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит одно или более аминокислотных замещений (например, относительно Fc области дикого типа того же изотипа).

В некоторых вариантах осуществления, одно или более аминокислотных замещений выбирают из N297A, N297Q (Bolt S et al. (1993) Eur J Immunol 23:403-411), D265A, D270A, L234A, L235A (McEarchern et al., (2007) Blood, 109:1185-1192), C226S, C229S (McEarchern et al., (2007) Blood, 109:1185-1192), P238S (Davis et al., (2007) J Rheumatol, 34:2204-2210), E233P, L234V (McEarchern et al., (2007) Blood, 109:1185-1192), P238A, A327Q, A327G, P329A (Shields RL, et al., (2001) J Biol Chem. 276(9):6591-604), K322A, L234F, L235E (Hezareh, et al., (2001) J Virol 75, 12161-12168; Oganessian et al., (2008). Acta Crystallographica 64, 700-704), P331S (Oganessian et al., (2008) Acta Crystallographica 64, 700-704), T394D (Wilkinson et al. (2013) MAbs 5(3): 406-417), A330L, M252Y, S254T, и/или T256E, где положение аминокислоты указано в

соответствии с системой нумерации EU или Кэбота. В определенных вариантах осуществления, Fc область дополнительно включает делецию аминокислоты в положении, соответствующем глицину 236 согласно системе нумерации EU или Кэбота.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело имеет IgG1 изотип с постоянной областью тяжелой цепи, которая содержит C220S аминокислотное замещение согласно системе нумерации EU или Кэбота. В некоторых вариантах осуществления, Fc область дополнительно содержит одно или более дополнительных аминокислотных замещений, выбранных из A330L, L234F; L235E, и/или P331S согласно системе нумерации EU или Кэбота. В определенных вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело имеет IgG2 изотип. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело содержит постоянную область человеческого IgG2. В некоторых вариантах осуществления, постоянная область человеческого IgG2 включает Fc область. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит одно или более аминокислотных замещений (например, относительно Fc области дикого типа того же изотипа). В некоторых вариантах осуществления, одно или более аминокислотных замещений выбирают из P238S, V234A, G237A, H268A, H268Q, H268E, V309L, N297A, N297Q, V309L, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T и/или T256E, где положение аминокислоты указано в соответствии с системой нумерации EU или Кэбота (Vafa O. et al., (2014) *Methods* 65:114-126).

В определенных вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело имеет IgG4 изотип. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело содержит постоянную область человеческого IgG4. В некоторых вариантах осуществления, постоянная область человеческого IgG4 включает Fc область. В некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах осуществления, Fc область содержит одно или более аминокислотных замещений (например, относительно Fc области дикого типа того же изотипа). В некоторых вариантах осуществления, одно или более аминокислотных замещений выбирают из E233P, F234V, L235A, G237A, E318A (Hutchins et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:11980-11984), S228P, L234A/F234A, L236E, S241P, L248E (Reddv et al., (2000) *J Immunol*, 164:1925-1933; Angal et al., (1993) *Mol Immunol*. 30(1):105-8; US 8614299 B2; Vafa O. et al., (2014) *Methods* 65:114-126), T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A и/или N297Q, где положение аминокислоты указано в соответствии с системой нумерации EU или Кэбота. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет IgG4 изотип и содержит S228P аминокислотное замещение в положении остатка 228, F234A аминокислотное замещение в положении остатка 234 и L235A аминокислотное замещение в положении остатка 235 (положение остатка согласно нумерации EU).

В некоторых вариантах осуществления, Fc область дополнительно содержит одно или более дополнительных аминокислотных замещений, выбранных из M252Y, S254T и/или T256E, где положение аминокислоты указано в соответствии с системой нумерации EU или Кэбота.

В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных здесь, модифицированным антителом Fc является IgG1 модифицированное Fc. В некоторых вариантах осуществления, IgG1 модифицированное Fc содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах осуществления, IgG1 модифицированное Fc содержит одно или более аминокислотных замещений (например, относительно Fc области дикого типа того же изотипа). В некоторых вариантах осуществления, одно или более аминокислотных замещений выбирают из N297A (Bolt S et al. (1993) *Eur J Immunol* 23:403-411), D265A (Shields et al. (2001) *R. J. Biol. Chem.* 276, 6591-6604), L234A, L235A (Hutchins et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:11980-11984; Alegre et al., (1994) *Transplantation* 57:1537-1543. 31; Xu et al., (2000) *Cell Immunol*, 200:16-26), G237A (Alegre et al. (1994) *Transplantation* 57:1537-1543. 31; Xu et al. (2000) *Cell Immunol*, 200:16-26), C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E (McEarchern et al., (2007) *Blood*, 109:1185-1192), P331S (Sazinsky et al., (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105:20167-20172), S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T и/или T256E, где положение аминокислоты указано согласно системе нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, Fc содержит N297A мутацию согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, Fc содержит D265A и N297A мутации согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, Fc содержит D270A мутации согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, IgG1 модифицированных Fc содержит L234A и L235A мутации согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, Fc содержит L234A и G237A мутации согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, Fc содержит L234A, L235A и G237A мутации согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, Fc содержит одну или более (включая все) из P238D, L328E, E233, G237D, H268D, P271G и A330R мутаций согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, Fc содержит одну или более из S267E/L328F мутаций согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, Fc содержит P238D, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G и A330R мутации согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1

модифицированных Fc, Fc содержит P238D, L328E, G237D, H268D, P271G и A330R мутации согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, Fc содержит P238D, S267E, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G и A330R мутации согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, Fc содержит P238D, S267E, L328E, G237D, H268D, P271G и A330R мутации согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, Fc содержит C226S, C229S, E233P, L234V и L235A мутации согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, Fc содержит L234F, L235E и P331S мутации согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, Fc содержит S267E и L328F мутации согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, Fc содержит S267E мутации согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, Fc содержит заместитель постоянной тяжелой 1 (CH1) и шарнирной области IgG1 с CH1 и шарнирной области IgG2 (аминокислоты 118-230 IgG2 согласно нумерации EU) с каппа легкой цепью.

В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, Fc включает два или более аминокислотных замещений, которые повышают скопление без активации комплемента по сравнению с соответствующим антителом, имеющим Fc область, которая не включает два или более аминокислотных замещений. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, IgG1 модифицированным Fc является антитело, содержащее Fc область, где антитело содержит аминокислотное замещение в положении E430G и одно или более аминокислотных замещений в Fc области в положении остатка, выбранном из: L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S и любого их сочетания согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, IgG1 модифицированный Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E430G, L243A, L235A и P331S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, IgG1 модифицированный Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E430G и P331S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, IgG1 модифицированный Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E430G и K322A согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, IgG1 модифицированный Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E430G, A330S и P331S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, IgG1 модифицированный Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E430G, K322A, A330S и P331S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, IgG1 модифицированный Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E430G, K322A и A330S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления, IgG1 модифицированный Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E430G, K322A и P331S согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированных Fc, IgG1 модифицированный Fc может дополнительно содержать в данном документе может быть объединен с A330L мутацией (Lazar et al. Proc Natl Acad Sci USA, 103:4005-4010(2006)) или одной или более из L234F, L235E и/или P331S мутаций (Sazinsky et al. Proc Natl Acad Sci USA, 105:20167-20172(2008)), согласно системе нумерации EU, для исключения активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированного Fc, IgG1 модифицированный Fc может дополнительно содержать одну или более из A330L, A330S, L234F, L235E и/или P331S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированного Fc, IgG1 модифицированный Fc может дополнительно содержать одну или более мутаций для улучшения периода полужизни антитела в человеческой сыворотке (например, одну или более (включая все) из M252Y, S254T и T256E мутаций согласно системе нумерации EU). В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 модифицированного Fc, IgG1 модифицированный Fc может дополнительно содержать одну или более из E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и/или S440W, согласно нумерации EU.

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к антителам, имеющим модифицированные постоянные области (т.е., Fc области). Антитело, зависимое от связывания с FcγR рецептором для активации целевых рецепторов, могут терять свое агонистическое действие, если сконструированы для исключения FcγR связывания (см., например, Wilson et al. Cancer Cell 19:101-113 (2011); Armour et al. Immunology 40:585-593(2003); и White et al. Cancer Cell 27:138-148(2015)). Таким образом, считается, что анти-SIRPA антитело настоящего изобретения с правильной специфичностью эпитопа может активировать целевой антиген, с минимальными побочными эффектами, если антитело имеет Fc домен от человеческого IgG2 изотипа (CH1 и шарнирную область) или другой тип Fc домена, который способен преимущественно связывать ингибирующие FcγRIIB рецепторы или их варианты.

В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных здесь, модифицированным антителом Fc является IgG2 модифицированное Fc. В некоторых вариантах осуществления, IgG2 модифицированный Fc содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах осуществления, IgG2 модифицированный Fc содержит одно или более аминокислотных замещений (например, относительно Fc области дикого типа того же изотипа). В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированных Fc, одно или более аминокислотных замещений выбирают из V234A

(Alegre et al. *Transplantation* 57:1537-1543(1994); Xu et al. *Cell Immunol*, 200:16-26(2000)): G237A (Cole et al. *Transplantation*, 68:563-571(1999)); H268Q, V309L, A330S, P331S (US 2007/0148167; Armour et al. *Eur J Immunol* 29: 2613-2624(1999); Armour et al. *The Haematology Journal* 1 (Suppl.1):27(2000); Armour et al. *The Haematology Journal* 1 (Suppl.1):27(2000)). C219S, и/или C220S (White et al. *Cancer Cell* 27, 138-148 (2015)): S267E, L328F (Chu et al. *Mol Immunol*, 45:3926-3933(2008)): и M252Y, S254T, и/или T256E согласно системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положениях V234A и G237A согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положениях C219S или C220S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положениях A330S и P331S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положениях S267E и L328F согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит C127S аминокислотное замещение согласно системе нумерации EU (White et al., (2015) *Cancer Cell* 27, 138-148; Lightle et al. *Protein Sci*, 19:753-762(2010); и WO2008/079246). В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированных Fc, антитело имеет IgG2 изотип с постоянным доменом каппа легкой цепи, который содержит C214S аминокислотное замещение согласно системе нумерации EU (White et al. *Cancer Cell* 27:138-148(2015); Lightle et al. *Protein Sci*, 19:753-762(2010); и WO2008/079246).

В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит C220S аминокислотное замещение согласно системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированных Fc, антитело имеет IgG2 изотип с постоянным доменом каппа легкой цепи, который содержит C214S аминокислотное замещение согласно системе нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит C219S аминокислотное замещение согласно системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированных Fc, антитело имеет IgG2 изотип с постоянным доменом каппа легкой цепи, который содержит C214S аминокислотное замещение согласно системе нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированных Fc, Fc включает IgG2 изотип постоянного домена 1(CH1) и шарнирной области тяжелой цепи (White et al. *Cancer Cell* 27:138-148(2015)). В определенных вариантах любого из IgG2 модифицированных Fc, IgG2 изотип CH1 и шарнирная область содержит последовательность аминокислот 118-230 согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированных Fc, антитело Fc область содержит S267E аминокислотное замещение, L328F аминокислотное замещение или оба, и/или N297A или N297Q аминокислотное замещение согласно системе нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированного Fc, Fc дополнительно содержит одно или более аминокислотных замещений в положениях E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированных Fc, Fc может дополнительно содержать одну или более мутаций для улучшения периода полужизни антитела в человеческой сыворотке (например, одну или более (включая все) M252Y, S254T и T256E мутаций согласно системе нумерации EU). В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированных Fc, Fc может дополнительно содержать A330S и P331S.

В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированных Fc, Fc является IgG2/4 гибридным Fc. В некоторых вариантах осуществления, IgG2/4 гибридный Fc содержит IgG2 aa 118-260 и IgG4 aa 261-447. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит одно или более аминокислотных замещений в положениях H268Q, V309L, A330S и P331S согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 и/или IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит одно или более дополнительных аминокислотных замещений, выбранных из A330L, L234F, L235E или P331S согласно нумерации EU; и любых их сочетаний.

В определенных вариантах осуществления любого из IgG1 и/или IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит одно или более аминокислотных замещений в положении остатка, выбранном из C127S, L234A, L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, E345R, E430G, S440Y и любого их сочетания согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 и/или IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E430G, L243A, L235A и P331S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 и/или IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E430G и P331S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 и/или IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E430G и K322A согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 и/или IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E430G, A330S и P331S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 и/или IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное

замещение в положениях E430G, K322A, A330S и P331S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 и/или IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E430G, K322A и A330S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 и/или IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E430G, K322A и P331S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 и/или IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положениях S267E и L328F согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 и/или IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положении C127S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG1 и/или IgG2 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E345R, E430G и S440Y согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных здесь, модифицированным антителом Fc является IgG4 модифицированное Fc. В некоторых вариантах осуществления, IgG4 модифицированное Fc содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах осуществления, IgG4 модифицированное Fc содержит одно или более аминокислотных замещений (например, относительно Fc области дикого типа того же изотипа). В некоторых вариантах осуществления любого из IgG4 модифицированных Fc, одно или более аминокислотных замещений выбирают из L235A, G237A, S229P, L236E (Reddy et al. *J Immunol* 164:1925-1933(2000)), S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T и/или T256E согласно системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG4 модифицированных Fc, Fc может дополнительно содержать L235A, G237A и E318A согласно системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG4 модифицированных Fc, Fc может дополнительно содержать S228P и L235E согласно системе нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG4 модифицированных Fc, IgG4 модифицированное Fc может дополнительно содержать S267E и L328F согласно системе нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления любого из IgG4 модифицированных Fc, IgG4 модифицированное Fc может быть объединено с S228P мутацией согласно системе нумерации EU (Angal et al. *Mol Immunol.* 30:105-108 (1993)) и/или с одной или более мутаций, описанных в (Peters et al. *J Biol Chem.* 287(29):24525-33 (2012)) для улучшения стабилизации антитела.

В некоторых вариантах осуществления любого из IgG4 модифицированных Fc, IgG4 модифицированное Fc может дополнительно содержать одну или более мутаций для улучшения периода полужизни антитела в человеческой сыворотке (например, одну или более (включая все) из M252Y, S254T и T256E мутаций согласно системе нумерации EU).

В некоторых вариантах осуществления любого из IgG4 модифицированных Fc, Fc содержит L235E согласно нумерации EU. В определенных вариантах осуществления любого из IgG4 модифицированных Fc, Fc содержит одно или более аминокислотных замещений в положении остатка, выбранном из C127S, F234A, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, E345R, E430G, S440Y и любое их сочетание, согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG4 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E430G, L243A, L235A и P331S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG4 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E430G и P331S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG4 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E430G и K322A согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG4 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положении E430 согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG4 модифицированных Fc, Fc область содержит аминокислотное замещение в положениях E430G и K322A согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG4 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положениях S267E и L328F согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG4 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положении C127S согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любого из IgG4 модифицированных Fc, Fc содержит аминокислотное замещение в положениях E345R, E430G и S440Y согласно нумерации EU.

Другие модификации антитела.

В некоторых вариантах осуществления любого из антитела, антителом является производное. Термин "производное" относится к молекуле, которая включает химические модификации, отличные от вставки, делеции или замещения аминокислот (или нуклеиновых кислот). В определенных вариантах осуществления, производные содержат ковалентные модификации, включая, но не ограничиваясь ими, химическое связывание с полимерами, липидами или другими органическими или неорганическими группами. В определенных вариантах осуществления, химически модифицированный антигенсвязывающий белок может иметь больший период полужизни в кровотоке, чем антигенсвязывающий белок, который не модифицирован химически. В определенных вариантах осуществления, химически модифицированный антигенсвязывающий белок может иметь улучшенную эффективность нацеливания на желаемые клетки, ткани и/или органы. В некоторых вариантах осуществления, производный антигенсвязывающий белок ковалентно модифицирован для включения одного или более водорастворимых полимерных присоединений, включая, но не ограничиваясь ими, полиэтиленгликоль, полиоксипропиленгликоль или

пропиленгликоль. Смотрите, например, патенты США №№ 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 и 4179337. В определенных вариантах осуществления, производный антигенсвязывающий белок содержит один или более полимеров, включающих, но не ограниченных ими, монометоксиполиэтиленгликоль, декстран, целлюлозу, сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидинон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры), поли-(N-винилпирролидинон)-полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимер полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин) и поливиниловый спирт, а также смеси таких полимеров.

В определенных вариантах осуществления, производное ковалентно модифицировано подъединицами полиэтиленгликоля (ПЭГ). В определенных вариантах осуществления, один или более водорастворимых полимеров связаны в одном или более определенных положений, например, на amino окончании, производного. В определенных вариантах осуществления, один или более водорастворимых полимеров произвольно присоединены к одной или более боковых цепей производного. В определенных вариантах осуществления, ПЭГ применяют для улучшения терапевтической эффективности для антигенсвязывающего белка. В определенных вариантах осуществления, ПЭГ применяют для улучшения терапевтической эффективности гуманизованного антитела. Определенные такие способы обсуждаются, например, в патенте США № 6133426, который включен сюда в качестве ссылки для любых целей.

Пептидные аналоги обычно применяют в фармацевтической промышленности в качестве не пептидных лекарственных средств со свойствами, аналогичными таковым шаблонных пептидов. Эти типы не пептидного соединения называют "пептидные миметики" или "пептидомиметики." Fauchere, J. *Adv. Drug Res.*, 15:29 (1986); и Evans et al. *J. Med. Chem.*, 30:1229 (1987), которые включены сюда в качестве ссылки для всех целей. Такие соединения часто разрабатывают с помощью компьютеризованного молекулярного моделирования. Пептидомиметики, которые структурно похожи на терапевтически применяемые пептиды, могут применяться для получения похожего терапевтического или профилактического эффекта. В общем, пептидомиметики структурно похожи на образцовый полипептид (т.е., полипептид, который имеет биохимическое свойство или фармакологическую активность), такой как человеческое антитело, но имеют одну или более пептидных связей, необязательно замещенных связью, выбранной из: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (цис и транс), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_2\text{SO}-$, способами, хорошо известным в данной области техники. Систематическое замещение одной или более аминокислот консенсусной последовательности D-аминокислотой того же типа (например, D-лизином вместо L-лизина) может применяться в определенных вариантах осуществления для создания более стабильных пептидов. Кроме того, пептиды с ограниченной конформационной свободой, содержащие консенсусную последовательность или по существу идентичный вариант консенсусной последовательности, могут быть созданы способами, известными в данной области техники (Rizo и Gierasch *Ann. Rev. Biochem.*, 61:387 (1992), включено сюда в качестве ссылки для любых целей); например, добавлением внутренних цистеиновых остатков, способных образовывать внутримолекулярные дисульфидные мостики, которые циклизуют пептид.

Конъюгирование лекарственных средств включает сочетание биологически активной цитотоксичной (противораковой) загрузки или лекарственного средства с антителом, которое специфически поражает определенный опухолевый маркер (например, полипептид, который, в идеале, находится только на или в опухолевых клетках). Антитела отслеживают эти белки в теле и сами присоединяются к поверхности раковых клеток. Биохимическая реакция между антителом и целевым белком (антигеном) запускает сигнал в опухолевую клетку, которая затем абсорбирует или интернализует антитело вместе с цитотоксином. После интернализации ADC, цитотоксическое лекарственное средство выделяется и убивает рак. Благодаря такому нацеливанию, в идеале, лекарственное средство имеет меньше побочных эффектов и дает более широкое терапевтическое окно, чем другие химиотерапевтические агенты. Методы конъюгирования антител описаны и известны в данной области техники (см, например, Jane de Lartigue *OncLive* July 5, 2012; ADC Review on antibody-drug conjugates; и Ducry et al. *Bioconjugate Chemistry* 21 (1):5-13 (2010).

Каркасные участки антитела.

Любые анти-SIRPA антитела, описанные здесь, дополнительно включают каркасный участок (КО). В некоторых вариантах осуществления, каркасным участком является каркасный участок человеческого иммуноглобулина. Например, в некоторых вариантах осуществления, антитело (например, анти-SIRPA антитело) содержит HVR, как в любом из вышеуказанных вариантов осуществления, и дополнительно содержит акцепторный человеческий каркасный участок, например, каркасный участок человеческого иммуноглобулина или человеческий консенсусный каркасный участок. Каркасные участки человеческого иммуноглобулина могут быть частью человеческого антитела, или не человеческого антитела может быть гуманизован замещением одного или более эндогенных каркасных участков человеческой каркасной области(ями). Человеческие каркасные области, которые могут применяться для гуманизации, включают, но не ограничены ими: каркасные области, выбранные способом "наилучшей подгонки" (см., например, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); каркасные области, полученные из консенсусной по-

следовательности человеческого антитела конкретной подгруппы варибельной области легкой или тяжелой цепей (см., например, Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); и Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993)); человеческие зрелые (соматически мутированные) каркасные области или человеческие зародышевые каркасные области (см., например, Almagro и Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)); и каркасные области, полученные скринингом КО библиотек (см., например, Vasa et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) и Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)).

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую одну или более (например, одну или более, две или более, три или более или все четыре) каркасные области, выбранные из VH FR1, VH FR2, VH FR3 и VH FR4 (как показано в табл. 9). В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую VH FR1, где VH FR1 содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 25. В некоторых вариантах осуществления и анти-SIRPA антитело настоящего изобретения содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую VH FR2, где VH FR2 содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 26. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую VH FR3, где VH FR3 содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 27. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую VH FR4, где VH FR4 содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 28. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую VH FR1, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 25, VH FR2, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 26, VH FR3, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 27 и VH FR4, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 28.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую VH FR1, VH FR2, VH FR3 и VH FR4 анти-SIRPA антитела 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24 или 3F9-25.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения содержит варибельную область легкой цепи, содержащую одну или более (например, одну или более, две или более, три или более или все четыре) каркасные области, выбранные из VL FR1, VL FR2, VL FR3 и VL FR4 (как показано в табл. 9). В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения содержит варибельную область легкой цепи, содержащую VL FR1, где VL FR1 содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 29. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения содержит варибельную область легкой цепи, содержащую VL FR2, где VL FR2 содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 30. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения содержит варибельную область легкой цепи, содержащую VL FR3, где VL FR3 содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 31. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения содержит варибельную область легкой цепи, содержащую VL FR4, где VL FR4 содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 32. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения содержит варибельную область легкой цепи, содержащую VL FR1, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 29, VL FR2, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 30, VL FR3, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 31 и VL FR4, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 32.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения содержит варибельную область легкой цепи, содержащую VL FR1, VL FR2, VL FR3 и VL FR4 анти-SIRPA антитела 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24 или 3F9-25.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую VH FR1, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 25, VH FR2, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 26, VH FR3, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 27, и VH FR4, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 28, и варибельную область легкой цепи, содержащую VL FR1, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 29, VL FR2, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 30, VL FR3, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 31 и VL FR4, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 32. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую VH FR1, VH FR2, VH FR3 и VH FR4 антитела 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-

4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24 или 3F9-25, и варибельную область легкой цепи, содержащую VL FR1, VL FR2, VL FR3 и VL FR4 антитела 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-

21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24 или 3F9-25.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение представляет анти-SIRPA антитело, где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 47 и легкая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 50.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение представляет анти-SIRPA антитело, где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 48 и легкая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 50.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение представляет анти-SIRPA антитело, где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 49 и легкая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 50.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение представляет анти-SIRPA антитело, где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 51 и легкая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 50.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение представляет анти-SIRPA антитело, где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 52 и легкая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 50.

Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева.

Анти-SIRPA антитела настоящего изобретения могут быть получены с применением рекомбинантных способов и композиций, например, как описано в патенте США № 4816567. В некоторых вариантах осуществления, представлены выделенные нуклеиновые кислоты, имеющие нуклеотидные последовательности, кодирующие любое из анти-SIRPA антител настоящего изобретения. Такие нуклеиновые кислоты могут кодировать последовательность аминокислот, содержащую V_L , и/или последовательность аминокислот, содержащую V_H анти-SIRPA антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела). В некоторых вариантах осуществления, представлен один или более векторов (например, векторы экспрессии), содержащих такие нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления, также представлена клетка-хозяин, содержащая такие нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления, клетка-хозяин содержит (например, была трансдуцирована с): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует последовательность аминокислот, содержащую V_L антитела и последовательность аминокислот, содержащую V_H антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует последовательность аминокислот, содержащую V_L антитела и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует последовательность аминокислот, содержащую V_H антитела. В некоторых вариантах осуществления, клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичников китайского хомяка (CHO) или лимфоидной клеткой (например, Y0, NS0, Sp20 клеткой). Клетки-хозяева настоящего изобретения также включают, без ограничения, выделенные клетки, *in vitro* культивируемые клетки и *ex vivo* культивируемые клетки.

Представлены способы получения анти-SIRPA антитела настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления, способ включает культивирование клетки-хозяева настоящего изобретения, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую анти-SIRPA антитело, в условиях, подходящих для экспрессии антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело затем восстанавливают из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

Для рекомбинантного получения анти-SIRPA антитела настоящего изобретения, нуклеиновую кислоту, кодирующую анти-SIRPA антитело, выделяют и вставляют в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такая нуклеиновая кислота может быть легко изолирована и секвенирована с применением обычных методов (например, с применением олигонуклеотидных проб, которые способны связываться специфически с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Подходящие векторы, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую анти-SIRPA антитела настоящего изобретения или их экспрессированные на поверхности клеток фрагменты или полипептиды, полипептиды (включая антитела), описанные здесь, включают, без ограничения, векторы клонирования и векторы экспрессии. Подходящие векторы клонирования, которые могут быть сконструированы стандартными методами или могут быть выбраны из большого количества векторов клонирования, доступны в данной области техники. Хотя выбранный вектор клонирования может варьироваться в соответствии с выбранной для использования клеткой-хозяином, полезные векторы клонирования обычно обладают способностью самореплицироваться, могут содержать одну цель для конкретной рестрикционной эндонуклеазы и/или могут нести гены для маркера, которые могут применяться в выборе клонов, содержащих вектор. Подходящие примеры включают плазмиды и бактериальные вирусы, например, pUC18, pUC19, Bluescript (например, pBS SK+) и их производные, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, фаговые ДНК и бифункциональные векторы, такие как pSA3 и pAT28. Эти и многие другие векторы клонирования доступны от коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Strategene и Invitrogen.

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии антитело-кодирующих векторов включают прокариотические или эукариотические клетки. Например, анти-SIRPA антитела настоящего

изобретения могут быть получены в бактериях, в частности, когда гликозилирование и Fc эффекторная функция не нужны. Для экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях (например, патенты США №№ 5648237, 5789199 и 5840523). После экспрессии, антитело может быть выделено из пасты бактериальной клетки в растворимой фракции, и может быть далее очищено.

В дополнение к прокариотам, эукариотические микроорганизмы, такие как гифомицеты или дрожжи, являются также подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии для антитело-кодирующих векторов, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были "гуманизированы" с получением образования антитела с частичным или полным человеческим шаблоном гликозилирования (например, Gerngross *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004); и Li et al. *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)).

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела также могут быть получены из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Было идентифицировано множество бакуловирусных штаммов, которые могут применяться в сочетании с клетками насекомых, в частности, для трансфекции клеток *Sporoptera frugiperda*. Культуры растительных клеток также могут применяться в качестве хозяев (например, патенты США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429, описывающие технологию PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях).

Клетки позвоночных также могут применяться в качестве хозяев. Например, колонии клеток млекопитающих, которые адаптированы для выращивания в суспензии, могут быть полезны. Другие примеры полезных колоний клеток-хозяев млекопитающих включают колонию клеток почек обезьяны CV1, трансформированную SV40 (COS-7); колонию клеток почек человеческого эмбриона (293 или 293 клеток, как описано, например, в Graham et al. *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977)); клетки почек новорожденного хомяка (BHK); мышинные клетки Сертоли (TM4 клетки, описанные, например, в Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); обезьяньи почечные клетки (CV1); клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки человеческой карциномы шейки матки (HELA); клетки почек собаки (MDCK); клетки почек серой крысы (BRL 3A); клетки человеческого легкого (W138); клетки человеческой печени (Hep G2); клетки мышинной опухоли молочной железы (MMT 060562); клетки TRI, как описаны, например, в Mather et al. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); MRC 5 клетки; и FS4 клетки. Другие полезные колонии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичников китайского хомяка (CHO), включая DHFR-CHO клетки (Urlaub et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и колонии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор определенных колоний клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для выработки антитела, смотрите, например, в Yazaki и Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

Фармацевтические композиции/составы.

В данном документе представлены фармацевтические композиции и/или фармацевтические составы, содержащие анти-SIRPA антитела настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтически приемлемый носитель предпочтительно нетоксичен для реципиентов в используемых дозах и концентрациях. Описанные здесь антитела могут быть включены в состав препаратов в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной форме. Примеры таких составов включают, без ограничения, таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, суппозитории, инъекции, ингаляторы, гели, микросферы и аэрозоли. Фармацевтически приемлемые носители могут включать, в зависимости от желаемого состава, фармацевтически приемлемые нетоксичные носители разбавителей, которые представляют собой носители, обычно используемые для составления фармацевтических композиций для введения животным или людям. В определенных вариантах осуществления, фармацевтическая композиция может содержать составные материалы для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникновения композиции.

В определенных вариантах осуществления, фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничены ими, аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин); противомикробные препараты; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как борат, бикарбонат, трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты); наполнители (такие как маннит или глицин); хелатирующие агенты (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК)); комплексообразующие агенты (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды; и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); красители, ароматизаторы и разбавители; эмульгаторы; гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенэтиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгли-

коль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие агенты; поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты (такие как Pluronic, ПЭГ, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат 80, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал); агенты, повышающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); агенты, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит сорбит); средства доставки; разбавители; эксципиенты и/или фармацевтические адъюванты. Дополнительные примеры составов, подходящих для различных типов введения, можно найти в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Pharmaceutical Press 22nd ed. (2013). Краткий обзор способов доставки лекарственных средств смотрите в Langer, Science 249:1527-1533 (1990).

Составы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные, изотонические стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические вещества и растворенные вещества, которые делают состав изотоничным крови предполагаемого реципиента, и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты.

Составы могут быть оптимизированы для удержания и стабилизации в головном мозге или центральной нервной системе. Когда агент вводится в черепной отдел, желателно, чтобы агент оставался в отделе и не распространялся или иным образом не пересекал гематоэнцефалический барьер. Методы стабилизации включают перекрестное сшивание, мультимеризацию или связывание с группами, такими как полиэтиленгликоль, полиакриламид, носители нейтрального белка и т.д. для достижения увеличения молекулярной массы.

Другие стратегии увеличения удерживания включают улавливание антитела, такого как анти-SIRPA антитело настоящего изобретения, в биоразлагаемый или биоразрушаемый имплант. Скорость высвобождения терапевтически активного агента контролируется скоростью транспорта через полимерную матрицу и биоразложения имплантата. Имплантаты могут быть частицами, листами, пластырями, бляшками, волокнами, микрокапсулами и подобными, и могут иметь любой размер или форму, совместимую с выбранным местом введения. Биоразлагаемые полимерные композиции, которые могут быть использованы, могут быть органическими сложными или простыми эфирами, которые при разложении приводят к физиологически приемлемым продуктам разложения, включая мономеры. Могут найти применение ангидриды, амиды, сложные ортоэфиры или подобные, сами по себе или в сочетании с другими мономерами. Полимеры будут конденсационными полимерами. Полимеры могут быть поперечно сшитыми или не поперечно сшитыми. Особенный интерес представляют полимеры гидроксипалифатических карбоновых кислот, либо гомо-, либо сополимеры и полисахариды. Представляющие интерес сложные полиэфиры включают полимеры D-молочной кислоты, L-молочной кислоты, рацемической молочной кислоты, гликолевой кислоты, поликапролактона и их сочетания. Представляющие интерес полисахариды включают альгинат кальция и функционализированные целлюлозы, в частности, сложные эфиры карбоксиметилцеллюлозы, характеризующиеся тем, что они водорастворимые, имеют молекулярную массу от около 5 кД до 500 кД и т.д. Биоразлагаемые гидрогели также могут применяться в имплантатах настоящего изобретения. Гидрогели обычно являются сополимерным материалом, характеризующимся способностью впитывать жидкость.

Терапевтическое применение.

Как описано в данном документе, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения могут применяться для профилактики, снижения риска или лечения заболеваний и расстройств.

В одном аспекте изобретения, агент, который отрицательно регулирует SIRPA, например, анти-SIRPA антитело, применяют в качестве терапевтического агента. Такие агенты вводят для лечения, облегчения и/или профилактики заболевания или патологии, связанной экспрессией, активностью и/или подачей сигналов SIRPA у субъекта. Схему лечения проводят идентификацией субъекта, например, пациента-человека, страдающего от (или подверженного риску развития) заболевания или расстройства, связанного с экспрессией, активностью и/или подачей сигналов SIRPA, например, рака или других онкопролиферативных заболеваний, с применением стандартных способов. В некоторых вариантах осуществления, клетки, имеющие патологию, связанную с экспрессией, активностью и/или подачей сигналов SIRPA, экспрессируют лиганд SIRPA, например, CD47. В некоторых вариантах осуществления, клетки, имеющие патологию, связанную с экспрессией, активностью и/или подачей сигналов SIRPA, экспрессируют SIRPA.

Как подробно описано ниже, агент, который отрицательно регулирует SIRPA, например, анти-SIRPA антитело, может применяться в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом, который применяют для лечения заболевания или патологии, связанной с экспрессией, активностью и/или подачей сигналов SIRPA. Термины "в сочетании" и "совместно" применяются взаимозаменяемо в настоящем изобретении. Дополнительный терапевтический агент, вводимый в сочетании с анти-SIRPA антителом, может вводиться до, после или одновременно с агентом, который отрицательно регулирует SIRPA, например, анти-SIRPA антителом.

В одном аспекте настоящего изобретения, препарат анти-SIRPA антитела, например, содержащий анти-SIRPA антитело, которое снижает экспрессию SIRPA на клеточной поверхности, но по существу не

блокирует связывание лиганда, например, CD47, с SIRPA, вводят человеку. Введение антитела может подавлять или ингибировать или вмешиваться в экспрессию, активность и/или сигнальную функцию SIRPA, которая медируется лигандным связыванием, например, CD47 связыванием.

В одном варианте осуществления заболеванием или расстройством с SIRPA экспрессией является рак. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело вводят пациенту, который имеет рак, такой как гематологическое пролиферативное расстройство миелоидных клеток, которые экспрессируют SIRPA. В типовых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело вводят пациенту, который имеет рак, экспрессирующий CD47.

В определенных вариантах осуществления, рак, предотвращаемый и лечимый способами настоящего изобретения, включает, без ограничения, плоскоклеточную карциному (например, эпителиальную плоскоклеточную карциному), рак легких, мелкоклеточный рак легких, не мелкоклеточный рак легких, плоскоклеточный не мелкоклеточный рак легких (НМКРЛ), аденокарциному легких, плоскоклеточную карциному легких, не плоскоклеточный НМКРЛ, глиому, рак брюшной полости, печеночно-клеточный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак ЖКТ или желудка, включая рак ЖКТ стромальный рак ЖКТ, рак почек (например, светлоклеточную карциному), рак яичников, рак печени, колоректальный рак, рак эндометрия, рак почек (например, почечно-клеточную карциному (ПКК)), рак простаты (например, гормонорезистентный рак простаты), рак щитовидной железы, нейробластома, рак поджелудочной железы, глиобластома (мультиформную глиобластома), рак шейки матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатому, рак груди, карциному толстой кишки, и рак головы и шеи (или карциному), рак ЖКТ, герминогенную опухоль, детскую саркому, синоназальный рак из натуральных киллеров, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому, такую как кожная или внутриглазная злокачественная меланомы), рак кости, рак кожи, рак матки, рак анальной области, рак яичек, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягкой ткани, рак уретры, рак пениса, солидные детские опухоли, рак мочеточников, карциному почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичная лимфома ЦНС, миелодиспластические синдромы, колоректальные новообразования, солидные опухоли, ангиогенез опухоли, опухоль оси позвоночника, рак ствола головного мозга, эозинофильную аденому, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, раки, вызванные условиями окружающей среды, включая такие, которые вызваны асбестом, вирусные раки (например, опухоль, вызванная папилломавирусом человека (HPV)) и гематологические злокачественные образования, полученные из любой из двух основанных колоний кровяных клеток, т.е., колонии миелоидных клеток (которые вырабатывают гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и мастоциты) или колонии лимфоидных клеток (которые вырабатывают клетки В, Т, NK и плазмы), такие как все типы лейкозов, лимфом и миелом, например, острый, хронический, лимфоцитарный и/или миелогенный лейкозы, такие как острый лейкоз (ОЛЛ), острый миелогенный лейкоз (ОМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), недифференцированный ОМЛ (M0), миелобластный лейкоз (M1), миелобластный лейкоз (M2; с клеточной мутацией), промиелоцитарный лейкоз (M3 или M3 вариант [M3V]), миеломоноцитарный лейкоз (M4 или M4 вариант эозинофилии [M4E]), моноцитарный лейкоз (M5), эритролейкоз (M6), мегакариобластный лейкоз (M7), выделенная гранулоцитарная саркома и хлорома; лимфомы, такие как лимфома Ходжкина (ЛХ), неходжкинская лимфома (NHL), индолентная лимфома, В-крупноклеточная диффузная лимфома, В-клеточное гематологическое злокачественное новообразование, например, В-клеточные лимфомы, Т-клеточные лимфомы, лимфоплазмацитоидная лимфома, моноцитоидная В-клеточная лимфома, лимфома лимфоидной ткани слизистых оболочек (ЛТСО), анапластическая (например, Ki 1+) крупноклеточная лимфома, Т-клеточная лимфома/лейкоз взрослых, мантийноклеточная лимфома, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, ангиоцентрическая лимфома, кишечная Т-клеточная лимфома, первичная средостенная В-клеточная лимфома, лимфобластная лимфома клеток-предшественников Т-лимфоцитов, Т-лимфобластная; и лимфома/лейкоз (Т-Lbly/Т-ALL), периферическая Т-клеточная лимфома, лимфобластная лимфома, лимфопролиферативное расстройство после трансплантации, истинная гистиоцитарная лимфома, первичная лимфома центральной нервной системы, первичная выпотная лимфома, лимфобластная лимфома (ЛБЛ), гемопэтические опухоли лимфоидных клеток, острый лимфобластный лейкоз, диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) (включая пациентов с ДВККЛ, которые изначально не поддаются лечению, не поддаются лечению Ритуксимабом, не поддаются лечению Ритуксимабом/СНОР (циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном), рецидивирующие или не поддающиеся лечению (R/R) ДВККЛ и/или ХАР-Т неподходящие ДВККЛ пациенты), лимфома Буркитта, фолликулярная лимфома, диффузная гистиоцитарная лимфома (ДГЛ), иммунобластная крупноклеточная лимфома, лимфома клеток-предшественников В-лимфобластов, кожная Т-клеточная лимфома (КТКЛ) (также называемая грибовидный микоз или синдром Сезари) и лимфоплазмацитарная лимфома (ЛПЛ) с макроглобулинемией Вальденстрема; миеломы, такие как IgG миелома, миелома легкой цепи, не-секреторная миелома, вялотекущая миелома (также называемая невыраженная миелома), изолированная плазмацитома и множественные миеломы, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), волосатоклеточную лимфому; гемопэтические опухоли миелоид-

ных клеток, опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; семиному, тератокарциному, опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, шванномы; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, семиному, фолликулярный рак щитовидной железы и тератокарциному, гемопоэтические опухоли лимфоидных клеток, например Т-клеточные и В-клеточные опухоли, включая, но не ограничиваясь ими, Т-клеточные расстройства, такие как Т-пролимфоцитарный лейкоз (Т-ПЛЛ), включая мелкоклеточный и мозговидноклеточный тип; лейкоз из больших зернистых лимфоцитов (БЗЛ), предпочтительно, Т-клеточного типа; a/d Т-NHL семисложную лимфому; периферическую/пост-тимическую Т-клеточную лимфому (плеоморфного и иммунобластного подтипов); ангиоцентрическую (назальную) Т-клеточную лимфому; рак головы и шеи, рак почек, рак толстой кишки, рак щитовидной железы; острую миелоидную лимфому, а также любые сочетания указанных раков. Анти-SIRPA антитело настоящего изобретения также может применяться для лечения метастатического рака.

В некоторых вариантах осуществления, рак выбирают из саркомы, рака мочевого пузыря, рака мозга, рака груди, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, рака почек, рака почечной лоханки, лейкоза, рака легких, меланомы, лимфомы, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака яичников и фибросаркомы. В некоторых вариантах осуществления, раком является трижды негативный рак груди. В некоторых вариантах осуществления, раком может быть рак на ранней стадии или рак на поздней стадии. В некоторых вариантах осуществления, раком может быть первичная опухоль. В некоторых вариантах осуществления, раком может быть метастатическая опухоль на втором месте, полученная из любого из вышеуказанных типов рака.

В некоторых вариантах осуществления, рак выбирают из мультиформной глиобластомы; светлоклеточной карциномы почек; аденокарциномы почки; уротелиальной карциномы мочевого пузыря; диффузной В-крупноклеточной лимфомы; аденокарциномы легких; аденокарциномы поджелудочной железы, почечноклеточного рака, неходжкинской лимфомы, острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), множественной миеломы, инвазивной карциномы груди, плоскоклеточной карциномы шейки матки, эндоцервикальной карциномы, холангиокарциномы, аденокарциномы толстой кишки, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, карциномы пищевода, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, хромофобного рака почек, папиллярного рака почек, глиомы низкой степени злокачественности, печеночно-клеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы легких, мезотелиомы, серозной цистаденокарциномы яичников, аденокарциномы поджелудочной железы, феохромоцитомы и параганглиомы, аденокарциномы простаты, аденокарциномы прямой кишки, меланомы кожи, аденокарциномы желудка, опухолей половых клеток яичка, карциномы щитовидной железы, тимомы, эндометриальной карциномы тела матки, карциносаркомы матки и увеальной меланомы.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение представляет способы профилактики, снижения риска или лечения индивида, страдающего раком, где индивид невосприимчив к терапии ингибиторами иммунной контрольной точки, введением индивиду терапевтически эффективного количества анти-SIRPA антитела настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение представляет способы профилактики, снижения риска или лечения индивида, страдающего раком, введением индивиду терапевтически эффективного количества анти-SIRPA антитела настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения может вводиться совместно с терапевтическим агентом, который действует как ингибитор иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение индивиду, по меньшей мере, одного антитела, которое специфически связывается с ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки, и/или другой стандартной или экспериментальной противораковой терапии. В некоторых вариантах осуществления, ингибирующую молекулу иммунной контрольной точки выбирают из PD1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39 и CD73. В типовых вариантах, терапевтическим агентом является антитело к ингибитору иммунной контрольной точки, выбранному из D1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39 или CD73. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одно антитело, которое специфически связывается с ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки, вводят в сочетании с анти-SIRPA антителом настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления, сочетание антитела, направленного против ингибиторов иммунной контрольной точки, вводят совместно с анти-SIRPA антителом настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения может вводиться совместно с, по меньшей мере, одним агонистическим антителом, которое специфически связывается со стимулирующим белком иммунной контрольной точки, например, агонистом анти-CD40 антитела, агонистом анти-OX40 антитела, агонистом анти-ICOS антитела, агонистом анти-CD28 антитела,

агонистическим анти-TREM1 антителом, агонистическим анти-TREM2 антителом, агонистом анти-CD137/4-1BB антителом, агонистом анти-CD27 антитела, агонистом антитела вызванного анти-гликокортикоидом TNFR-родственного белка GITR, агонистом анти-CD30 антитела, агонистом анти-BTLA антитела, агонистом анти-HVEM антитела, агонистом анти-CD2 антитела, агонистом анти-CD5 антитела и любым их сочетанием.

В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение индивиду, по меньшей мере, одного антитела, которое специфически связывается ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки и/или другой стандартной или экспериментальной противораковой терапии. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один антитело, которое специфически связывается с ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки, вводят в сочетании с анти-SIRPA антителом настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одно антитело, которое специфически связывается ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки, выбирают из анти-PD-L1 антитела, анти-CTLA4 антитела, анти-PD-L2 антитела, анти-PD-1 антитела, анти-B7-H3 антитела, анти-B7-H4 антитела и анти-HVEM антитела, анти-антитела В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA), анти-антитела ингибирующего рецептора клетки-киллера (KIR), анти-GAL9 антитела, анти-TIM3 антитела, анти-A2AR антитела, анти-LAG-3 антитела, анти-фосфатидилсеринового антитела, анти-CD27 антитела и любого их сочетания. В некоторых вариантах осуществления, стандартной или экспериментальной противораковой терапией является одна или более терапий, выбранных из радиотерапии, цитотоксической химиотерапии, таргетной терапии, иматиниба (Gleevec®), трастузумаба (Herceptin®), адоптивного клеточного переноса (АКП), химерного антигенного рецептора Т-клеточного переноса (ХАР-Т), вакцинной терапии и цитокиновой терапии. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение индивиду, по меньшей мере, одного антитела, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одно антитело, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином, вводят в сочетании с анти-SIRPA антителом настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одно антитело, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином, выбирают из анти-CCL2 антитела, анти-CSF-1 антитела, анти-IL-2 антитела и любое их сочетания.

В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение индивиду, по меньшей мере, одного агонистического антитела, которое специфически связывается со стимулирующим белком иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одно агонистическое антитело, которое специфически связывается со стимулирующим белком иммунной контрольной точки, вводят в сочетании с анти-SIRPA антителом настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одно агонистическое антитело, которое специфически связывается со стимулирующим белком иммунной контрольной точки, выбирают из агониста анти-CD40 антитела, агониста анти-ОХ40 антитела, агониста анти-ICOS антитела, агониста анти-CD28 антитела, агониста анти-CD137/4-1BB антитела, агониста анти-CD27 антитела, агонистом антитела вызванного анти-гликокортикоидом TNFR-родственного белка GITR и любого их сочетания.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения вводят в сочетании с радиационной терапией и/или химиотерапевтическим агентом. Химиотерапевтические агенты включают, например, следующие группы: антиметаболиты/противораковые агенты, такие как аналоги пиримидина (5-фторурацил, флоксуридин, капецитабин, гемцитабин и цитарабин) и аналоги пурина, антагонисты фолата и родственные ингибиторы (метотрексат, пеметрексед, меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин и 2-хлордеоскиаденозин (кладрибин)); антипролиферативные/антимитотические агенты, включающие натуральные продукты, такие как алкалоиды барвинка (винбластин, винкристин и винорелбин), разрыватели микротрубочек, такие как таксан (паклитаксел, доцетаксел), винкристин, винбластин, нокодазол, эпотилоны, эрибулин и навелбин; эпидиподофиллотоксины (этопозид, тенипозид); агенты, повреждающие ДНК (актиномицин, амсакрин, антрациклины, блеомицин, бусульфан, камптотецин, карбоплатин, хлорамбуцил, цисплатин, циклофосфамид, Цитоксан, дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, гексаметилмеламин, оксалиплатин, ифосфамид, мелфалан, мерхлоретамин, митомин, митоксантрон, нитрозомочевина, пликамицин, прокарбазин, таксол, таксотер, темозоламид, тенипозид, триэтилентифосфорамид и этопозид (VP 16)); ингибиторы метилтрансферазы ДНК (азациитидин); антибиотики, такие как дактиномицин (актиномицин D), даунорубицин, доксорубицин (адриамицин), идарубицин, антрациклины, митоксантрон, блеомицины, пликамицин (митрамицин) и митомин; ферменты (L-аспарагиназа, которая систематически метаболизирует L-аспарагин и обделяет клетки, которые не имеют способности синтезировать их собственный аспарагин); антитромбоцитарные агенты; антипролиферативные/антимитотические алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты (мехлоретамин, циклофосфамид и аналоги, мелфалан, хлорамбуцил), этиленимины и метилмеламины (гексаметилмеламин и тиотепа), алкилсульфонаты (бусульфан), нитрозомочевины (кармустин (BCNU) и аналоги, стрептозоцин), триазены (дакарбазин (DTIC)); антипролиферативные/антимитотические антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты (метотрексат); координационные комплексы платины (цисплатин, карбоплатин), прокарбазин, гидроксимочевина, митотан, аминоклутетимид; гормоны, аналоги гормонов

(эстроген, тамоксифен, гoserелин, бикалутамид, nilутамид) и ингибиторы ароматазы (летрозол, анастрозол); антикоагулянты (гепарин, синтетические соли гепарина и другие ингибиторы тромбина); фибринолитические агенты (такие как активатор плазминогена ткани, стрептокиназа и урокиназа), аспирин, дипиридамол, тиклопидин, клопидогрел, абциксимаб; антимиграционные агенты; антисекреторные агенты (бравелдин); иммунодепрессанты (циклоспорин, такролимус (FK-506), сиролимус (рапамацин), аза-тиоприн, микофенолат мофетил); анти-ангиогенные соединения (TNP470, генистеин, помалидомид) и ингибиторы фактора роста (ингибиторы фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), такие как зив-афлиберцепт; ингибиторы фактора роста фибросласта (FGF)); антагонисты ингибиторов белка апоптоза (IAP) (биринапант); ингибиторы гистодинаацетилазы (HDAC) (вориностат, ромидепсин, хидамид, панобиностат, моцетиностат, абексинастат, белиностат, этиностат, ресминостат, гивиностат, квизиностат, SB939); ингибиторы протеасомы (иксазомиб); блокатор рецептора ангиотензина; доноры оксида азота; антисмысловые олигонуклеотиды; антитела (трастузумаб, панитумумаб, пертузумаб, цетуксимаб, адалимумаб, голимумаб, инфликсимаб, ритуксимаб, окрелизумаб, офатумумаб, обинутузумаб, алемтузумаб, абциксимаб, атлизумаб, даклизумаб, донезумаб, эфализумаб, элотузумаб, ровелизумаб, руплизумаб, ус-текинумаб, визилизумаб, гемтузумаб, озогамицин, брентуксимаб, ведотин); химерные антигенные рецепторы; ингибиторы клеточного цикла (флавопиридол, росковитин, бриостатин-1) и индукторы дифференциации (третиноин); ингибиторы mTOR, ингибиторы топоизомеразы (доксорубин (адриамицин), ам-сакрин, камптотecin, даунорубин, дактиномицин, энипозид, эпирубицин, этопозид, идарубин, ири-нотекан (CPT-11) и митоксантрон, топотекан, иринотекан), кортикостероиды (кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизон и преднизолон); ингибиторы PARP (нирапариб, олапариб); ингибиторы киназы фокальной адгезии (FAK) (дефактиниб (VS-6063), VS-4718, VS-6062, GSK2256098); ингибиторы киназы трансдукции сигнала фактора роста (цедираниб, галунисериб, роцилетиниб, вандетаниб, афатаниб, EGF816, AZD4547); ингибиторы c-Met (капматиниб, INC280); ингибиторы ALK (церитиниб, кризотиниб); индукторы митохондриальной дисфункции, токсины, такие как холерный токсин, ризин, экзотоксин *Pseudomonas*, токсин аденилатциклазы *Bordetella pertussis* или дифтерийный токсин и активаторы каспазы; и разрыватели хроматина. В некоторых вариантах осуществления, химиотерапевтическим агентом является B-Raf ингибитор, MEK ингибитор, VEGF ингибитор, VEGFR ингибитор, ингибитор тирозинкиназы, анти-митотический агент или любое их сочетание.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения вводят в сочетании с терапией адоптивным клеточным переносом (АКП), терапией химерным антигенным рецептором Т-клеточного трансфера (ХАР-Т), вакцинальной терапией и/или цитокиновой терапией.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения вводят в сочетании с, по меньшей мере, одним антителом, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином, например, ингибирующим цитокином, таким как анти-CCL2 антитело, анти-CSF-1 антитело или анти-IL-2 антитело.

В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело настоящего изобретения вводят в сочетании с, по меньшей мере, одним стимулирующим цитокином. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления здесь, по меньшей мере, один стимулирующий цитокин выбирают из IFN- α 4, IFN- β , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, CRP, членов семейства IL-20, LIF, IFN- γ , OSM, CNTF, GM-CSF, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, CXCL10, IL-33, MCP-1, MIP-1-бета и любого их сочетания.

В некоторых вариантах осуществления, агент, который отрицательно регулирует SIRPA, например, анти-SIRPA антитело, вводят пациенту, который имеет неврологическое расстройство или вводят для снижения риска, замедления наступления или предотвращения неврологического расстройства. В некоторых вариантах осуществления, неврологическим расстройством является деменция, включая деменцию, лобно-височную деменцию, болезнь Альцгеймера, сосудистую деменцию, умеренное когнитивное нарушение, болезнь Паркинсона, амиотрофический боковой склероз (АБС), болезнь Хантингтона, таупатию или рассеянный склероз.

В некоторых вариантах осуществления, агент, который отрицательно регулирует SIRPA, например, анти-SIRPA антитело, вводят пациенту, который имеет болезнь Паркинсона, амиотрофический боковой склероз, болезнь Хантингтона, таупатию или рассеянный склероз. В некоторых вариантах осуществления, агент вводят пациенту, который имеет болезнь Крейтцфельда-Якоба, гидроцефалию нормального давления, болезнь Насу-Хакола, инсульт, инфекцию, черепно-мозговую травму, прогрессирующий надъядерный паралич, деменцию боксеров (хроническую травматическую энцефалопатию), паркинсонизм, связанный с хромосомой 17, болезнь Литико-Бодига (комплекс Паркинсон-деменция по Гуаму), деменцию с преобладанием нейрофибриллярных клубков, ганглиоглиому и ганглиоцитому, менингиоангиоматоз, подострый склерозирующий панэнцефалит, свинцовую энцефалопатию, туберозный склероз, болезнь Халлервордена-Шпатца, липофусциноз, болезнь Пика, кортикобазальную дегенерацию, заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен, лобно-височную лобарную дегенерацию, деменцию с тельцами Леви, множественную системную атрофию, синдром Шая-Драгера, прогрессирующий надъядерный паралич или корковую дегенерацию подкорковых узлов.

Деменция.

Деменция является не специфическим синдромом (т.е., набором признаков и симптомов), которые представляют серьезную потерю общей когнитивной способности у ранее нормального человека, сверх того, что можно ожидать от нормального старения. Деменция может быть статической, в результате уникальной глобальной травмы головного мозга. Альтернативно, деменция может быть прогрессирующей, что приводит к длительному снижению из-за повреждения или болезни в организме. Хотя деменция гораздо чаще встречается у пожилых людей, она также может возникать в возрасте до 65 лет. К когнитивным областям, затронутым деменцией, относятся, без ограничения, память, объем внимания, язык и способность решать проблемы. Как правило, симптомы должны присутствовать, по меньшей мере, шесть месяцев, прежде чем у человека будет диагностирована деменция.

Типовые формы деменции включают, без ограничения, лобно-височную деменцию, болезнь Альцгеймера, сосудистую деменцию, семантическую деменцию и деменцию с тельцами Леви.

В некоторых вариантах осуществления, введение анти-SIRPA антитела настоящего изобретения может предотвратить, снизить риск и/или вылечить деменцию. В некоторых вариантах осуществления, анти-SIRPA антитело может модулировать одну или более активностей SIRPA у индивидуума, имеющего деменцию.

Лобно-височная деменция.

Лобно-височная деменция (ЛВД) является состоянием, возникающим при прогрессирующем ухудшении лобной доли головного мозга. С течением времени, дегенерация может перейти в височную долю. Вторая после болезни Альцгеймера (БА) по преобладанию, ЛВД составляет 20% случаев достарческой деменции. Клинические признаки ЛВД включают дефицит памяти, поведенческие аномалии, изменение личности и ухудшение речи (Cruts, M. & Van Broeckhoven, C, Trends Genet. 24:186-194 (2008); Neary, D., et al., Neurology 51:1546-1554 (1998); Ratnavalli, E., Brayne, C., Dawson, K. & Hodges, J. R., Neurology 58:1615-1621 (2002)).

Значительная часть случаев ЛВД наследуется по аутосомно-доминантному типу, но даже в одной семье, симптомы могут охватывать спектр от ЛВД с поведенческими нарушениями до первичной прогрессирующей афазии до кортико-базальной ганглионарной дегенерации. ЛВД, как и большинство нейродегенеративных заболеваний, может характеризоваться патологическим присутствием определенных белковых агрегатов в пораженном мозге. Исторически, в первых описаниях ЛВД распознано наличие внутринейрональных скоплений гиперфосфорилированного тау-белка в нейрофибриллярных клубках или тельцах Пика. Причинная роль тау-белка, связанного с микротрубочками, была подтверждена идентификацией мутаций в гене, кодирующем тау-белок в нескольких семействах (Hutton, M., et al., Nature 393:702-705 (1998)). Однако в большинстве головных мозгов, пораженных ЛВД, не наблюдается накопления гиперфосфорилированного тау-белка, но демонстрируется иммунореактивность к убиквитину (Ub) и ДНК-связывающему белку TAR (TDP43) (Neumann, M., et al., Arch. Neural. 64:1388-1394 (2007)). Было показано, что большинство случаев ЛВД с включениями Ub (ЛВД-U) имеют мутации в гене програнулина.

В некоторых вариантах осуществления, введение анти-SIPRA антитела настоящего изобретения может предотвратить, снизить риск и/или вылечить ЛВД. В некоторых вариантах осуществления, введение анти-SIPRA антитела, может модулировать одну или более активностей SIPRA у индивида, имеющего ЛВД.

Болезнь Альцгеймера.

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее частой формой деменции. От болезни нет лекарства, она по мере прогрессирования ухудшается и в конечном итоге приводит к смерти. Чаще всего БА диагностируется у людей старше 65 лет. Однако менее распространенная болезнь Альцгеймера с ранним началом может возникнуть гораздо раньше. Общие симптомы болезни Альцгеймера включают поведенческие симптомы, такие как трудности с запоминанием недавних событий; когнитивные симптомы, спутанность сознания, раздражительность и агрессию, перепады настроения, проблемы с речью и потерю долговременной памяти. По мере развития болезни функции организма теряются, что в конечном итоге приводит к смерти. Болезнь Альцгеймера развивается в течение неизвестного и переменного периода времени, прежде чем стать полностью очевидной, и может прогрессировать без диагностики в течение многих лет.

В некоторых вариантах осуществления, введение анти-SIPRA антитела настоящего изобретения может предотвратить, снизить риск и/или вылечить болезнь Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления, введение анти-SIPRA антитела может модулировать одну или более активностей SIPRA у индивида, имеющего болезнь Альцгеймера.

Болезнь Паркинсона.

Болезнь Паркинсона, которую можно назвать идиопатическим или первичным паркинсонизмом, гипокинетическим ригидным синдромом (ГРС) или дрожательным параличом, представляет собой нейродегенеративное заболевание головного мозга, которое влияет на контроль двигательной системы. Прогрессирующая гибель клеток мозга, вырабатывающих дофамин, приводит к основным симптомам болезни Паркинсона. Чаще всего болезнь Паркинсона диагностируется у людей старше 50 лет. Болезнь Пар-

кинсона является идиопатической (не имеет известной причины) у большинства людей. Однако генетические факторы также играют роль в заболевании.

Симптомы болезни Паркинсона включают, без ограничения, тремор кистей, рук, ног, челюстей и лица, ригидность мышц конечностей и туловища, замедленность движений (брадикинезию), поструральную неустойчивость, затруднения при ходьбе, психоневрологические проблемы, изменения речи или поведении, депрессию, тревогу, боль, психоз, слабоумие, галлюцинации и проблемы со сном.

В некоторых вариантах осуществления, введение анти-SIPRA антитела настоящего изобретения может предотвратить, снизить риск и/или вылечить болезни Паркинсона. В некоторых вариантах осуществления, введение анти-SIPRA антитела может модулировать одну или более активностей SIPRA у индивида, имеющего болезнь Паркинсона.

Амиотрофический боковой склероз (АБС).

В контексте данного документа, амиотрофический боковой склероз (АБС), или заболевание двигательных нейронов, или болезнь Лу-Герига используются взаимозаменяемо и относятся к инвалидизирующему заболеванию различной этиологии, характеризующемуся быстро прогрессирующей слабостью, атрофией мышц и фасцикуляциями, мышечной спастичностью, затруднением речи (дизартрией), затруднением глотания (дисфагией) и затруднением дыхания (одышкой).

Было показано, что програнулин играет роль в АБС (Schymick, JC et al., (2007) J[0343] *Neurol Neurosurg Psychiatry*;78:754-6) и защищает от повреждений, вызванных белками, вызывающими АБС, такими как TDP-43 (Laird, AS et al., (2010). *PLoS ONE* 5: e13368). Также было продемонстрировано, что про-NGF вызывает p75-медиированную смерть олигодендроцитов и кортико-спинальных нейронов после повреждения спинного мозга (Beatty et al., *Neuron* (2002),36, pp. 375-386; Giehl et al, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (2004), 101, pp 6226-30).

В некоторых вариантах осуществления, введение анти-SIPRA антитела настоящего изобретения может предотвратить, снизить риск и/или вылечить АБС. В некоторых вариантах осуществления, введение анти-SIPRA антитела может модулировать одну или более активностей SIPRA у индивида, имеющего амиотрофический боковой склероз.

Болезнь Хантингтона.

Болезнь Хантингтона (БХ) является наследственным нейродегенеративным заболеванием, вызываемым аутосомной доминантной мутацией в гене Хантингтина (НТТ). Размножение триплетного повтора цитокин-аденин-гуанин (CAG) в гене Хантингтина приводит к вырабатыванию мутантной формы белка Хантингтина (Htt), кодируемого этим геном. Этот мутантный белок Хантингтина (mHtt) токсичен и способствует гибели нейронов. Симптомы болезни Хантингтона чаще всего проявляются в возрасте от 35 до 44 лет, хотя могут появиться в любом возрасте.

Симптомы болезни Хантингтона включают, без ограничения, проблемы с контролем моторики, судорожные движения, случайные движения (хорею), ненормальные движения глаз, нарушение равновесия, судороги, затрудненное жевание, затрудненное глотание, когнитивные проблемы, нарушение речи, дефицит памяти, трудности мышления, бессонницу, утомляемость, слабоумие, изменения личности, депрессию, тревожность и компульсивное поведение.

В некоторых вариантах осуществления, введение анти-SIPRA антитело настоящего изобретения может предотвратить, снизить риск и/или вылечить болезнь Хантингтона (БХ). В некоторых вариантах осуществления, введение анти-SIPRA антитела может модулировать одну или более активностей SIPRA у индивида, имеющего болезнь Хантингтона.

Таупатия.

Таупатические заболевания, или таупатии, представляют собой класс нейродегенеративных заболеваний, вызываемых агрегацией связанного с микротрубочками тау-белка в головном мозге. Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой наиболее известное таупатическое заболевание и включает накопление тау-белка в нейронах в форме нерастворимых нейрофибриллярных клубков (НФК). Другие таупатические заболевания и расстройства включают прогрессирующий надъядерный паралич, деменцию боксеров (хроническую травматическую энцефалопатию), лобно-височную деменцию и паркинсонизм, связанный с хромосомой 17, болезнь Литико-Бодига (комплекс Паркинсон-деменция по Гуаму), деменцию с преобладанием клубочков, гангиоглиому и гангиоцитому, менингиоангиоматоз, подострый склерозирующий панэнцефалит, свинцовую энцефалопатию, туберозный склероз, болезнь Халлервордена-Шпатца, липофусциноз, болезнь Пика, кортико-базальную дегенерацию, заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен (АГЗ), болезнь Хантингтона и дегенерацию лобно-височной доли.

В некоторых вариантах осуществления, введение анти-SIPRA антитела настоящего изобретения, может предотвратить, снизить риск и/или вылечить таупатию. В некоторых вариантах осуществления, введение анти-SIPRA антитела может модулировать одну или более активностей SIPRA у индивида, имеющего таупатию.

Рассеянный склероз.

Рассеянный склероз (РС) также называют множественным склерозом или множественным энцефаломиелитом. РС является воспалительным заболеванием, при котором жировые миелиновые оболочки вокруг аксонов головного и спинного мозга повреждаются, что приводит к демиелинизации и рубцева-

нию, а также к широкому спектру признаков и симптомов. РС влияет на способность нервных клеток головного и спинного мозга эффективно взаимодействовать друг с другом. Нервные клетки общаются, посылая электрические сигналы, называемые потенциалами действия, по длинным волокнам, называемым аксонами, которые содержатся в изолирующем веществе, называемом миелин. При РС собственная иммунная система организма атакует и повреждает миелин. Когда миелин теряется, аксоны больше не могут эффективно проводить сигналы. Начало рассеянного склероза обычно возникает у молодых людей и чаще встречается у женщин.

Симптомы РС включают, без ограничения, изменения чувствительности, такие как потеря чувствительности или покалывание; калюющую боль или онемение, такое как гипестезия и парестезия; мышечную слабость; клонус; спазмы мышц; затруднение в движении; трудности с координацией и равновесием, например, атаксию; проблемы с речью, такие как дизартрия, или проблемы с глотанием, такие как дисфагия; проблемы со зрением, такие как нистагм, неврит зрительного нерва, включая фосфен и диплопию; усталость; острую или хроническую боль; и проблемы с мочевым пузырем и кишечником; когнитивные ухудшения разной степени; эмоциональные симптомы депрессии или нестабильного настроения; симптом Ухтоффа, который представляет собой обострение существующих симптомов из-за воздействия более высоких, чем обычно, температур окружающей среды; и симптом Лермитта, представляющий собой электрическое ощущение, которое проходит по спине при сгибании шеи.

В некоторых вариантах осуществления, введение анти-SIPRA антитела настоящего изобретения может предотвратить, снизить риск и/или вылечить рассеянного склероза. В некоторых вариантах осуществления, введение анти-SIPRA антитела может модулировать одну или более активностей SIPRA у индивида, имеющего рассеянный склероз.

В некоторых вариантах осуществления субъектом или индивидом является млекопитающее. Млекопитающие включают, без ограничения, домашних животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, человека и не человеческих приматов, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В некоторых вариантах осуществления, субъектом или индивидом является человек.

Антитело, представленное в настоящем документе (и любой дополнительный терапевтический агент), можно вводить любыми подходящими способами, включая парентеральное, внутривенное, интраназальное, внутриочаговое введение, интрацеребральное, внутримозговое, внутриспинальное, интрасиновиальное, интратекальное, пероральное, местное или ингаляционное пути. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное введение в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, внутриаортальное, внутрисуставное, внутривисцеральное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления, введением является внутривенное введение. В некоторых вариантах осуществления введение является подкожным. Дозирование может осуществляться любым подходящим путем, например, инъекциями, такими как внутривенные или подкожные инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или постоянным. В настоящем документе рассматриваются различные схемы дозирования, включая, но не ограничиваясь ими, однократное или многократное введение в различные моменты времени, болюсное введение и импульсную инфузию.

Антитела, представленная в данном документе, могут составляться, дозироваться и вводиться в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые следует учитывать в этом контексте, включают конкретное заболевание, которое лечат, конкретное млекопитающее, которое лечат, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, место доставки агента, способ введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Антитело необязательно, но опционально, составляют с одним или более агентами, которые в настоящее время используются для профилактики или лечения рассматриваемого расстройства. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в составе, типа расстройства или лечения и других факторов, обсуждаемых выше. Их обычно используют в тех же дозировках и с путями введения, которые описаны в данном документе, или от 1 до 99% доз, описанных здесь, или в любой дозировке и любым путем, которые эмпирически/клинически определены как подходящие.

Для профилактики или лечения заболевания, подходящая доза антитела по изобретению (при использовании отдельно или в сочетании с одним или более другими дополнительными терапевтическими агентами) будет зависеть от типа заболевания, которое лечат, типа антитела, тяжести и течения заболевания, независимо от того, вводится ли антитело в профилактических или терапевтических целях, предыдущей терапии, истории болезни пациента и ответа на антитело и суждения лечащего врача. Антитело обычно вводят пациенту за один раз или в течение нескольких курсов лечения.

В зависимости от типа и тяжести заболевания, от около 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1 мг/кг - 10 мг/кг) антитела может быть исходной кандидатной дозой для введения пациенту, например, одним или более раздельными введениями или непрерывной инфузией. Одна типовая суточная доза может варьироваться от около 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от вышеупомянутых факторов. Для повторяющихся введений в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение обычно продлевается до желаемого подавления возникающих болезненных симптомов. Одна типовая

доза антитела будет составлять от около 0,05 мг/кг до около 10 мг/кг. Таким образом, одна или более доз около 0,5, 2,0, 4,0 или 10 мг/кг (или любое их сочетание) могут вводиться пациенту. Такие дозы могут вводиться периодически, например, каждую неделю или каждые три недели (например, так, чтобы пациент получал от около двух до около двадцати или, например, около шести доз антитела). В определенных вариантах осуществления, частота дозирования составляет три раза в сутки, два раза в сутки, один раз в сутки, один раз через день, один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые четыре недели, один раз каждые пять недель, один раз каждые шесть недель, один раз каждые семь недель, один раз каждые восемь недель, один раз каждые девять недель, один раз каждые десять недель или один раз в месяц, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца или дольше. Может вводиться более высокая исходная доза, после одной или более меньших доз. Однако могут применяться другие схемы дозирования. Прогресс этой терапии легко отслеживается обычными методами и анализами.

Диагностическое применение.

В некоторых вариантах осуществления любого из антитела, любое из анти-SIRPA антител, представленных в настоящем документе, полезно для обнаружения присутствия SIRPA в образце или у индивида. Термин "обнаружение" в контексте данного документа охватывает количественное или качественное обнаружение. В данном документе представлены способы использования антител настоящего изобретения в диагностических целях, таких как обнаружение SIRPA у индивида или в образцах тканей, полученных от индивида. В некоторых вариантах осуществления, индивидом является человек.

Способ обнаружения может включать количественную оценку связанного с антигеном антитела. Обнаружение антител в биологических образцах может происходить любым способом, известным в данной области техники, включая иммунофлуоресцентную микроскопию, иммуноцитохимию, иммуногистохимию, ELISA, анализ СКАФ, иммунопреципитацию или микропозитронную эмиссионную томографию. В определенных вариантах осуществления, антитело помечено радиоактивной меткой, например, с помощью ^{18}F , и впоследствии обнаруживается с использованием анализа микропозитронной эмиссионной томографией. Связывание антитела также может быть количественно определено у пациента с помощью неинвазивных методов, таких как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), рентгеновская компьютерная томография, однофотонная эмиссионная компьютерная томография (SPECT), компьютерная томография (КТ) и компьютерная аксиальная томография (КАТ).

Готовые изделия.

В данном документе представлены готовые изделия (например, набор) содержащие анти-SIRPA антитело, описанное здесь. Готовое изделие может включать один или более контейнеров, содержащих антитело, описанное здесь. Контейнерами может быть любая подходящая упаковка, включая, но не ограничиваясь ими, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и подобные. Контейнеры могут быть стандартными дозами, объемными упаковками (например, многодозовыми упаковками) или субъединичными дозами.

В некоторых вариантах осуществления, наборы могут дополнительно включать второй агент. В некоторых вариантах осуществления второй агент представляет собой фармацевтически приемлемый буфер или разбавляющий агент, включая, но не ограничиваясь ими, бактериостатическую воду для инъекций (БВДИ), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. В некоторых вариантах осуществления, вторым агентом является фармацевтически активный агент, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления любого из готовые изделия, готовые изделия дополнительно включают инструкции по применению в соответствии со способами настоящего описания. Инструкции обычно включают информацию по дозировке, схеме дозирования и способу введения для намеченного лечения. В некоторых вариантах осуществления, эти инструкции включают описание введения выделенного анти-SIRPA антитела настоящего изобретения (например, анти-SIRPA антитела, описанного здесь) для профилактики, снижения риска возникновения или лечения индивида, имеющего заболевание, расстройство или повреждение, выбранное из деменции, лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, сосудистой деменции, смешанной деменции, болезни Крейтцфельда-Якоба, нормотензивной гидроцефалии, амиотрофического бокового склероза, болезни Хантингтона, таупатии, болезни Насу-Хакола, инсульта, острой травмы, хронической травмы, волчанки, острого и хронического колита, ревматоидного артрита, заживления ран, болезни Крона, воспалительной болезни кишечника, язвенного колита, ожирения, малярии, эссенциального тремора, волчанки центральной нервной системы, болезни Бехчета, болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии, синдрома Шая-Драгера, прогрессирующего надъядерного паралича, кортикально-базальной ганглионарной дегенерации, острого рассеянного энцефаломиелита, гранулематозных расстройств, саркоидоза, возрастных заболеваний, судорожных припадков, повреждения спинного мозга, возрастной дегенерации желтого пятна, глаукомы, пигментной дистрофии сетчатки, дегенерации сетчатки, инфекции дыхательных путей, сепсиса, инфекции глаз, системной инфекции, волчанки, артрита, рассеянного склероза, низкой плотности костей, остеопороза, остеогенеза, остеопетрозного заболевания, болезни Педжета костей рака, включая рак мочевого пузыря, рак мозга, рак груди, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак эндометрия, рак почки, почечно-клеточный рак, рак почечной лоханки, лейкоз, рак легких, меланому, неходжкинскую лимфому,

рак поджелудочной железы, рак простаты, рак яичников, фибросаркому, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), множественную миелому, истинную полицитемию, эссенциальный тромбоцитоз, первичный или идиопатический миелофиброз, первичный или идиопатический миелосклероз, опухоли миелоидного происхождения, опухоли, экспрессирующие SIRPA, рак щитовидной железы, инфекций, герпеса ЦНС, паразитарных инфекций, инфекции *Trypanosome*, инфекции *Cruzi*, инфекции *Pseudomonas aeruginosa*, инфекции *Leishmania donovani*, инфекции группой В *Streptococcus*, инфекции *Campylobacter jejuni*, инфекции *Neisseria meningitidis*, ВИЧ I типа и гемофильной инфекции, согласно любым способам этого изобретения. В некоторых вариантах осуществления, инструкции включают инструкции по применению анти-SIRPA антитела и второго агента (например, второго фармацевтически активного агента).

Настоящее изобретение будет более полно понято со ссылкой на следующие примеры. Однако их не следует истолковывать как ограничение объема настоящего изобретения. Все цитаты по всему изобретению включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Примеры

Следующие ниже примеры представлены только в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения. Специалисты в данной области техники легко распознают множество параметров, которые можно изменить или модифицировать для получения по существу аналогичных результатов.

Пример 1. Получение анти-SIRPA антител.

Последовательность аминокислот человеческого SIRPA белка указана ниже в SEQ ID №: 1. Человеческий SIRPA содержит сигнальный пептид, расположенный на аминокислотных остатках 1-30 из SEQ ID №: 1. Человеческий SIRPA содержит внеклеточный иммуноглобулин-подобный домен переменного типа (IgV), расположенный на аминокислотных остатках 32-137 из SEQ ID №: 1; дополнительные последовательности внеклеточного иммуноглобулин-подобного домена постоянного типа (IgC), расположенные на аминокислотных остатках 148-247 и 254-348 из SEQ ID №: 1; трансмембранный домен, расположенный на аминокислотных остатках 374-394 из SEQ ID №: 1; и внутриклеточный домен, расположенный на аминокислотных остатках 395-504 из SEQ ID №: 1.

Аминокислотная последовательность человеческого SIRPAv1 (SEQ ID №: 1):

10	20	30	40	50
MEPAGPAPG	LGPLLCLLLA	ASCAWSGVAG	EEELQVIQPD	KSVLVAAAGE
R				T
60	70	80	90	100
ATLRCTATSL	IPVGPQWFR	GAGPGRELIY	NQKEGHFPRV	TTVSDLTKRN
110	120	130	140	150
NMDFSIRIGN	ITPADAGTY	CVKFRKGS	DVEFKSGAGT	ELSVRAKPSA
160	170	180	190	200
PVVS GPAAR	TPQHTVSFTC	ESHGFSRDI	TLKWFKNGNE	LSDFQTNVDP
A				
210	220	230	240	250
VGESVSYSH	STAKVVLTR	DVHSQVICEV	AHVTLQGDPL	RGTANLSETI
260	270	280	290	300
RVPPTLEVTQ	QPVRAENQVN	VTCQVRKFYP	QRLQLTWLEN	GNVSRTE
310	320	330	340	350
TVTENKDG	NWMSWLLVN	SAHRDDVKLT	CQVEHDGQPA	VSKSHDLKVS
Y	V			
360	370	380	390	400
AHPKEQGSN	AAENTGSNER	NIYIVGVVVC	TLLVALLMAA	LYLVIRQKK
T				
410	420	430	440	450
AQGSTSSTRL	HEPEKNAREI	TQDTNDITYA	DLNLPKGKKP	APQAAEPNN
				H
460	470	480	490	500
TEYASIQTSP	QPASEDTLTY	ADLDMVHLN	TPKQPAPKPE	PSFSEYASVQ
				R

VPRK

Анализ кристаллической структуры SIRPA-CD47 комплексов отделяет сайт связывания лиганда с переменными петлями, которые связывают нити β-пласта в IgV домене SIRPA. CD47-связывающий

интерфейс состоит из аминокислотных остатков S59-P65, L96-F104 и K123-D130 SIRPA.

Множество полиморфизмов SIRPA было идентифицировано у человека. Так как большинство вариаций последовательности лежит за пределами сайта связывания CD47 лиганда, большинство исследованных вариантов SIRPA вероятно связывают CD47 с похожей аффинностью. Другие члены семейства SIRP, SIRPB1, разделяют высокую гомологичность последовательности с SIRPA, но не связывают CD47. Одинарное A57M замещение достаточно для перестановки S59-P65 интерфейса связывания лиганда для предотвращения связывания SIRPB1 с CD47. Более того, взаимодействие SIRPA-CD47 является высоко видоспецифическим. Человеческий SIRPA не может связывать мышинный или крысиный или коровий CD47 (из тестированных видов), и человеческий CD47 только распознает отдельный аллельный вариант мышинного SIRPA, экспрессированного мышинным штаммом NOD.

Белковый BLAST анализ SIRPA последовательностей от множества видов показал значительную степень идентичности с человеческим SIRPA (фиг. 1). Высокая гомология последовательности в семействе SIRP представляет значительную проблему при создании SIRPA-специфических антител, при сохранении перекрестной реакционной способности с не человеческими антигенами SIRPA.

Пример 2. Характеризация гуманизованного анти-SIRPA антитела.

Мышиное SIRPA антитело m3F9 обсуждается в данном документе, оно содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 2 и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 5.

В табл. 4 и 5 ниже перечислены полученные гибридомой переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи аминокислотных последовательностей мышинного анти-SIRPA антитела, m3F9, в также соответствующие гуманизованные последовательности (обозначенные как "h3F9"). Первая последовательность гуманизованного антитела для переменного домена тяжелой цепи анти-SIRPA антитела 3F9 (h3F9-H1) является "ОКО-заменой" без изменений в последовательности человеческого каркасного участка.

Следующая гуманизованная последовательность тяжелой цепи переменной области (h3F9-H2) имеет измененные остатки каркасного участка на определенных границах ОКО. (см. фиг. 2A.) На фиг. 2A перечислены потенциальные гуманизованные последовательности переменного домена тяжелой цепи анти-SIRPA антитела 3F9. Гуманизованные последовательности основаны на каркасном участке IGHV3-23*01 акцептора иIGHJ4*01 соединительной области.

Первая гуманизованная последовательность для переменного домена легкой цепи анти-SIRPA антитела 3F9 (h3F9-L1) является "ОКО-заменой" переменного домена легкой цепи без изменений в последовательности человеческого каркасного участка. Последующие гуманизованные последовательности переменной области легкой цепи изменяют аминокислотные остатки каркасного участка (h3F9-L2 и h3F9-L3). (См. фиг. 2B.) На фиг. 2B перечислены потенциальные гуманизованные последовательности переменного домена легкой цепи анти-SIRPA антитела 3F9.

Гуманизованная последовательность основана на каркасном участке IGKV3-11*01 акцептора и IGKJ2*01 соединительной области. ОКО последовательности выделены жирным. ОКО определения являются AbM из веб-сайта www.bioinf.org.uk/abs/. "b" означает замаскированную боковую цепь; "p" означает частично замаскированную; "i" означает боковую цепь на интерфейсе между VH и VL доменами. Последовательности, отличающиеся в человеческих и мышинных последовательностях зародышевого типа отмечены звездочкой (*). Потенциальные дополнительные мутации в каркасных участках отмечены ниже последовательности. Потенциальные изменения в ОКО последовательностях отмечены ниже каждой ОКО последовательности. Они могут предотвращать деамидирование аспарагина (N). Все шесть разных гуманизованных версий анти-SIRPA антитела 3F9 (на основе следующих сочетаний тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи: h3F9-H1/L1; h3F9-H1/L2; h3F9-H1/L3; h3F9-H2/L1; h3F9-H2/L2; и h3F9-H2/L3) были привиты на скелет человеческого IgG4, рекомбинантно полученного в CHO-K1 клетках и охарактеризованного далее, как описано ниже.

Таблица 4

Антитело	Последовательности вариабельной области тяжелой цепи	SEQ ID №:
m3F9 VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPE KRLEWVATISDYGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKYTLYLQM SSLRSЭДТКЛYYXAPPPYDDYYGGFAFWGQGLTVTVA	2
h3F9-H1	EVQLESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSTISDYGGSYTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKPPYDDYYGGFAFWGQGLTVTVSS	3
h3F9-H2	EVQLESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVATISDYGGSYTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYXAPPPYDDYYGGFAFWGQGLTVTVSS	4

Таблица 5

Антитело	Последовательности вариабельной области легкой цепи	SEQ ID №:
m3F9 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSSGYSYMHWYQQ KPGQPPELLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLNHPVEEED AATYYCQHNRELPCFTFGGQTKLEIK	5
h3F9-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTKRASKSVSSSGYSYMHWYQQ KPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQHNRELPCFTFGGQTKLEIK	6
h3F9-L2	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITTKRASKSVSSSGYSYMHWYQQ KPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISVQPED FATYYCQHNRELPCFTFGGQTKLEIK	7
h3F9-L3	DIQLTQSPSSLSVSGDRATITTKRASKSVSSSGYSYMHWYQQ KPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISVQPED FATYYCQHNRELPCFTFGGQTKLEIK	8

Измерения аффинности для анти-SIRPA антитела проводят следующим образом. Данные биослойной интерферометрии (БСИ) собирают на инструменте Pall ForteBio Octet RED96. Анализ данных проводят с применением программы ForteBio Data Analysis Software, версия 9,0. Стандартный кинетический буфер (ФРФБ, 0,1% АБС, 0,02% Tween-20, pH 7,2) применяют для анализа и для получения реагентов. После сенсорного уравнивания в буфере, каждое из гуманизованных 3F9 анти-SIRPA антител (2,5 мкг/мл, время загрузки 300 с) захватывают на Anti-Human IgG Fc Capture Dip и Read Biosensors (Pall ForteBio, Menlo Park, CA). Разные концентрации (0-200 нМ) меченого гистицином человеческого SIRPA (Sino Biological, Beijing, China) затее связывают с захваченной поверхностью анти-SIRPA (время ассоциации 300 с, время диссоциации 600 с). Полученный сигнал БСИ получают как разницу с ответом от ссылочного (2,5 мкг/мл IgG+0 нМ SIRPA) датчика. Контроль нулевого лиганда (0 мкг/мл IgG+200 нМ SIRPA) не показал измеримого не-специфического связывания SIRPA с поверхностью кончика датчика. Измерения аффинности для исходного m3F9 антитела проводят с применением подобного способа, за исключением антитела, захваченного на Anti-Mouse IgG Fc биодатчиках. Мульти-концентрационный кинетический анализ проводят с применением 1:1 модели взаимодействия для получения констант скорости ассоциации и диссоциации (k_a и k_d , соответственно) для каждого антитела. Константы связывающей аффинности (КД) рассчитывают из отношения k_d/k_a .

Иммобилизуют анти-мышинные IgG Fc или анти-человеческие IgG Fc антитела, захваченные мышинным анти-SIRPA антителом 3F9 и гуманизованным анти-SIRPA антителом 3F9 на биодатчиках, соответственно. Повышающиеся концентрации меченой гистицином huSIRPA изоформы 1 (10-500 нМ) переливают через захваченное анти-SIRPA антитело 3F9 для записи следов. Наиболее подходящие следы из полученных сенсограмм анализируют для расчета скорости ассоциации, скорости диссоциации и значений аффинности. Три варианта гуманизованного анти-SIRPA антитела 3F9 являются mAb14,70,1 (переменная последовательность тяжелой цепи из SEQ ID №: 3 и переменная последовательность легкой цепи из SEQ ID №: 6), mAb14,70,2 (переменная последовательность тяжелой цепи из SEQ ID №: 3 и переменная последовательность легкой цепи из SEQ ID №: 7) и mAb 14,70,4 (переменная последовательность тяжелой цепи из SEQ ID №: 4 и переменная последовательность легкой цепи из SEQ ID №: 6). Измеренная кинетика связывания гуманизованных анти-SIRPA 3F9 антител суммирована в

табл. 6 ниже, в виде выделенных значений k_a , k_d и КД. Из шести полученных вариантов h3F9, 3 анти-SIRPA антитела (mAb14,70,1: H1/L1; mAb14,70,2: H1/L2; mAb14,70,4: H2/L1) демонстрируют аналогичную аффинность с растворимым SIRPA антигеном в качестве исходного m3F9 анти-SIRPA антитела (переменная последовательность тяжелой цепи из SEQ ID №: 2 и переменная последовательность легкой цепи из SEQ ID №: 5).

Таблица 6

Клон 3F9 антитела	Kon (M- 1s- 1)	Koff (s- 1)	KD (нМ)
Исходное m3F9 IgG1	5,08E+04	1,00E-03	18
mAb14,70,1	1,10E+05	2,00E-03	19
mAb14,70,2	1,10E+05	2,20E-03	20
mAb14,70,4	8,60E+04	9,40E-04	11

В дополнение к связыванию растворимого антигена, измерения аффинности на клеточной основе также были выполнены, чтобы установить очевидную аффинность h3F9 анти-SIRPA антитела относительно m3F9 анти-SIRPA антитела к мембраносвязанному антигену SIRPA v1. Значения EC50 определяют относительную аффинность путем добавления возрастающих концентраций анти-SIRPA 3F9 антитела к клеткам BWZ, сверхэкспрессирующим человеческий SIRPA. Связанные с рецептором антитела определяют окрашиванием клеток анти-мышинным IgG Fc APC или анти-человеческим IgG PE вторичным антителом. Серийные разведения моноклональных антител добавляют к 10^5 BWZ клеткам, сверхэкспрессирующим huSIRPA (BWZ-huSIRPA) и позволяют достичь равновесия связывания при 4°C. После добавления флуоресцентно меченного вторичного антитела и стадий быстрого промывания, значения средней интенсивности флуоресценции (СКП) как функцию от титрованной концентрации антитела записывают через анализ СКАФ. Кривые подбирают с применением нелинейного регрессионного анализа с применением программы Graphpad Prism 6. Эксперименты титрования на клеточной основе с h3F9 анти-SIRPA антителами mAb14,70,1, mAb14,70,2 и mAb14,70,4 дают значения EC50 1,065 нМ, 0,9682 нМ и 1,607 нМ, соответственно. Гуманизированные 3F9 анти-SIRPA антитела дают меньшие значения EC50, чем m3F9 анти-SIRPA антитело (EC50=2,1 нМ), показывая улучшенную аффинность связывания гуманизированного антитела относительно той, которая определена для мышинного 3F9 анти-SIRPA антитела.

Также был проведен конкурентный анализ для расчета значений IC50 анти-SIRPA антител, где увеличивающиеся концентрации гуманизированных и мышинных 3F9 анти-SIRPA антител были добавлены к клеткам BWZ-huSIRPAv1 для вытеснения меченого флуорофором ссылочного антитела. Значения IC50 дают другое сравнение относительной аффинности. В конкурентном анализе, повышающиеся концентрации анти-SIRPA 3F9 антител добавляют к клеткам, экспрессирующим huSIRPA для вытеснения меченого флуорофором ссылочного антитела. Определяют следующие значения IC50: m3F9 =11,54 нМ; mAb14,70,1=3,303 нМ; mAb 14,70,2=2,185 нМ; mAb 14,70,4=4,606 нМ. Эти результаты демонстрируют, что гуманизированные анти-SIRPA антитела настоящего изобретения были более эффективными конкурентами по сравнению со ссылочным m3F9 анти-SIRPA антителом, по связыванию с SIRPA.

Способность h3F9 анти-SIRPA антител снижать поверхностноклеточную экспрессию SIRPA оценивали на первичных человеческих макрофагах (huMacs). Человеческие моноциты выделяют из периферической крови здоровых доноров и дифференцируют в макрофаги *in vitro*, добавляя в среду для выращивания человеческий M-CSF. После дифференциации huMacs собирают и высевают в 96-луночные планшеты для культивирования ткани с повышающейся концентрацией изотипического контроля или растворимых анти-SIRPA антител, и инкубируют в течение ночи при 37°C. Клетки анализируют проточной цитометрией для определения поверхностной экспрессии SIRPA с применением DyLight650-конъюгированного анти-человеческого SIRPA антитела (клон SA56), принадлежащего к отдельной эпиглопной группе анти-SIRPA антитела 3F9. Как показано на фиг. 3, варианты h3F9 анти-SIRPA антитела (mAb14,70,1 (70,1), mAb14,70,2 (70,2) и mAb 14,70,4 (70,4)) отрицательно регулируют уровни экспрессии SIRPA рецептора в макрофагах дозозависимым образом. Однако исходное m3F9 анти-SIRPA антитело демонстрирует большую максимальную отрицательную регуляцию рецептора, чем гуманизированные антитела несмотря на похожие антигенсвязывающие свойства, обсуждаемые выше. Эти результаты подтверждают, что свойства анти-SIRPA антитела вне связывания рецептора определяют функциональную активность анти-SIRPA антитела 3F9 на макрофагах.

Пример 3. Анти-SIRPA антитела, требующие Fc гамма рецепторы (FcγRs) для функциональной активности.

Принципиальной разницей между человеческими и мышинными 3F9 анти-SIRPA антителами является способность привлекать Fc гамма рецепторы (FcγRs). Гуманизированные анти-SIRPA антитела прививают на скелет человеческого IgG4 Fc, про который известно, что он обладает плохими FcγR связывающими свойствами. Гибридома m3F9 анти-SIRPA антитела, несмотря на то, что является мышинным IgG1 антителом, все еще сохраняет связывающую активность в отношении определенных человеческих FcγRs. Для верификации того, что FcγRs модулирует функциональную активность анти-SIRPA антител, m3F9 анти-SIRPA антитело обрабатывают EndoSto, ферментативно удаляя Fc гликан на Asn297, ключе-

вую детерминанту, медирующую IgG-Fc γ R взаимодействие. Первичные человеческие макрофаги от 2 здоровых доноров обрабатывают в течение ночи повышающимися концентрациями гликозилированного или дегликозилированного m3F9 анти-SIRPA антитела. Клетки затем окрашивают DyLight650-конъюгированным анти-SIRPA сылочным антителом (SA56-DyL650), которое связывается с особой эпитопной группой и затем анализируют на поверхностную экспрессию SIRPA анализом СКАФ.

Как показано на фиг. 4А, обе гликоформы m3F9 анти-SIRPA антитела значительно отрицательно регулируют поверхностноклеточную экспрессию SIRPA. Однако, у обоих доноров, дегликозилированный вариант m3F9 анти-SIRPA антитела демонстрирует пониженную максимальную активность по сравнению с таковой, наблюдаемой для гликозилированной формы антитела. В частности, гликозилированное m3F9 анти-SIRPA антитело отрицательно регулирует экспрессию SIRPA на целых 90 и 85% у донора (Dnr) 413 и донора 414, соответственно; в то время как дегликозилированное m3F9 анти-SIRPA антитело достигает только 70 и 75% отрицательной регуляции SIRPA рецептора в макрофагах того же донора, соответственно. Это открытие подтверждает, что анти-SIRPA антитела, в частности, антитело m3F9, требует вовлечения Fc γ R для улучшенной отрицательной регуляции поверхностноклеточной экспрессии SIRPA. Результаты на фиг. 4А представлены как процент от связывания сылочного антитела, полученный делением значения СКП образцов, обработанных анти-SIRPA антителами на значение СКП образцов, обработанных изотипическим контролем.

В дополнение к медирированной антителом отрицательной регуляции рецептора, описанной выше, роль Fc γ Rs оценивают в медирированном 3F9 анти-SIRPA антителом улучшении фагоцитоза опухолевой клетки. Анализ фагоцитоза опухолевой клетки разработан на основе флуоресценции pHrodo. Первичные человеческие макрофаги обрабатывают в течение ночи изотипическим контрольным антителом (MOPC) или указанными вариантами анти-SIRPA 3F9 антитела. Клетки Raji, меченные красителем pHrodo, добавляют к макрофагам и инкубируют при 37°C в течение 2 часов. Red Avidin (Invitrogen) является молекулой стрептоидина, конъюгированной с красителем pHrodo Red, флуорогенным маркером, который приобретает флуоресценцию в кислых средах, таких как фагосома. Для целевого мечения опухолевой клетки, 500 нМ Red Avidin вводят с 15 нМ биотинилированного Lens Culinaris Agglutinin (LCA; Vector Labs). Комплексы Red Avidin-LCA затем смешивают в объемном соотношении 1:1 с 400000 клетками Raji в бессывороточной RPMI среде на льду. Свойства LCA связывать сахар связывают Red Avidin с углеводными структурами на поверхности опухолевой клетки. После стадий быстрой промывки, меченные Red Avidin-LCA клетки Raji смешивают с полученными из моноцита человеческими макрофагами в бессывороточной RPMI среде и инкубируют при 37°C в течение 2 часов. Затем макрофаги собирают и окрашивают на льду анти-CD14 APC в СКАФ буфере, содержащем Fc γ R-блокирующие антитела. Фагоцитозную активность измеряют подсчетом процента CD14/pHrodo двойных положительных макрофагов. В качестве контроля, не меченые клетки Raji смешивают с макрофагами для установления уровней фоновой флуоресценции. Результаты на фиг. 4В представлены как кратное повышение доли популяции pHrodo/CD14 двойных положительных макрофагов.

Как показано на фиг. 4В, макрофаги, обработанные в течение ночи гликозилированным m3F9 анти-SIRPA антителом, демонстрируют ~2-кратное повышение фагоцитоза опухолевых клеток по сравнению с таковым, наблюдаемым для обработанных изотипическим контрольным антителом макрофагов. Макрофаги, обработанные дегликозилированным m3F9 анти-SIRPA антителом, демонстрируют ~1,5-кратное повышение фагоцитоза опухолевых клеток по сравнению с обработанными изотипическим контрольным антителом макрофагами. Такое ~1,5-кратное повышение фагоцитоза опухолевых клеток представляет статистически значимое ~50% снижение активности по отношению к таковой, наблюдаемой для гликозилированного m3F9 анти-SIRPA антитела. Более того, макрофаги, обработанные h3F9 IgG4 (mAb14,70,1 или mAb14,70,2) не демонстрируют какую-либо способность улучшать фагоцитоз опухолевой клетки выше базовых уровней.

Предыдущие исследования устанавливают корреляцию между повышенной фагоцитозной активностью и CD14 отрицательной регуляцией при стимулировании макрофагов 3F9 анти-SIRPA антителом. Для определения того, зависит ли также эта корреляция, по меньшей мере, частично, от Fc γ Rs, первичные человеческие макрофаги обрабатывают в течение ночи либо гликозилированными m3F9, либо h3F9 вариантами IgG4 анти-SIRPA антитела (mAb14,70,1, mAb14,70,2 и mAb14,70,4) и анализируют на фагоцитоз опухолевой клетки и экспрессию CD14. Как показано на фиг. 5А, только макрофаги, обработанные m3F9 анти-SIRPA антителом, показывают улучшенный фагоцитоз клеток Raji по отношению к тем, который наблюдается для макрофагов, обработанных изотипическим контрольным антителом. Результаты представлены как кратное повышение доли популяции pHrodo/CD14 двойных положительных макрофагов. Гуманизированные анти-SIRPA IgG4 антитела не смогли улучшить фагоцитоз клеток Raji. Также, только стимулирование m3F9 анти-SIRPA антителом отрицательно регулирует CD14 экспрессию на макрофагах, в то время как h3F9 варианты IgG4 анти-SIRPA антитела не изменяют CD14 экспрессию (фиг. 5В). В дополнение к поддержке корреляции между уровнем экспрессии CD14 и фагоцитарной активностью в макрофагах, эти результаты подтверждают, что функциональная активность 3F9 анти-SIRPA антитела зависит, по меньшей мере, частично, от Fc γ Rs.

Пример 4. Отрицательная регуляция CD32 анти-SIRPA антителами.

В добавление к представляющему интерес целевому антигену, клетки миелоидной линии также экспрессируют множество Fc рецепторов, способных связываться с Fc доменом терапевтического антитела. Fc гамма рецепторы (Fc γ R) составляют наиболее охарактеризованный и наиболее эффективный класс рецепторов для медиации Fc-зависимых эффекторных функций. Fc γ Rs состоит из обоих ИТАМ-ассоциированных активирующих рецепторов (CD64/Fc γ RI, CD32A/Fc γ RIIA и CD16A/Fc γ RIIA) и ИТИМ-несущих ингибирующих рецепторов (CD32B/Fc γ RIIB), и соэкспрессия активирующих/ингибирующих рецепторов на одной и той же клетке устанавливает порог для клеточной активации. В общем, лигирование активирующих Fc γ Rs иммунными комплексами инициирует несколько сигнальных каскадов, которые приводят к клеточной активации и последующей индукции эффекторных функций. Эти активности варьируются среди типов миелоидных клеток, но могут включать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность, антитело-зависимый клеточный фагоцитоз и положительную регуляцию нескольких провоспалительных цитокинов и хемокинов, и т.д. Наоборот, лигирование ингибирующего рецептора, Fc γ RIIB, иммунными комплексами препятствует иммуностимулирующим сигналам активации Fc γ Rs, поддерживая сохранение гомеостаза тканей. Например, в нескольких исследованиях было установлено, что генетический нокаут Fc γ RIIB вызывает усиленную активность провоспалительных макрофагов в мышечных моделях медирированного иммунным комплексом воспаления. Так как Fc γ RIIB является единственным Fc γ R с ингибирующим действием, он играет центральную роль в регулировании Fc γ R-медирированного воспаления миелоидными клетками. В контексте микросреды опухоли, уровни экспрессии Fc γ RIIB могут определять состояние поляризации опухоль-ассоциированных макрофагов и регулирование эффекторной функции макрофага *in vivo*.

Для определения того, какой Fc γ R способствует *in vitro* активности 3F9 анти-SIRPA антитела, полученные из моноцита макрофаги берут от двух здоровых доноров, обрабатывают в течение ночи либо изотипическим контрольным антителом, либо анти-SIRPA антителом m3F9 и затем оценивают уровни поверхностной экспрессии Fc γ RIIA (CD16), Fc γ RI (CD64) и Fc γ RIIA/B (CD32A/B). Как показано на фиг. 6A, обработка m3F9 анти-SIRPA антителом по существу снижает поверхностную экспрессию CD32A/B относительно той, которую наблюдают в обработанных изотипическим контрольным антителом макрофагах. Так как идентифицирующее антитело, применяемое для измерения поверхностных уровней Fc γ RII (клон FUN-2; Biolegend) не различает активирующий рецептор Fc γ RIIA и ингибирующий рецептор Fc γ RIIB, этот анализ повторяют со специфическими к рецептору антителами. Как описано ранее, полученные из моноцита макрофаги, взятые у двух здоровых доноров, обрабатывают в течение ночи либо изотипическим контрольным антителом, либо указанным вариантом 3F9 анти-SIRPA антитела. На фиг. 6B показано, что анти-SIRPA антитело m3F9 значительно отрицательно регулирует Fc γ RIIA в макрофагах на ~70-85% относительно того, что наблюдается в обработанных изотипическим контрольным антителом клетках. Этот эффект зависит от Fc домена, так как оба, h3F9 IgG4 вариант (mAb14,70,2) и дегликозилированная форма мышинового антитела, нейтрализуют отрицательную регуляцию Fc γ RIIA.

При оценке поверхностной экспрессии Fc γ RIIB, обработка анти-SIRPA антителом m3F9 снижает экспрессию ингибирующего рецептора до практически неопределяемых уровней относительно тех, которые наблюдаются в обработанных изотипическим контрольным антителом макрофагах (фиг. 6B). Наоборот, никакой значительной отрицательной регуляции Fc γ RI/CD64 или Fc γ RIIA/CD16A не наблюдали на обработанных анти-SIRPA антителом 3F9 макрофагах по сравнению с обработанными изотипическим контролем клетками, показывая, что обработка анти-SIRPA 3F9 антителом не изменяет CD16 и CD64 экспрессию на первичных человеческих макрофагах (данные не показаны).

Для подтверждения того, что CD32A/B требуется для функциональной активности анти-SIRPA антитела m3F9, эксперименты с селективной Fc γ R блокадой проводят для оценки роли отдельных Fc γ Rs в медирированной антителом отрицательной регуляцией SIRPA и фагоцитозе опухолевой клетки. В экспериментах с блокированием, первичные человеческие макрофаги от двух здоровых доноров предварительно инкубируют с анти-CD16 или анти-CD32A/B блокирующими антителами в течение 15 минут на льду. Затем клетки инкубируют в течение ночи либо с изотипическим контролем (MOPC21), либо с m3F9 анти-SIRPA антителами. Экспрессию SIRPA определяют с DyLight650-конъюгированным анти-SIRPA ссылочным антителом (SA56-DyL650). Результаты представлены как процент связывания ссылочного антитела, полученный делением значения СКП образцов, обработанных анти-SIRPA антителами, на значение СКП образцов, обработанных изотипическим контролем. Как показано на фиг. 7A, CD16 блокада не прерывает отрицательную регуляцию SIRPA после обработки анти-SIRPA антителом m3F9 относительно той, которая наблюдается в макрофагах, не обработанных Fc γ R-блокирующими антителами. Наоборот, m3F9-медирированная отрицательная регуляция SIRPA была значительно ухудшена в макрофагах, прединкубированных с анти-CD32A/B блокирующими антителами.

Чтобы убедиться, что CD32A/B блокада также задерживает фагоцитоз, первичные человеческие макрофаги прединкубируют с анти-CD32A/B блокирующим антителом и обрабатывают в течение ночи с изотипическим контрольным антителом или анти-SIRPA антителом m3F9. Клетки Raji, меченные краси-

телем pHrodo, смешивают с макрофагами и инкубируют при 37°C в течение 2 часов. Результаты представлены как кратное повышение процента популяции pHrodo/CD14 двойных положительных макрофагов. Как показано на фиг. 7B, обработанные m3F9 макрофаги от обоих доноров улучшают фагоцитоз клеток Raji ~2-кратно относительно того, который показан в обработанных изотипическим контрольным антителом макрофагах. Однако CD32A/B блокада частично или полностью блокирует m3F9-медирированное улучшение фагоцитоза опухолевой клетки. Взяты вместе, эти результаты устанавливают, что вовлечение CD32A/B функционально требуется для активности анти-SIRPA антитела m3F9.

Пример 5. Созревание аффинности h3F9 анти-SIRPA антитела.

Проводят созревание аффинности гуманизованного h3F9 анти-SIRPA антитела. Коротко, определенные аминокислотные остатки в тяжелой и легкой цепи селективно мутагенизируют, и мутанты, которые улучшают связывание, выбирают через дополнительные циклы скрининга. Этот процесс одновременно улучшает специфичность, межвидовую перекрестную реактивность и профили проявляемости, позволяя точно настроить свойства, вовлеченные в желаемый механизм действия, эффективность биологических анализов и предклиническое моделирование. Характеризация включает измерения Forte Bio и MSD аффинности, клеточное связывание и несколько анализов проявляемости. После первого цикла созревания аффинности, антитела с улучшенной аффинностью также демонстрируют улучшенную полиспецифическую реактивность (ПСП), которая применяется для определения неспецифического связывания антитела. Таким образом, второй цикл созревания аффинности проводят для улучшения аффинности без повышения ПСП.

Последовательности варибельного домена тяжелой цепи и легкой цепи.

С применением стандартных методов, определяют аминокислотные последовательности варибельных доменов легкой цепи и варибельных доменов тяжелой цепи аффинно-зрелых антител, описанных в данном документе. Последовательности HVR легкой цепи антител представлены в табл. 7-8. Последовательности HVR легкой цепи антител представлены в табл. 7. Последовательности HVR тяжелой цепи антител представлены в табл. 8. Последовательности каркасных участков легкой цепи и тяжелой цепи (КО) антител представлены в табл. 9. Последовательности варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи антител представлены ниже в табл. 10.

Таблица 7

Последовательности HVR легкой цепи аффинно-зрелых анти-SIRPA антител

		SEQ ID №:	mAb ID (3F9-#)
HVR-L1	RASKSVSS GGYSYMH	9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 и 25
HVR-L2	LASNLES	10	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 и 25
HVR-L3	QHNRELPS T	11	1, 10 и 18
	QHNRELPC T	12	2
	QHNRELPI T	13	3, 11 и 19
	QHNRELPP T	14	4, 12 и 20
	QHNRELPT T	15	5, 13 и 21
	QHNRELPV T	16	6, 14 и 22
	QHNRELPA T	17	7, 15 и 23
	QHNRELPG T	18	8, 16 и 24
	QHNRELPW T	19	9, 17 и 25

Таблица 8
Последовательности HVR тяжелой цепи аффинно-зрелых анти-SIRPA антител

		SEQ ID №:	mAb ID (3F9-#)
HVR-H1	GFTFSSYAM S	20	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 и 25
HVR-H2	TISEYGGSYT YYAESVKG	21	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 и 25
HVR-H3	PPYDDYYGG FAY	22	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9
	PPYDDYYGG FRY	23	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 и 17
	PPYDDYYGG FQY	24	18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 и 25

Таблица 9
Последовательности каркасного участка тяжелой и легкой цепи аффинно-зрелых анти-SIRPA антител

FR	VH	SEQ ID №:	VL	SEQ ID №:
FR 1	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAAS	25	DIQLTQSPSSLSASV GDRVITTC	29
FR 2	WVRQAPGKGLEWVA	26	WYQQKPGKAPKLL IY	30
FR 3	RFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYXAP	27	GVPSRFSGSGSGTD FTLTISVQPEDFAT YYC	31
FR 4	WGQGTLLTVSS	28	FGQGTKLEIK	32

Таблица 10

Варибельная область тяжелой цепи		
	SEQ ID №:	mAb ID (3F9-#)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYG GSYTYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYXAPPYDDYYGGF AYWGQGTLLTVSS	33	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYG GSYTYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQ	34	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 и 17

MNSLRAEDTAVYYXAPPPYDDYYGGFR YWGQGLVTVSS		
EVQLLESGGLVQPGGSLRSLCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYG GSYTYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYXAPPPYDDYYGGF QYWGQGLVTVSS	35	18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 и 25
Варибельная область легкой цепи		
	SEQ ID №:	mAb ID (3F9-#)
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASKSV SSGGYSYMHWYQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFLTISSVQPE DFATYYCQHNRELPTFGQGKLEIK	36	1, 10 и 18
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASKSV SSGGYSYMHWYQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFLTISSVQPE DFATYYCQHNRELPTFGQGKLEIK	37	2
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASKSV SSGGYSYMHWYQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFLTISSVQPE DFATYYCQHNRELPTFGQGKLEIK	38	3, 11 и 19
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASKSV SSGGYSYMHWYQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFLTISSVQPE DFATYYCQHNRELPTFGQGKLEIK	39	4, 12 и 20
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASKSV SSGGYSYMHWYQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFLTISSVQPE DFATYYCQHNRELPTFGQGKLEIK	40	5, 13 и 21
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASKSV SSGGYSYMHWYQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFLTISSVQPE DFATYYCQHNRELPTFGQGKLEIK	41	6, 14 и 22
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASKSV	42	7, 15 и 23
SSGGYSYMHWYQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFLTISSVQPE DFATYYCQHNRELPTFGQGKLEIK		
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASKSV SSGGYSYMHWYQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFLTISSVQPE DFATYYCQHNRELPTFGQGKLEIK	43	8, 16 и 24
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASKSV SSGGYSYMHWYQKPGKAPKLLIYLAS NLESGVPSRFSGSGSGTDFLTISSVQPE DFATYYCQHNRELPTFGQGKLEIK	44	9, 17 и 25

Пример 6. Характеризация аффинно зрелых анти-SIRPA антител.

Исходная характеристика аффинно зрелых анти-SIRPA антител, описанных здесь, включает проведение измерений приобретенной антигенной аффинности с применением биослойной интерферометрии (БСИ) на инструменте Pall ForteBio Octet RED96. Иммуобилизуют анти-мышинные IgG Fc или анти-человеческие IgG Fc антитела, захваченные мышинным анти-SIRPA 3F9 антителом и гуманизированным анти-SIRPA 3F9 антителом на биодатчиках, соответственно. Однотактную кинетику проводят с 25 нМ huSIRPA или 50 нМ huSIRPB1, перетекающими над захваченным антителом 3F9 для записи следов. Ана-

лиз данных проводят с применением программы ForteBio Data Analysis Software, версия 9.0. Стандартный кинетический буфер (ФРФБ, 0,1% АБС, 0,02% Tween-20, pH 7,2) применяют для анализа и для получения реагентов. После уравнивания датчика в буфере, анти-SIRPA антитело h3F9 (2 мкг/мл, время загрузки 300 с) или аффинно-зрелые варианты анти-SIRPA антитела h3F9 захватывают на биодатчиках Anti-Human IgG Fc Capture Dip and Read Biosensors (Pall ForteBio, Menlo Park, CA). 50 нМ меченные гистидином человеческие SIRPA v1 или человеческие SIRPB1 (Novoprotein, Summit, NJ, USA) затем связывают с покрытой захваченным анти-SIRPA антителом поверхностью (время ассоциации 200 с, время диссоциации 900 с). Полученный БСИ сигнал получают как разницу ответов от ссылочного (2 мкг/мл 3F9+0 нМ SIRPA) датчика. Ноль-лигандный контроль (0 мкг/мл 3F9+200 нМ SIRPA) не показал измеримого не специфического связывания SIRPA с поверхностью конца датчика. Кинетический анализ единой кривой проводят с применением 1:1 модели взаимодействия для получения констант скорости ассоциации и диссоциации (k_a и k_d , соответственно) для каждого антитела. Константы аффинности (KD) рассчитывают из отношения k_d/k_a . Получают сенсограммы связывания с растворимым huSIRPA и huSIRPB1 для 25 антител потомства анти-SIRPA и одного исходного антитела и наиболее соответствующие следы применяют для расчета скорости ассоциации, скорости диссоциации и значений аффинности. Измерения аффинности (k_a , k_d и KD), полученные из анализа подбора кривой сенсограмм, полученных в этих экспериментах, суммированы в табл. 11. Все -релые анти-SIRPA антитела, не имеющие измеримой перекрестной реактивности с huSIRPB1 (данные не показаны) и шесть аффинно-зрелых анти-SIRPA антител (3F9-18, 3F9-12, 3F9-23, 3F9-14, 3F9-22 и 3F9-20) демонстрируют ~10-кратное повышение аффинности в отношении растворимого huSIRPA относительно той, которую наблюдают для исходного анти-SIRPA антитела h3F9.

Таблица 11

Кинетика связывания аффинно-зрелых h3F9 антител

Ab ID (3F9-#)	KD (M)	kon (Ms) ⁻¹	koff (s ⁻¹)
18	4,19E-10	1,37E+05	5,74E-05
12	4,29E-10	1,39E+05	5,96E-05
23	5,39E-10	1,69E+05	9,11E-05
14	6,18E-10	1,65E+05	1,02E-04
22	6,46E-10	1,74E+05	1,13E-04
20	8,50E-10	1,50E+05	1,28E-04
16	1,27E-09	1,19E+05	1,51E-04
21	1,03E-09	1,48E+05	1,52E-04
24	1,07E-09	1,44E+05	1,55E-04
25	1,06E-09	1,53E+05	1,62E-04
7	1,81E-09	9,92E+04	1,80E-04
19	1,29E-09	1,41E+05	1,81E-04
11	1,43E-09	1,34E+05	1,92E-04
6	1,65E-09	1,16E+05	1,92E-04
13	1,38E-09	1,46E+05	2,01E-04
10	1,51E-09	1,34E+05	2,01E-04
4	1,79E-09	1,13E+05	2,03E-04
1	2,09E-09	1,06E+05	2,22E-04
2	2,06E-09	1,08E+05	2,22E-04
17	1,70E-09	1,40E+05	2,38E-04
5	2,95E-09	9,36E+04	2,76E-04
8	3,60E-09	7,66E+04	2,76E-04
9	3,38E-09	8,94E+04	3,02E-04
15	6,28E-09	5,76E+04	3,62E-04
3	4,43E-09	9,39E+04	4,16E-04
h3F9	6,48E-09	1,84E+05	1,19E-03

Клеточные измерения аффинности также проводят для того, чтобы убедиться в кажущемся сродстве аффинно-зрелых 3F9 анти-SIRPA антител к экспрессированному на клеточной поверхности антигену. Серийные разведения каждого из анти-SIRPA моноклональных антител добавляют к 10^5 BWZ-huSIRPA клеткам и позволяют достичь равновесия связывания при 4°C. После добавления флуоресцентно меченого вторичного антитела и стадий быстрого промывания, значения СКП как функцию от титрованной

концентрации антитела записывают через анализ СКАФ. Значения EC50 (перечислены ниже) определяют относительную аффинность добавлением повышающихся концентраций вариантов 3F9 антитела к клеткам BWZ, сверхэкспрессирующим человеческий SIRPA. Связанные рецептором антитела определяют окрашиванием клеток анти-человеческим IgG PE вторичным антителом. Кривые подгоняют с применением нелинейного регрессионного анализа программой Graphpad Prism 6. Клеточные эксперименты титрования с мышинными 3F9 и гуманизированными аффинно зрелыми анти-SIRPA антителами показали улучшение значений EC50 гуманизированных аффинно зрелых анти-SIRPA антител; два анти-SIRPA антитела показывают значительное улучшение значений EC50 (mAb3F9-14=0,42 нМ и mAb 3F9-22=0,49 нМ) по сравнению с теми, которые получили для анти-SIRPA 3F9 mIgG1 антитела (0,72 нМ). Смотрите табл. 12 ниже.

Таблица 12

	3F9-14	3F9-17	3F9-18	3F9-20	3F9-21	3F9-22	3F9-25	3F9 mIgG1
EC50 (нМ)	0,42	0,61	0,51	0,49	0,64	0,49	0,96	0,72

Пример 7. Перекрестная реактивность аффинно зрелых анти-SIRPA антител с антигенными вариантами SIRPA.

CD47-связывающий домен человеческого SIRPA является высоко полиморфным, что может затруднять разработку CD47-блокирующих анти-SIRPA антител, способных распознавать все аллельные варианты SIRPA, экспрессированные в человеческих популяциях. Фактически, два наиболее частых аллеля человеческого SIRPA (v1 и v2) также являются наиболее дивергирующими в последовательности с 13 остатками, различающимися в IgV домене. Поскольку исследования конкуренции с CD47 показали, что анти-SIRPA антитело m3F9 связывает область, отличную от сайта связывания лиганда CD47, были проведены анализы связывания для проверки перекрестной реактивности между человеческими SIRPA v1 и v2, а также межвидовой реактивности для определения соответствующих животных моделей для токсикологических исследований.

В анализе ELISA, 96-луночные планшеты Immulon HBX покрывают His- или Fc-меченным SIRPA данных видов, как указано, в количестве 1 мкг/мл в ФРФБ в течение ночи при 4°C. Планшеты блокируют в 5% (мас./об.) альбумине бычьей сыворотки в ФРФБ в течение 1 часа, после чего их промывают 3 раза ФРФБ/0,05% Tween 20 (ФРФБ/Т).

Анти-SIRPA антитела добавляют в планшет в серийном разведении и инкубируют при комнатной температуре в течение 2 часов, после чего несвязанное антитело удаляют промыванием ФРФБ/Т. Конъюгированное с пероксидазой из хрена анти-мышинное IgG или анти-человеческую каппа легкую цепь (Jackson ImmunoResearch) затем добавляют в лунки и инкубируют в течение 30 минут. Несвязанное антитело удаляют промыванием с ФРФБ/Т, после чего связанное антитело определяют с применением тетрамилбензидина (ТМБ). Реакцию останавливают 2N H₂SO₄, после чего планшеты считывают при A450.

Исходное мышинное 3F9 анти-SIRPA антитело связывает и v1 и v2 версии человеческого SIRPA-Fc с похожими значениями EC50 (0,695 и 0,789 нМ, соответственно). Частичное снижение кажущейся аффинности наблюдается с His-меченным человеческим антигеном, позволяя предположить большее авидное связывание с Fc-меченным SIRPA. Дополнительно, исходное мышинное 3F9 анти-SIRPA антитело демонстрирует слабую перекрестную реактивность с Fc- и His-меченным SIRPA яванского макака (EC50=1,09 нМ). Никакого определяемого связывания не наблюдается с крысиным SIRPA.

После созревания аффинности исходного антитела, как описано выше, два потомства анти-SIRPA антитела, mAb3F9-14 и mAb3F9-22, сопоставляют с той же панелью SIRPA антигенов для оценки перекрестной реактивности. Что касается анти-SIRPA антитела m3F9, оба, гуманизированное и аффинно зрелое анти-SIRPA антитела, сохраняют активность связывания против человеческого SIRPA v1 и v2, но со значительно меньшими значениями EC50, подтверждая повышение аффинности, наблюдаемое в экспериментах с биодатчиками и анализах клеточного связывания, описанных выше. Несмотря на повышенную аффинность к человеческому SIRPA v1 и v2, анти-SIRPA антитело 3F9-14 демонстрирует слабую перекрестную реактивность с SIRPA яванского макака; кривые связывания дают значения EC50 (EC50=0,879 нМ), аналогичные тем, которые наблюдают для анти-SIRPA антитела m3F9. Наоборот, анти-SIRPA антитело 3F9-22 демонстрирует активность связывания с SIRPA яванского макака, эквивалентную обоим вариантам человеческого SIRPA (EC50=0,107нМ). Ни 3F9-14, ни 3F9-22 антитело не связывается с крысиным SIRPA (данные не показаны). EC50, рассчитанные из кривых связывания, перечислены ниже и устанавливают, что все анти-SIRPA антитела связывают оба аллельных варианта человеческого SIRPA. Только анти-SIRPA антитело hu3F9-22 связывает SIRPA яванского макака с похожей аффинностью со связыванием с человеческим SIRPA. В табл. 13 ниже показаны значения EC50 анти-SIRPA антител с разными белками SIRPA (нМ).

Таблица 13

ELISA	huSIPRA v.1 CAA71403.1	huSIRPA v.2 NP542970.1	SIRPA яванского макака XP015313153.1
3F9 mIgG1	0,789	0,695	1,089
3F9-14	0,093	0,080	0,879
3F9-22	0,108	0,082	0,107

Похожие эксперименты ELISA проводят для определения значений EC50 для анти-SIRPA антитела 9C2 (см. ниже аминокислотные последовательности анти-SIRPA антитела 9C2) и 3F9 к панели разных белков SIRPA и SIRPB. В табл. 14 ниже показаны значения EC50 этих анти-SIRPA антител для разных белков SIRP (нМ).

Таблица 14

	SIRPA v2	SIRPB1- Fc изо. 1	SIRPB1- Fc изо. 3	SIRPB1- His изо. 3	SIRPA яванского макака	SIRPB1 яванского макака
mAb9C2	0,3578	н.с.	0,3822	0,4251	7,439	н.с.
mAb3F9	0,3528	н.с.	0,3188	0,4353	0,6582	н.с.

Номера доступа: CAA71403,1 (SIRPA v2); 000241,5 (SIRPB1 изо. 1); Q5TFQ8,1 (SIRPB1 изо. 3); NP001271679,1 (SIRPA яванского макака); XP005568598 (SIRPB1 яванского макака); н.с. = нет связывания.

Учитывая высокое сходство последовательностей между белками SIRPA нескольких видов, как показано на фиг. 1, клоны потомства анти-SIRPA антитела также проверяли на перекрестную реактивность против дополнительных антигенов SIRPA от различных видов млекопитающих. Fc-меченный SIRPA мартышки (№ доступа JAB51896) или собачий SIRPA (№ доступа XP005634938) или кроличий SIRPA (№ доступа G1U015) наносят на планшеты и инкубируют с повышающимися концентрациями анти-SIRPA антитела hu3F9-14 и hu3F9-22. Оба анти-SIRPA mAb3F9-14 и mAb 3F9-22 распознают SIRPA мартышки и собаки, хотя и с меньшей аффинностью, чем наблюдается с человеческим SIRPA. Например, значения EC50 для 3F9-14 связывания SIRPA мартышки и собаки составляют 1,2 нМ и 0,64 нМ, соответственно. Также, значения EC50 для 3F9-22 связывания SIRPA мартышки и собаки составляют 4,3 нМ и 0,83 нМ, соответственно. Ни клон 3F9-14 анти-SIRPA антитела, ни 3F9-22 не связывают кроличий SIRPA.

Пример 8. Аффинно-зрелые анти-SIRPA антитела отрицательно регулируют SIRPA и CD32A/B.

Предыдущие эксперименты установили, что анти-SIRPA антитело m3F9 неконкурентно вызывают антагонизм к связыванию CD47 с SIRPA через снижение поверхностной экспрессии SIRPA, что вызывает увеличение способности стимулировать поглощение опухолевых клеток макрофагами по сравнению с CD47-блокирующими анти-SIRPA антителами. Аффинно-зрелые анти-SIRPA антитела оценивают для определения сохранения похожих функциональных свойств с мышинным антителом.

Так как анти-SIRPA антитело m3F9 (на мышинном скелете IgG1) отрицательно регулирует SIRPA и CD32A/B Fc-зависимым образом, получают химерные антитела, в которых Fab последовательность исходного анти-SIRPA антитела m3F9 гибридируют с Fc доменом дикого типа человеческого IgG1 (3F9 huIgG1) или человеческого IgG1 Fc, несущего S267E/L328F мутации (3F9-SELF) в тяжелой цепи. Fc SELF мутации >100-кратно улучшают связывание с человеческим FcγR2B/CD32B относительно дикого типа человеческого IgG1 Fc. Человеческие моноциты выделяют из периферической крови здоровых доноров и дифференцируют *in vitro* в макрофаги с человеческим M-CSF. После дифференциации, huMac5 собирают и высевают в 96-луночные планшеты для культивирования тканей с повышающейся концентрацией изотипического контроля или растворимого анти-SIRPA антитела и инкубируют в течение ночи при 37°C. Клетки анализируют проточной цитометрией для определения поверхностной экспрессии SIRPA и C32A/B с применением DyLight650-конъюгированного анти-человеческого SIRPA антитела (клон SA56) и FITC-меченого анти-CD32A/B (FUN-2). В соответствии с предыдущими наблюдениями, анти-SIRPA антитело 3F9 mIgG1 демонстрирует устойчивую дозозависимую отрицательную регуляцию обоих, SIRPA и CD32A/B. Однако, химерное анти-SIRPA 3F9 huIgG1 антитело показало пониженную эффективность отрицательной регуляции рецептора по сравнению с мышинным антителом (данные не показаны). Эти результаты представляют дополнительное доказательство того, что Fc домен антитела играет важную роль в активности. Конструирование SELF мутаций в Fc домене химерного 3F9 (3F9-SELF) восстанавливает способность отрицательно регулировать SIRPA и CD32A/B до уровней, аналогичных наблюдаемым с анти-SIRPA антителом 3F9 mIgG1. Этот результат подтверждает, что CD32A/B служит в качестве важного корцептора для m3F9 активности на макрофагах.

Более ранние эксперименты показали, что гуманизированные варианты анти-SIRPA антитела 3F9, привитые на скелет человеческого IgG4, теряют функциональную активность. Аффинно-зрелые вариан-

ты анти-SIRPA антитела 3F9 получают на скелете человеческого IgG1 и оценивают их способность отрицательно регулировать SIRPA и CD32A/B по сравнению с исходным анти-SIRPA антителом m3F9 и химерным анти-SIRPA антителом 3F9 huIgG1. Экспрессию SIRPA и CD32A/B определяют с анти-SIRPA DyLight650 (клон SA56) и анти-CD32A/B FITC (клон FUN2). Аффинно-зрелые антитела 3F9-14, 3F9-18, 3F9-20 и 3F9-22 отрицательно регулируют SIRPA до уровней, аналогичных тем, которые наблюдают для исходного анти-SIRPA m3F9 антитела (данные не показаны). Однако, те же аффинно-зрелые анти-SIRPA антитела только минимально улучшают отрицательную регуляцию CD32A/B по сравнению с той, которую наблюдают с химерным анти-SIRPA 3F9 huIgG1 антителом. Эти результаты показывают, что улучшение аффинности антитела к антигену компенсирует Fc-зависимость отрицательной регуляции на целевом рецепторе (т.е. SIRPA), но не Fc-медирированные взаимодействия с Fc γ Rs.

Чтобы определить, усиливает ли дополнительно конструирование Fc отрицательную регуляцию SIRPA за счет аффинно-зрелыми анти-SIRPA антителами, точечные мутации SELF были введены в Fc домен анти-SIRPA 3F9-22 huIgG1 антитела. Первичные человеческие макрофаги от 4 здоровых доноров обрабатывают в течение ночи повышающимися концентрациями гуманизированного анти-SIRPA 3F9-22 антитела, несущими дикий тип человеческого IgG1 Fc или человеческого IgG1 S267E/L328F Fc (SELF). Экспрессию SIRPA определяют с анти-SIRPA DyLight650 (клон SA56). Доноров крови генотируют для CD32A-R/H131 полиморфизма посредством кПЦП. На фиг. 8A и 8B показаны типовые результаты этих экспериментов по сравнению с активностью обоих Fc вариантов. Среди индивидуумов, гомозиготных для CD32A-H131 аллеля (доноры 516 и 517 были верифицированы кПЦП), оба Fc варианта анти-SIRPA 3F9-22 антитела отрицательно регулируют SIRPA до уровней, аналогичных тем, которые наблюдают на человеческих макрофагах (фиг. 8B). Этот результат показывает, что улучшенное связывание с Fc γ R2B не усиливает медирированную антителом отрицательную регуляцию SIRPA.

Среди индивидуумов, гетерозиготных для обоих CD32A-H131 и -R131 аллелей, анти-SIRPA 3F9-22 huIgG1 Fc вариант показал большую максимальную отрицательную регуляцию SIRPA, чем так, которую наблюдали для SELF Fc варианта (фиг. 8A). Вместо того чтобы усиливать отрицательную регуляцию SIRPA, SELF Fc может ограничивать эту функцию. Следует отметить, что мутации SELF усиливают аффинность Fc в отношении CD32B, а также аллеля CD32A-R131. Учитывая, что человеческие макрофаги экспрессируют более высокие уровни CD32A, чем CD32B, макрофаги от индивидуумов, экспрессирующих CD32A-R131, могут секвестрировать анти-SIRPA антитело 3F9-22 от SIRPA или CD32B, чтобы ограничить максимальную активность отрицательной регуляции.

В табл. 15 ниже представлено краткое описание результатов медирированной антителом отрицательной регуляции SIRPA и CD32 на колонии человеческих макрофагов U937. В этих исследованиях, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения сравнивают с описанным ранее анти-SIRPA антителом KWAR23 (раскрытым в публикации международной заявки на патент № WO 2015/138600). Как показано в табл. 15, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения отрицательно регулируют или снижают поверхностноклеточную экспрессию SIRPA в U937 клетках, с процентом максимальной отрицательной регуляции 68-76%. Для сравнения, анти-SIRPA антитело KWAR23 способно отрицательно регулировать поверхностноклеточную экспрессию SIRPA только на 9%.

В табл. 15 также показано, что анти-SIRPA антитела настоящего изобретения эффективно отрицательно регулируют или снижают поверхностноклеточную экспрессию CD32 в U937 клетках. Как показано в таблице, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения отрицательно регулируют или снижают поверхностноклеточную экспрессию CD32 в этих клетках с процентом максимальной отрицательной регуляции 49-73%.

Таблица 15

Антитело	SIRPA		CD32	
	IC50 (нМ)	Max % OP	IC50 (нМ)	Max % OP
3F9 huIgG1	0,804	68%	0,9807	49%
3F9 mIgG1	0,105	75%	0,005609	73%
3F9-14	1,17	69%	2,028	50%
3F9-18	2,19	71%	4,861	52%
3F9-20	0,152	75%	0,2706	58%
3F9-22	0,187	76%	0,4305	60%
KWAR23	15,52	9%	0,07118	63%

Пример 9. Аффинно-зрелые анти-SIRPA антитела разрушают SIRPA в макрофагах.

Измерение медирированной антителом отрицательной регуляции рецептора посредством СКАФ подтверждает, что целевое связывание анти-SIRPA антителом снижает поверхностноклеточную экспрессию. Чтобы определить, разрушаются ли интернализированные рецепторы и не рециркулируют ли они впоследствии на клеточную поверхность, человеческие макрофаги анализируют на общие уровни белка

SIRPA с помощью вестерн-блоттинга следующим образом. Первичные человеческие макрофаги, полученные из моноцитов, обрабатывают в течение ночи 5 мкг/мл либо изотипического контроля, либо варианта Fc анти-SIRPA 3F9-22 A330S/P331S (ASPS). Клетки собирают, промывают холодным ФРФБ и лизируют с буфером RIPA с добавлением ингибиторов HALT протеазы/фосфатазы на льду в течение 15 минут. Лизированные клетки центрифугируют для осаждения мембранной фракции и собирают надосадочную фракцию, включающую общий клеточный лизат. Как показано на фиг. 9А, увеличивающиеся количества фракции клеточного лизата из макрофагов, обработанных изотипическим контрольным антителом или анти-SIRPA антителом 3F9-22, загружают в SDS-PAGE и проводят иммуноблоттинг на белок SIRPA с антиген-специфическим антителом. На фиг. 9А, 5 мкг, 10 мкг и 20 мкг лизата цельных клеток загружают на SDS-PAGE и подвергают иммуноблоттингу с цитоплазматическим доменом анти-SIRPA (a-SIRPAct). Полоса, мигрирующая с прогнозированной молекулярной массой SIRPA, определяется в макрофагах, обработанных изотипическим контролем, но не наблюдается в макрофагах, обработанных анти-SIRPA 3F9-22 антителом. В аналогичном эксперименте, клеточные лизаты макрофагов, обработанных изотипическим контролем или обработанных антителом 3F9-22 ASPS, загружают в SDS-PAGE и подвергают иммуноблоттингу на SIRPA и SHP-2, тирозинфосфатазу, которая может связываться с SIRPA и другими рецепторами ИТИМ. На фиг. 9В, 20 мкг лизата цельных клеток загружают в SDS-PAGE и зондируют с a-SIRPAct и анти-SHP2. Блоты демонстрируют, что уровень белка SIRPA снижается при обработке mAb3F9-22. Как показано на фиг. 9В, стимуляция анти-SIRPA антителом 3F9-22 приводит к разрушению SIRPA, но не SHP2.

Пример 10. Аффинно-зрелые анти-SIRPA антитела стимулируют фагоцитоз опухолевых клеток в макрофагах.

Предыдущие эксперименты подтвердили, что аффинно-зрелые анти-SIRPA антитела сохраняют способность отрицательно регулировать SIRPA и CD32A/B, что приводит к разрушению SIRPA в человеческих макрофагах. Аффинно-зрелые антитела

настоящего изобретения исследуют на способность вызывать фагоцитоз опухолевых клеток. Первичные человеческие макрофаги обрабатывают в течение ночи изотипическим контролем или 3F9-22 человеческим IgG1 или 3F9-22 SELF для оценки Fc-зависимого действия на функцию антитела. Клетки Raji, меченные pHrodo, смешивают с макрофагами и инкубируют в течение 2 часов при 37°C. Фагоцитарную активность измеряют подсчетом процента CD14/pHrodo двойных положительных макрофагов. Результаты представлены как кратное увеличение процента популяции pHrodo/CD14 двойных положительных макрофагов. Дополнительно, показаны уровни CD14 экспрессии после фагоцитоза. Как показано на фиг. 10А, оба Fc варианта анти-SIRPA антитела 3F9-22 усиливают фагоцитоз клеток Raji по сравнению с макрофагами, обработанными изотипическим контролем. Хотя антитело 3F9-22 SELF, по видимому, вызывает больший фагоцитоз, чем антитело 3F9-22 huIgG1, это различие не достигает статистической значимости. Дополнительно, оба Fc варианта анти-SIRPA 3F9-22 подавляют экспрессию CD14 до аналогичных уровней, что указывает на аналогичный вызов фагоцитарной активности и статус активации макрофагов.

Отличительным признаком антагонизирования сигнальной оси SIRPA-CD47 является усиление антитело-зависимого фагоцитоза опсонизированных опухолевых клеток. На фиг. 10В, фагоцитоз клеток Raji с добавлением или без добавления опсонизирующего анти-CD20 huIgG1 оценивают на макрофагах, обработанных анти-SIRPA антителом 3F9-22. В макрофагах, обработанных изотипическим контролем, опсонизирующее клетки Raji с анти-CD20 huIgG1 усиливают фагоцитоз опухолевых клеток на ~50% по сравнению с не опсонизированными клетками Raji. Результаты представлены в виде процента популяции pHrodo/CD14 двойных положительных макрофагов. Как показано ранее, макрофаги, стимулированные либо анти-SIRPA антителом 3F9-22 SELF, либо 3F9-22 ASPS, усиливают фагоцитоз не опсонизированных клеток Raji на ~30-40% по сравнению с макрофагами, обработанными изотипическим контролем. Точно так же макрофаги, обработанные анти-SIRPA антителом 3F9-22, усиливают фагоцитоз на ~30% по сравнению с макрофагами, обработанными контролем, смешанными с опсонизированными анти-CD20 клетками Raji. Добавление опсонизированных анти-CD20 клеток Raji к макрофагам, обработанным анти-SIRPA антителом 3F9-22, показало аддитивный эффект на фагоцитоз с ~2-кратным увеличением по сравнению с таковым, наблюдаемым для макрофагов, обработанных контролем, смешанных с не опсонизированными клетками Raji. Хотя оба Fc варианта антитела 3F9-22 вызывают фагоцитоз опухолевых клеток, SELF Fc вариант демонстрирует статистически значимо большую фагоцитарную активность, чем ASPS Fc вариант. Эти результаты подтвердили, что аффинно-зрелые анти-SIRPA антитела настоящего изобретения усиливают фагоцитоз опухолевых клеток в макрофагах за счет антагонизма пути SIRPA-CD47.

В табл. 16 ниже представлено краткое описание значений IC50, определенных для медиированной антителом отрицательной регуляции SIRPA и CD32 в первичных макрофагах человека. Дополнительно, в табл. 16 показано кратное увеличение фагоцитоза, связанного с различными анти-SIRPA антителами настоящего изобретения в первичных макрофагах человека. В этих исследованиях анти-SIRPA антитела настоящего изобретения сравнивают с ранее описанным анти-SIRPA антителом HEFLB (раскрытым в публикации международной заявки на патент №: WO 2017/178653). Как показано в таблице 16, анти-

SIRPA аффинно-зрелые антитела настоящего изобретения имеют более низкие значения IC50 по сравнению с наблюдаемыми для анти-SIRPA 3F9 huIgG1 антитела. Дополнительно, анти-SIRPA антитела 3F9-14, 3F9-18, 3F9-20 и 3F9-22 показали более низкие значения IC50, чем анти-SIRPA антитело HEFLB. Аналогично, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения показали лучшую фагоцитозную активность по сравнению с анти-SIRPA антителом HEFLB.

Таблица 16

Антитело	SIRPA		CD32		Фагоцитоз*
	IC50 (нМ)	Max % OP	IC50 (нМ)	Max % OP	
3F9 huIgG1	0,1722	90%	0,679	67%	1,77
3F9 mIgG1	0,00905	89	0,0623	82%	1,51
3F9-14	0,0372	89%	0,135	62%	1,56
3F9-18	0,0174	90%	0,0915	65%	1,52
3F9-20	0,0283	90%	0,114	66%	1,62
3F9-22	0,0542	91%	0,133	66%	1,68
OSE HEFLB	0,0959	13%	н.о.	н.о.	1,05

н.о. = не определено, * кратное увеличение к базовой активности.

Пример 11. Аффинно-зрелые анти-SIRPA антитела стимулируют фагоцитоз опухолевых клеток в M1 и M2 макрофагах.

Макрофаги претерпевают глубокую фенотипическую трансформацию в ответ на сигналы микро-среды, приобретая различные провоспалительные (M1) или противовоспалительные (M2) фенотипы. Анти-SIRPA антитела настоящего изобретения оценивают по их способности вызывать фагоцитоз опухолевых клеток в гомеостатических (M2-подобных) макрофагах и воспалительных (M1-подобных) макрофагах. Моноциты выделяют из крови здоровых добровольцев с помощью центрифугирования в градиенте плотности над фикоаллом. M1-подобные и M2-подобные макрофаги получают культивированием моноцитов в присутствии GM-CSF (800 Ед/мл; Peprotech) или M-CSF (25 нг/мл; Peprotech) в течение 6 дней. Поляризованные макрофаги обрабатывают в течение ночи изотипическим контрольным антителом или Fc вариантами анти-SIRPA антитела 3F9-22. Флуоресцентно меченые клетки Raji с опсонизирующим анти-CD20 huIgG1 или без него смешивают с макрофагами в течение 2 часов при 37°C. Альтернативно, клетки Raji опсонизируют либо с только анти-CD47 IgG4 (клон hu5F9), либо с анти-CD47 и анти-CD20 huIgG1, и добавляют к необработанным макрофагам.

Фагоцитарную активность измеряют подсчетом процента CD14/pHrodo двойных положительных макрофагов.

Как показано на фиг. 11A, оба Fc варианта обработанных антителом 3F9-22 M2-подобных макрофагов усиливают фагоцитоз опухолевых клеток по сравнению с макрофагами, обработанными контролем. В соответствии с предыдущими наблюдениями, SELF Fc вариант антитела показал статистически значимое увеличение фагоцитоза не опсонизированных и опсонизированных клеток Raji по сравнению с антителом 3F9-22 huIgG1. Кроме того, M2-подобные макрофаги, обработанные анти-SIRPA антителом 3F9-22 SELF, усиливают фагоцитоз не опсонизированных и опсонизированных клеток Raji в той же степени, что и обработанных анти-CD47 IgG4 клеток Raji.

M1-подобные макрофаги, дифференцированные из моноцитов, культивированных в присутствии GM-CSF, обладают свойствами, отличными от M2-подобных макрофагов, полученных из MCSF. Например, полученные из GM-CSF M1-подобные макрофаги уменьшают экспрессию CD14, CD32A/B и SIRPA. Дополнительно, M1-подобные макрофаги, по-видимому, вызывают фагоцитоз не опсонизированных клеток Raji с большей скоростью, чем M2-подобные макрофаги (фиг. 11B), полученные от того же здорового донора. При стимуляции любым из Fc вариантов анти-SIRPA антитела 3F9-22, M1-подобные макрофаги увеличивают фагоцитоз не опсонизированных клеток Raji на -50% по сравнению с макрофагами, обработанными контролем. Опсонизация клеток Raji анти-CD20 huIgG1 не показала аддитивный эффект на фагоцитоз M1-подобными макрофагами, обработанными антителом 3F9-22, что отличается от наблюдений, сделанных с M2-подобными макрофагами. Точно так же клетки Raji, опсонизированные с анти-CD47 IgG4 с или без анти-CD20 huIgG1, также не смогли увеличить фагоцитоз выше базовых уровней при добавлении к M1-подобным макрофагам (фиг. 11B). Поскольку полученные из GM-CSF макрофаги отрицательно регулируют экспрессию FcγR, эти клетки могут обладать более низким потенциалом медирировать антителозависимый фагоцитоз. Эти результаты также свидетельствуют о том, что анти-SIRPA антитело 3F9-22 действует через антагонизм с SIRPA, вызывая фагоцитоз в обоих макрофагах M1 и M2, тогда как анти-CD47 антитела действуют в основном как опсонизирующие агенты, которые требуют вовлечения FcγR на M2-подобных макрофагах для вызова фагоцитоза.

Пример 12. Комбинированные терапии улучшают противоопухолевую активность аффинно-зрелых анти-SIRPA антител.

Небольшое подмножество раковых клеток, называемых опухоль-иницирующими клетками (ОИК) или раковыми стволовыми клетками (РСК), формирует источник самоподдерживающихся раковых клеток, которые обладают способностью самообновляться и поддерживать объем опухоли. Данные свидетельствуют о том, что человеческие клетки солидных опухолей и ОСК положительно регулируют экспрессию CD47, чтобы избежать механизмов иммунного надзора, позволяющих пролиферацию и метастазирование опухолевых клеток. Модели культивирования в Tumorsphere, в которых раковые клетки растут как трехмерные сфероидные клеточные скопления, широко используются для анализа способности РСК к самообновлению и для лучшего моделирования условий роста клеток *in vivo*. Формирование Tumorsphere основано на культивировании раковых клеток на планшетах с ультранизким прикреплением в бессывороточной среде с добавлением факторов роста, таких как эпидермальный фактор роста и основной фактор роста фибробластов. Совместное культивирование Tumorsphere с первичными человеческими макрофагами позволяет оценить анти-SIRPA антитела на жизнеспособность опухолевых клеток либо в качестве отдельного агента, либо в сочетании с другими противоопухолевыми терапиями.

Колонией клеток MDA-MB-231 является хорошо охарактеризованная колония человеческих клеток трижды негативного рака молочной железы тройного отрицательного рака молочной железы, которая, как было показано ранее, образует Tumorsphere. Для измерения жизнеспособности опухолевых клеток в анализах совместного культивирования, клетки MDA-MB-231 трансдуцируют лентивирусом для конститутивной экспрессии люциферазы и GFP (MB231-Luc). Для образования Tumorsphere 10000 клеток MB231-Luc на лунку высевают на 96-луночные планшеты в StemXVivo Serum-Free Tumorsphere Media (R&D Systems) с добавлением гепарина и гидрокортизона. В среду Tumorsphere также добавляют MCSF для поддержки жизнеспособности макрофагов. MB231-Luc культивируют в течение 2-3 дней либо без всего, либо в присутствии 50000 макрофагов/лунку. Жизнеспособность опухолевых клеток количественно оценивают путем измерения активности люциферазы с реагентом OneGlo (Promega), добавленным в каждую лунку, и инкубированием образца в течение 3 мин при комнатной температуре на планшетном шейкере. Сигнал люминесценции регистрируют с помощью микропланшетного ридера BioTek Synergy™ с использованием программного обеспечения GEN5™ 2.04.

Клетки рака молочной железы MDA-MB-231, конститутивно экспрессирующие люциферазу, культивируют либо отдельно, либо в присутствии человеческих макрофагов в бессывороточной среде Tumorsphere с добавлением MCSF. Клетки обрабатывают в течение 2 дней при 37°C с анти-EGFR (2 мкг/мл), анти-PDL1 (2 мкг/мл) или паклитакселом (0,5 мкМ), с или без анти-SIRPA-антитела 3F9-22. Для сравнения, опухолевые клетки отдельно или в присутствии макрофагов обрабатывают анти-CD47 IgG4. Жизнеспособность опухолевых клеток определяют количественно, измеряя активность люциферазы с помощью субстратного реагента OneGlo. Как показано на фиг. 12A, клетки MB231-Luc пролиферируют в культуре с или без макрофагов, исходя из значений люминесценции. Анти-SIRPA антитело 3F9-22 ингибировало жизнеспособность опухолевых клеток только тогда, когда клетки MB231-Luc образовывали Tumorsphere в присутствии макрофагов. Этот результат демонстрирует, что макрофаги сохраняют опухолецидный потенциал в условиях культивирования, оптимизированных для жизнеспособности опухоли. В аналогичных условиях, анти-CD47 IgG4 не ингибирует значительно жизнеспособность MB231-Luc.

После проверки эффективности отдельного агента анти-SIRPA антитела 3F9-22 в этом анализе жизнеспособности Tumorsphere, были проведены дополнительные исследования, чтобы показать эффект комбинированного лечения. Поскольку жизнеспособность опухолевых клеток зависит от EGF, присутствующего в среде, добавление анти-EGFR блокирующего антитела показало сильное ингибирование роста опухоли, когда культивировали только клетки MB231-Luc. Противоопухолевая активность анти-EGFR антитела не усиливается в присутствии необработанных макрофагов. Однако макрофаги, обработанные анти-SIRPA антителом 3F9-22, потенцировали противоопухолевую активность анти-EGFR антитела до статистически значимой степени. В аналогичных условиях культивирования, анти-PDL1 антитело показало неожиданный фенотип через вызов устойчивого апоптоза опухолевых клеток, независимо от присутствия макрофагов. Жизнеспособность клеток MB231-Luc также снижалась при воздействии 500 нМ паклитаксела, химиотерапевтического агента, стабилизирующего микротрубочки, обычно используемого для лечения множества видов рака. Объединение паклитаксела с макрофагами, обработанными анти-SIRPA антителом 3F9-22, также показывает статистически значимое снижение жизнеспособности опухолевых клеток. Эти результаты продемонстрировали, что анти-SIRPA антитела настоящего изобретения усиливают активность противоопухолевых терапий, которые функционируют за счет различных механизмов действия, помимо опсонизации опухолевых клеток.

Клетки рака молочной железы MDA-MB-231, постоянно экспрессирующие люциферазу, культивируют либо отдельно, либо в присутствии человеческих макрофагов в бессывороточной среде Tumorsphere с добавлением MCSF или MCSF+IL-4+IL-10. Где указано, клетки обрабатывают либо анти-SIRPA антителом 3F9-22, либо анти-CD47 IgG4 в течение 3 дней при 37°C. Жизнеспособность опухолевых клеток определяют измерением значений люминесценции после добавления реагента OneGlo, содержащего субстрат люциферазы. Иногда полученные из моноцитов макрофаги от здоровых добровольцев, совместно культивируемые с клетками MB231-Luc, ингибируют жизнеспособность опухолевых клеток без

лечения (фиг. 12B). Чтобы удостовериться, что макрофаги, совместно культивируемые с клетками MB231-Luc, приобрели более опухолеподобный, иммунодепрессивный фенотип, в среду Tumorsphere добавляли IL-4 и IL-10. Как показано на фиг. 12B, культивированные отдельно клетки MB231-Luc пролиферировали одинаково хорошо в средах с добавлением MCSF или MCSF плюс IL-4 и IL-10. Однако в средах, содержащих только MCSF, макрофаги от донора 570 снижали жизнеспособность опухолевых клеток до статистически значимой степени. Это ингибирование отменяется добавлением IL-4 и IL-10, демонстрируя, что различные стратегии культивирования поляризуют макрофаги для модуляции роста опухолевых клеток. Важно отметить, что обработка макрофагов анти-SIRPA антителом 3F9-22 значительно снижает жизнеспособность опухолевых клеток в обоих условиях роста.

Пример 13. Аффинно-зрелые анти-SIRPA антитела улучшают пролиферацию Т-клетки.

Т-клетки образуют иммунологический синапс с антиген-презентирующими клетками (АПК), чтобы инициировать активацию и пролиферацию Т-клеток. CD47 экспрессия на Т-клетках может противодействовать активации, передавая ингибирующий сигнал к АПК через SIRPA. Однако Т-клетки также экспрессируют SIRPG, другой член семейства SIRP, способный связывать CD47, экспрессированный на АПК. Было показано, что взаимодействие SIRPG (Т-клетки) - CD47 (АПК) стабилизирует иммунологический синапс и способствует активации и пролиферации Т-клеток. Хотя анти-CD47 антитела блокируют ингибирующий сигнал, доставляемый через SIRPA, анти-CD47 антитела также блокируют стимулирующий эффект от связывания SIRPG и, таким образом, могут оказывать вредное воздействие на усиление эффективного противоопухолевого Т-клеточного ответа. Следовательно, антагонистические анти-SIRPA антитела позволяют обойти этот потенциальный недостаток, ингибируя передачу сигналов SIRPA без разрыва критических взаимодействий в иммунологическом синапсе. Чтобы проверить эту гипотезу, анти-SIRPA антитела оценивают однофакторным и двухфакторным MLR анализами.

Принцип MLR анализа заключается в том, что АПК, полученные от одного донора, обычно ДК, представляют пептиды на молекулах МНС Т-клеткам, выделенным от отдельного донора. Небольшая фракция Т-клеток будет экспрессировать TCR, способные распознавать комплекс МНС:пептид и пролиферировать при костимуляции. В таком однофакторном MLR, клетки от одного донора участвуют в презентации антигена, а клетки от другого донора отвечают пролиферацией. В двухфакторном MLR, оба донора дают АПК и Т-клетки в реакцию; таким образом, две отдельные популяции Т-клеток отвечают пролиферацией.

Действие анти-SIRPA антител на пролиферацию Т-клеток первоначально оценивают с помощью двухфакторного MLR анализа. PBMC выделяют от здоровых доноров и совместно культивируют в течение 3 дней в присутствии возрастающих концентраций Fc вариантов 3F9-22 или изотипического контроля. Пролиферацию Т-клеток оценивают путем количественной оценки присутствия метаболически активных клеток как показателя количества клеток. Метаболическую активность количественно оценивают с реагентом CellTiter Glo (Promega), который генерирует люминесцентный сигнал пропорционально количеству присутствующего АТФ. Как показано на фиг. 13A, PBMC, обработанные анти-SIRPA антителом 3F9-22, показали ~ 1,5-кратное увеличение люминесценции по сравнению с PBMC, обработанными изотипом, что свидетельствует об увеличении пролиферации Т-клеток. В отличие от анализов фагоцитоза, описанных ранее, Fc вариант антитела 3F9-22 huIgG1 имеет тенденцию стимулировать пролиферацию Т-клеток более эффективно, чем SELF Fc вариант.

Чтобы определить, является ли повышенная люминесценция, наблюдаемая с анти-SIRPA антителом 3F9-22, специфической для анти-SIRPA антител, двухфакторный анализ MLR повторяют с анти-CD47 антителом. Выделяют PBMC от двух здоровых доноров и смешивают по 100000 клеток от каждого донора с увеличивающимися концентрациями тестируемого антитела или изотипического контрольного антитела. Пролиферацию клеток измеряют с реагентом CellTiter Glo через 3 дня совместного культивирования. Как показано на фиг. 13B, анти-SIRPA антитела 3F9-14 и 3F9-22 huIgG1 и Fc варианты ASPS увеличивают сигнал люминесценции на ~70% по сравнению с таковым, наблюдаемым для PBMC, обработанных изотип-контролем. Анти-SIRPA-антитела на SELF Fc (3F9-14 SELF и 3F9-22 SELF) не увеличивают сигнал люминесценции по сравнению с контролем в тех же условиях, оказывая другое Fc-зависимое действие на функцию антитела. В отличие от антитела 3F9-22 huIgG1, обработка анти-CD47 показала незначительное увеличение люминесценции, ~10%. Взятые вместе, результаты двухфакторных MLR экспериментов предполагают, что антагонизм SIRPA анти-SIRPA антителом 3F9-22 huIgG1 способствует пролиферации Т-клеток.

Поскольку количественная оценка метаболической активности с помощью двухфакторного MLR является косвенным измерением пролиферации Т-клеток, были выполнены более традиционные однофакторные MLR анализы для подтверждения стимулирующего действия, наблюдаемого с анти-SIRPA антителом 3F9-22 huIgG1. Первичные человеческие дендритные клетки (ДК) получают из моноцитов здоровых доноров и совместно культивируют с аллогенными Т-клетками, меченными красителем CFSE в соотношении 1:5. Дендритные клетки обрабатывают либо Fc вариантами анти-SIRPA антитела 3F9-22, либо анти-CD47 (hu5F9), либо изотипическим контрольным антителом и инкубируют при 37°C в течение 5 дней. Пролиферацию Т-клеток измеряют окрашиванием Т-клеток анти-CD3 АПК и гейтированием на популяцию с низким содержанием CFSE. На фиг. 14A показано, что ДК от разных доноров, обработан-

ные антителом 3F9-22 huIgG1 или ASPS, увеличивают пролиферацию Т-клеток на ~50% по сравнению с ДК, обработанными либо изотипом, либо анти-CD47. Это увеличение пролиферации Т-клеток пропорционально усилению люминесценции, наблюдаемому для РВМС, обработанных антителом 3F9-22 huIgG1, в двухфакторном MLR. На фиг. 14В показан типовой график СКАФ для данных, представленных на фиг. 14А. Таким образом, результаты одно- и двухфакторных MLR предполагают, что антагонизм SIRPA с анти-SIRPA антителом 3F9-22 huIgG1 без блокирования взаимодействия SIRPG-CD47 может способствовать пролиферации Т-клеток.

Пример 14. Аффинно-зрелые анти-SIRPA антитела улучшают выделение провоспалительного цитокина.

Для дальнейшей дифференциации активности Fc вариантов анти-SIRPA-антитела 3F9-22, первичные человеческие макрофаги от двух здоровых добровольцев стимулируют в течение ночи с низкой дозой LPS в сочетании с анти-SIRPA-антителом 3F9-22 или изотипическим контрольным антителом. На фиг. 15А, первичные человеческие макрофаги от 2 здоровых доноров стимулируют в течение ночи при 37°C с 0,5 нг/мл LPS в сочетании либо с Fc вариантом анти-SIRPA антитела 3F9-22, либо с изотипическим контрольным антителом. Надосадочные фракции собирают и анализируют уровни TNF α с помощью ELISA. На фиг. 15В, первичные человеческие макрофаги стимулируют в течение ночи при 37°C с 0,5 нг/мл LPS в сочетании либо с увеличивающимися концентрациями Fc варианта анти-SIRPA-антитела 3F9-22, либо с изотипическим контрольным антителом. Надосадочную фракцию собирают и анализируют с помощью ELISA на высвобождение TNF α . Как показано на фиг. 15А и 15В, макрофаги, костимулированные с антителом 3F9-22 ASPS, показали значительное увеличение секреции TNF α по сравнению с клетками, костимулированными либо с изотипическим контрольным антителом, либо с антителом 3F9-22 SELF. Fc вариант антитела 3F9-22 SELF проявляет минимальную костимулирующую активность. Титрование анти-SIRPA антител показало аналогичную картину, где антитело 3F9-22 huIgG1 и варианты ASPS явно увеличивают высвобождение TNF α в зависимости от дозы LPS-примированных макрофагов, тогда как антитело 3F9-22 SELF демонстрирует сниженный ответ TNF α с высокой вариабельностью. Эти результаты показали, что не блокирующие CD47 анти-SIRPA-антитела вызывают антагонизм к SIRPA Fc-зависимым образом, снимая ингибирование передачи сигналов ИТИМ.

Пример 15. Картирование эпитопов сайтов связывания анти-SIRPA антитела.

Картирование эпитопов анти-SIRPA антител выполняют с использованием аланин-сканирующей библиотеки, созданной с помощью дробного мутагенеза кДНК последовательности человеческого SIRPA. Конструкт экспрессии SIRPA, кодирующий С-концевую V5 эпитопную метку, подвергают сканирующему аланином мутагенезу с высокой пропускной способностью (описанному у Davidson and Doranz, 2014 Immunology 143, 13-20) для создания полной библиотеки мутаций. Каждый из остатков, представляющих внеклеточный домен SIRPA (аминокислоты 31-374 SEQ ID №: 1), был мутирован, большая часть в аланин, тогда как кодоны аланина были мутированы в серин.

Клоны мутантной библиотеки SIRPA, помещенные в 384-луночный микропланшет, трансфицируют индивидуально в клетки НЕК-293Т и дают возможность экспрессироваться в течение 22 часов. Антитела переваривают для получения Fab, после чего клетки инкубируют с Fab, разведенными в 10% нормальной сыворотке козла (НСК) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Перед скринингом библиотеки определяют первичные концентрации Fab с использованием независимой кривой титрования иммунофлуоресценции против клеток, экспрессирующих дикий тип SIRPA, чтобы гарантировать, что сигналы находятся в линейной области определения. Fab определяют с применением 7,5 мкг/мл AlexaFluor488-конъюгированного вторичного антитела (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Westgrove, PA) в 10% НСК. Клетки промывают дважды ФРФБ и ресуспендируют в Cellstripper (Cellgro, Manassas, VA) с 0,1% АВС (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). В некоторых случаях, применяют более высокие условия жесткости, включая повышенный pH, повышенную температуру и повышенное время диссоциации. Среднюю клеточную флуоресценцию определяют с применением проточного цитометра с высокой пропускной способностью Intellicyt (HTFC, Intellicyt, Albuquerque, NM). Fab реакционность против каждого мутантного клона рассчитывают относительно реакционности дикого типа белок SIRPA вычитанием сигнала из псевдо-трансфицированных контролей и нормализацией до сигнала трансфицированных контролей дикого типа SIRPA.

Мутированные остатки в библиотечных клонах были идентифицированы как "критические" для Fab связывающего эпитопа, если она не поддерживают реакционность тестируемого Fab, но поддерживают реакционность коммерчески доступного ссылочного антитела, MAB4546 (R&D Systems) или дополнительных анти-SIRPA Fab. Эта противоскрининговая стратегия способствует исключению SIRPA мутантов, которые были локально неправильно свернуты или которые имели дефект экспрессии.

Анти-SIRPA антитело 9C2 описано в заявке на международный патент № PCT/US2017/65366.

tAb9C2. Последовательность вариабельного домена тяжелой цепи

EFQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYSLTGYNMNWWVKQSRGKSLEWIGNINPH
YGSSTYNQNFKDKATLTVDKSSSAAYMQFNSLTSEDSAVYYXAPEGYDGVFDYWGQG
TTLTVSS (SEQ ID №: 45)

tAb9C2. Последовательность вариабельного домена легкой цепи
 QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWYVTSNLA
 GVPTRFSGSGSGTYSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPRTFGGGKLEIK (SEQ ID №:
 46)

В табл. 17 ниже представлены средние значения реактивности связывания и диапазоны для всех остатков, идентифицированных на скринингах как критические. Первичные критические остатки определяют как остатки, в которых мутации были отрицательными для связывания тестируемого антитела (<30% связывания с ДТ), но положительными для контрольного антитела (> 80% ДТ). На фиг. 16 изображены модели кристаллической структуры SIRPA (PDB ID 2WNG; Hatherley et al., 2009, J Biol Chem, 284:26613-9) выделяющие критические остатки для связывания анти-SIRPA антител 3F9 и 9C2 в виде заштрихованных сфер.

Как указано в табл. 18, критические остатки SIRPA, вовлеченные в связывание анти-SIRPA антителом 3F9, включают аминокислотные остатки R282, Q284 и G337 последовательности человеческого SIRPA v1, показанной выше. Критические остатки SIRPA, вовлеченные в связывание антителом 9C2 (как описано в заявке на международный патент № PCT/US2017/65366), включают аминокислотные остатки Q281, R282, Q284, L285, W287, R295, E297, V302 и W315 последовательности человеческого SIRPA v1, описанной выше. Эти остатки находятся в проксимальном к мембране Ig домене SIRPA, названном в научной литературе, относящейся к SIRPA, D3 доменом, который соответствует аминокислотам 254-348 последовательности человеческого SIRPA v1. Множество опубликованных отчетов демонстрирует, что D3 домен человеческого SIRPA связывается с молекулами распознавания структур в семействе коллектина, а именно, поверхностно-активными белками D и A (Sp-D и Sp-A, соответственно).

Таблица 17

Критические остатки для связывания 3F9 и 9C2

Реактивность связывания (% ДТ)		
Мутация	3F9 Fab	9C2 Fab
Q281A	151,1 (14)	14,1 (11)
R282A	3,8 (2)	4,7 (2)
Q284A	3,3 (1)	6,5 (5)
L285A	107,0 (12)	17,9 (1)
W287A	124,8 (12)	2,4 (2)
R295A	120,9 (10)	1,8 (2)
E297A	116,9 (14)	5,3 (0)
V302A	92,3 (29)	4,9 (0)
W315A	117,3 (10)	19,0 (6)
G337A	17,9 (9)	36,3 (68)

Таблица 18

Остатки, вовлеченные в связывание анти-SIRPA антитела

Антитело	Критические остатки SIRPA
3F9	R282, Q284, G337
9C2	Q281, R282, Q284, L285, W287, R295, E297, V302, W315

Пример 16. Анти-SIRPα антитела улучшают противоопухолевую активность ингибиторов иммунных контрольных точек в синергетической модели опухоли.

Терапевтические антитела, нацеленные на путь SIRPA-CD47, могут основываться на моделях опухоли ксенотрансплантата для исследований для подтверждения механизма действия, в которых иммунодефицитные мыши NOD или NOG поддерживают рост имплантированных раковых клеток человека. Поскольку аллельный вариант мышинового SIRPA, экспрессируемый мышами NOD, связывает человеческий CD47, это взаимодействие позволяет прививать человеческие клетки мышам-хозяину. Однако эти мыши могут также преувеличивать роль этого пути, потому что NOD SIRPA связывает человеческий CD47 с большей аффинностью, чем человеческий SIRPA. Более того, Prkdc^{SCID} и IL2Rγ^{Null} мутации в иммунодефицитных штаммах мышей уничтожают Т-клетки, В-клетки и NK-клетки, таким образом делая миелоидные клетки и врожденную иммунную систему единственными эффекторными клетками, доступными для ингибирования роста опухоли. Модели ксенотрансплантата опухоли не позволяют исследовать терапии, которые нацелены на врожденные иммунные клетки для примирования или усиления адаптивного противоопухолевого иммунного ответа. Таким образом, для оценки человеческих анти-SIRPA антител настоящего изобретения в контексте иммунокомпетентных животных-хозяев, гены человеческого SIRPA и человеческого CD47 вводят в штамм мышей C57BL/6J.

Коротко, бактериальные искусственные хромосомы (БИХ), несущие кодирующие человеческий SIRPA или человеческий CD47 нуклеиновые кислоты с фланкирующими последовательностями для

включения соответствующих регуляторных элементов человеческого гена, были идентифицированы с использованием браузера генома UCSC и CloneDB от NCBI. Идентифицирован один клон БИХ (BACRP11-636L228), в котором предсказано содержание кодирующих последовательностей для гена SIRPA человека. Был идентифицирован другой клон БИХ (BACRP11-671F8), в котором предсказано содержание кодирующих последовательностей для человеческого гена CD47. Затем мышей, несущих представляющие интерес клоны БИХ, получают инъекцией очищенной ДНК БИХ в мышинные зиготы C57BL/6/J с использованием стандартных методик пронуCLEARной инъекции. Зиготы возвращали самкам мышей, и полученных мышинных детенышей генотипировали на наличие желаемого трансгена. Затем животных-основателей, содержащих трансген, скрещивают с не трансгенными животными, и потомство подвергают скринингу на экспрессию трансгена посредством ПЦР с использованием стандартных методик, и дополнительно путем окрашивания СКАФ клеток периферической крови животных. Трансгенных мышей БИХ, несущих каждый отдельный представляющий интерес ген, скрещивают для получения "гуманизированных" мышей, экспрессирующих и человеческий SIRPA, и человеческий CD47.

В дополнение к созданию мышей для экспрессии человеческого SIRPA и человеческого CD47, как описано выше, были также сконструированы сингенные колонии опухолевых клеток для замещения мышиногo CD47 человеческим CD47. Коротко, технология CRISPR-Cas9 была использована для введения комплексов Cas9/направляющая РНК (нРНК) в клетки-мишени MC38. Медирированное Cas9/нРНК образование вставки/делеции в целевой области (экзон 2 мышиногo CD47) приводит к сдвигу рамки и/или преждевременной остановке, таким образом, нокаутируя экспрессию эндогенного мышиногo гена CD47. После трансфицирования гРНК и Cas9, клоны, полученные из одной клетки, подвергают скринингу путем секвенирования, и гомозиготные клоны, содержащие желаемую мутацию, размножают. Как показано на фиг. 17А (верхняя панель), СКАФ анализ исходных клеток MC38 и колонии мышинных клеток с CD47 нокаутом (MC38-mCD47KO), окрашенных анти-мышинным CD47-антителом, подтверждает потерю экспрессии мышиногo CD47 в этих сконструированных клетках. Затем клетки MC38-mCD47KO трансдуцируют лентивирусом, содержащим вставку человеческого гена CD47. Клетки MC38-mCD47KO-huCD47+ отбирают с пуромицином и размножают. На фиг. 17А (нижняя панель) показана гистограмма СКАФ, подтверждающая экспрессию человеческого CD47 в выбранной популяции клеток.

Противоопухолевое действие анти-SIRPA антител настоящего изобретения оценивают *in vivo* с использованием модели карциномы толстой кишки мышей huSIRPA/huCD47 BACtg, привитых клетками MC38-mCD47KO-huCD47+ в сочетании с ингибитором иммунной контрольной точки Т-клетки. Этим мышам подкожно вводят 500000 клеток MC38 в правый бок. Терапию антителом начинают, когда мышей случайным образом делят на группы примерно через десять дней после трансплантации клеток, или когда опухоли достигли среднего объема 80 мм³. Мыши в течение 3 недель получают две внутрибрюшинные (ВБ) инъекции в неделю анти-SIRPA антитела 3F9 mIgG1 или анти-SIRPA антитела 3F9 mIgG2A в дозе 10 мг/кг в сочетании с субоптимальной дозой анти-мышиногo PDL1 антитела (клон 10F,9G2, Bi-oxcell) в дозе 5 мг/кг. Животных умерщвляют, когда опухоли достигают объема ~2000 мм³.

На фиг. 17В показаны кривые среднего роста опухоли huSIRPa/huCD47 БИХ трансгенной мыши, которой подкожно имплантированы MC38 клетки, сконструированные для потери экспрессии мышиногo CD47 и сверхэкспрессирующие человеческий CD47 (MC38-mCD47KO/huCD47+). Мышей обрабатывают изотипическим контрольным антителом, анти-мышинным PDL1 антителом, анти-SIRPA антителом 3F9 mIgG1 плюс анти-мышинным PDL1 антителом или анти-SIRPA антителом 3F9 mIgG2A плюс анти-мышинным PDL1 антителом, как показано. Лечение начинают, когда опухоли в среднем были 80 мм³. Как показано на фиг. 17В, лечение анти-PDL1 антителом ингибирует рост опухоли на 20% относительно животных, леченных изотипическим контрольным антителом, которые не достигают статистической значимости. Однако, комбинированная терапия анти-PDL1 антителом с либо анти-SIRPA антителом 3F9 mIgG1, либо анти-SIRPA антителом 3F9 mIgG2A, дополнительно ингибирует ост опухоли у этих животных на 40 и 47%, соответственно. На фиг. 17С показаны линейные графики объема опухоли каждого животного в леченных группах. За исключением нескольких плохих респондеров, объемы опухолей не превосходят 1000 мм у большинства животных в группах, леченных комбинированной терапией, в то время как опухоли у нескольких животных в группе изотипического контроля или группе монотерапии анти-PDL1 антителом достигают предела 2000 мм³.

Эти результаты демонстрируют, что анти-SIRPA 3F9 антитела настоящего изобретения эффективны при усилении противоопухолевой активности ингибиторов иммунной контрольной точки в модели иммунокомпетентных животных, кодирующей человеческий путь SIRPA-CD47. Эти результаты показали, что анти-SIRPA антитела настоящего изобретения полезны для усиления противоопухолевой активности ингибиторов иммунной контрольной точки. Соответственно, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения эффективны при лечении рака при использовании в сочетании с терапией ингибиторами иммунной контрольной точки.

Пример 17. Анти-SIRPα антитела отрицательно регулируют экспрессию SIRPA на инфильтрующих опухоль миелоидных клетках в мышинных сингенных опухолях.

Предыдущий пример продемонстрировал противоопухолевую активность анти-SIRPA антитела настоящего изобретения у трансгенных мышей с человеческим SIRPA/CD47 БИХ. Чтобы проверить, что

протоопухолевая активность коррелирует с медирированной антителом отрицательной регуляцией SIRPA на опухолевых макрофагах, миелоидные клетки опухоли характеризуют после введения лекарственного средства.

Трансгенным мышам с человеческим SIRPA/huCD47 БИХ подкожно имплантируют в правый бок 500000 клеток MC38-mCD47KO/huCD47+. Опухоли у мышей выращивают до среднего объема ~400 мм³ до введения антител. Мыши получают две ВБ инъекции анти-SIRPA антитела 3F9-22 mIgG2A с разницей в три дня в дозе 3, 10 или 30 мг/кг. Контрольные мыши получают 2 ВБ инъекции mIgG2A изотипа в дозе 10 мг/кг. Ткань опухоли и селезенки собирают у мышей через 1 день, 4 дня и 8 дней после введения второй дозы антитела. Селезенки превращают в суспензию отдельных клеток механической диссоциацией через 70 мкм клеточное сито. Затем клетки промывают ФРФБ, и эритроциты лизируют с лизисным буфером АСК. Затем клетки ресуспандируют в буфере СКАФ, состоящем из ФРФБ/2% ФТС, и готовят к окрашиванию. Точно так же, опухолевые ткани обрабатывают в суспензии отдельных клеток с помощью ферментативной и механической диссоциации с применением мягкого диссоциатора MACS™ (Miltenyi-Biotec). Гомогенат ткани фильтруют через 70 мкм клеточное сито и ресуспандируют в буфере СКАФ, состоящем из ФРФБ/2% ФТС, для окрашивания. Клетки окрашивают с помощью следующей панели.

Таблица 19

Флуорохром	Маркер	Клон
AmCyan (BV510)	Живой/мертвый	
PECy7	mCD45	30-F11
Pacific Blue (BV421)	mCD11b	M1/70
PerCp/Cy5.5	mF4/80	BM8
APC/Cy7	mLy6G	1A8
AF488 (ФИТЦ)	mLy6G	HK1.4
APC	hSIRPa	SE5A5

На фиг. 18А показывает относительное изменение экспрессии SIRPA с течением времени на инфильтрирующих опухоль миелоидных клетках (моноцитах и макрофагах). Опухоль-ассоциированные макрофаги были определены как CD45+ CD11b+ F4/80+ Ly6C-Ly6G- клетки, тогда как инфильтрирующие опухоль моноциты были определены как CD45+ CD11b+ F4/80- Ly6C+ Ly6G- клетки. По сравнению с животными, которым вводили изотипическое контрольное антитело, животные, которым вводили анти-SIRPA антитело, показали почти 80% снижение экспрессии SIRPA на клеточной поверхности через 1 день после введения антитела и на опухолевые моноциты, и на опухолевые макрофаги. Экспрессия SIRPA вернулась к исходным уровням через 4 дня или 8 дней у мышей, которым вводили 3 мг/кг или 10 мг/кг анти-SIRPA антитела 3F9-22 mIgG2A, соответственно. Уровень экспрессии SIRPA стабилизировался до около 50% ниже исходного у мышей, которым вводили 30 мг/кг анти-SIRPA антитела 3F9-22 mIgG2A.

Селезеночный компартмент также был подвергнут иммунному профилированию для определения того, можно ли определить какую-либо корреляцию с микросредой опухоли. Селезеночные моноциты оказались более устойчивыми к медирированной антителом отрицательной регуляции рецептора по сравнению таковой для опухолевых моноцитов (фиг. 18В). Селезеночные моноциты были определены как CD45+ CD11b+ F4/80- Ly6C+ Ly6G- клетки. Макрофаги селезеночной красной пульпы были определены как CD45+ CD11b- F4/80+ Ly6C- клетки. Селезеночные моноциты демонстрируют максимальную отрицательную регуляцию SIRPA на ~40% через день после введения антитела и быстро восстанавливают экспрессию рецептора в более позднее время. Макрофаги селезеночной красной пульпы, с другой стороны, следуют той же схеме экспрессии рецептора SIRPA, которая наблюдается для опухолевых макрофагов.

Взяты вместе, эти результаты демонстрируют, что анти-SIRPA антитела настоящего изобретения эффективны при снижении (отрицательной регуляции) уровней SIRPA на макрофагах, в частности, связанных с опухолью макрофагах, и снижении или отрицательной регуляции уровней SIRPA на макрофагах, коррелирующих с противоопухолевой активностью анти-SIRPA антител настоящего изобретения.

Пример 18. Анти-SIRPA антитела отрицательно регулируют экспрессию SIRPA на инфильтрирующих опухоль миелоидных клетках у мышей с человеческой иммунной системой (HIS).

Поскольку Fc-домен анти-SIRPA антител играет роль в отрицательной регуляции рецептора и функционировании антитела, мышей с восстановленной иммунной системой человека используют для сравнения активности различных Fc вариантов с анти-SIRPA антителами настоящего изобретения. Модели мышей HIS требуют прививки CD34+ человеческих гемопоэтических стволовых клеток (hHSC), полученных из пуповинной крови, иммунодефицитным мышам (т.е. штамму NOG) после их предварительной адаптации сублетальным облучением. HSC стабильно развивают обширные клеточные колонии, особенно, популяции лимфоцитов, в периферической крови, костном мозге, тимусе и селезенке (а также в других тканях). Мыши NOG, созданные для экспрессии человеческого GM-CSF и человеческого IL-3

(NOG-EXL; Taconic), обеспечивают дополнительное преимущество поддержки большей дифференцировки миелоидных клеток по сравнению с другими штаммами мышей. Мыши HIS дают возможность изучать взаимодействия человеческой опухоли-иммунной системы *in vivo* у мышей, которым имплантированы колонии человеческих раковых клеток. Дополнительно, мыши HIS помогают оценить механизмы действия кандидатов в терапевтические антитела в условиях *in vivo*.

Мышам инокулируют клетки меланомы человека A3 75 подкожно во фланкирующую область при плотности клеток 3×10^6 клеток на мышь с 50% Matrigel (Cat, 354234; Corning). Опухоли выращивают до среднего объема 400 мм до получения мышами 2 внутрибрюшинных инъекций 3F9-22 huIgG1 P331S (PS), 3F9-22 huIgG1 N325S/L328F (NSLF) или huIgG1 изотипического контроля в дозе 10 мг/кг с интервалом в три дня. Кровь, селезенку и опухолевые ткани собирают через 1 день после второй инъекции антитела. Селезенки перерабатывают в суспензию отдельных клеток механической диссоциацией через 70 мкм клеточное сито. Клетки промывают ФРФБ, и эритроциты лизируют с буфером для лизиса АСК. Затем клетки ресуспендируют в буфере СКАФ, состоящем из ФРФБ/2% ФТС, и готовят к окрашиванию. Точно так же, опухолевые ткани перерабатывают в суспензии отдельных клеток ферментативной и механической диссоциацией с помощью мягкого диссоциатора MACS™ (MiltenyiBiotec). Гомогенат ткани фильтруют через 70 мкм клеточное сито и ресуспендируют в буфере СКАФ, состоящем из ФРФБ/2% ФТС для окрашивания. Клетки периферической крови обрабатывают буфером для лизиса АСК для лизиса эритроцитов, и ресуспендируют в буфере СКАФ, состоящем из ФРФБ/2% ФТС. Клетки окрашивают с помощью следующей панели.

Таблица 20

Флуорохром	Маркер	Клон
PERCP CY5	CD3	SK7
PERCP CY5	CD19	H1B19
FITC	CD14	M5E2
PE-Cy7	CD11b	ICRF44
Alexa700	человеческий CD45	2D1
AmCyan	Живой/мертвый	
АПК/DyL650	SIRPA	<i>внутренний</i>
BV421	CD16	3G8
BUV395	HLA-DR	L243
PE-CF594	CD163	GHI/61
PE	CD86	IT2,2
APC-Cy7	<i>Мышиный CD45</i>	30-F11

Мышам NOG-EXL прививают человеческие CD34+ гемопоэтические стволовые клетки (HSC), полученные из пуповинной крови от двух разных доноров (доноры А и В). Всем мышам подкожно имплантируют 3 миллиона клеток A375, колонию клеток человеческой меланомы. Опухоли выращивают до среднего объема ~400 мм³ перед введением антитела. Мыши получали две ВВ инъекции анти-SIRPA антитела с интервалом в три дня в дозе 10 мг/кг. Контрольным мышам вводят 2 ВВ инъекции huIgG1 изотипа в дозе 10 мг/кг. Ткань опухоли собирают у мышей через 1 день после введения второй дозы антитела.

На фиг. 19 показан план исследования и результаты медирированной антителом отрицательной регуляции SIRPA у гуманизированных мышей NOG-EXL, несущих опухоли A375, в этих исследованиях. На фиг. 19А показано, что 8 мышам были привиты CD34+ HSC от донора А, и 29 мышам были привиты CD34+ HSC от донора В. Коротко, 40 мышей, которым привили CD34+HSC от 2 разных доноров, приобретают в Taconic, NY. Через 10 недель после прививки, мышей проверяют перед транспортировкой для восстановления человеческих лейкоцитов проточной цитометрией. Большинство мышей (36/40) содержат >50% клеток huCD45+ в периферической крови.

Связанные с опухолью макрофаги у мышей NOG-EXL были определены как CD45+ CD11b+ CD14+ CD16+ CD3-CD19- клетки. На фиг. 19В показан уровень экспрессии SIRPA на макрофагах опухоли человека, изображенный либо как значения СКП (левая панель), либо как нормализованные значения (правая панель). Лечение анти-SIRPA антителом дает значительную отрицательную регуляцию SIRPA в макрофагах опухоли человека от обоих доноров по сравнению с изотипической контрольной группой. Нормализация значений СКП для каждого донора показывает ~70% снижение экспрессии SIRPA, что приблизительно соответствует степени отрицательной регуляции, наблюдаемой в макрофагах, полученных из моноцитов *in vitro* и в макрофагах опухолей у БИХ трансгенных мышей. В этих экспериментах не наблюдалось значительного различия в активности между Fc вариантом анти-SIRPA 3F9-22 PS и Fc вариантом NSLF анти-SIRPA антитела.

Помимо экспрессии SIRPA, опухолевые макрофаги из этих экспериментов также были профилированы для исследования экспрессии маркеров M1. Опухолевые макрофаги были определены как huCD45+

huCD11b+ CD14+ huCD16+ клетки. Как показано на фиг. 20А, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения положительно регулируют экспрессию HLA-DR. Нормализация значений СКП для каждого донора демонстрирует, что Fc вариант анти-SIRPA-антитела 3F9-22 PS увеличивает экспрессию HLA-DR ~3-кратно у обоих доноров по сравнению с наблюдаемой при лечении изотипическим контрольным антителом. Наоборот, Fc вариант анти-SIRPA антитела 3F9-22 NSLF увеличивал экспрессию HLA-DR ~1,5-2-кратно по сравнению с той, которая наблюдается при лечении изотипическим контрольным антителом. Только увеличение, измеренное на макрофагах донора В, достигает статистической значимости с Fc вариантом анти-SIRPA антитела 3F9-22 NSLF. Точно так же, анти-SIRPA антитела настоящего изобретения увеличивают экспрессию CD86 на опухолевых макрофагах только от донора В (фиг. 20В). Хотя оба Fc варианта PS и NSLF увеличивают экспрессию CD86 на ~40% по сравнению с группой изотипического контрольного антитела, только Fc вариант PS достигает статистической значимости для увеличения экспрессии CD86. Эти результаты демонстрируют, что оба Fc варианта PS и NSLF анти-SIRPA антитела 3F9-22 подавляют SIRPA и увеличивают маркеры M1 на макрофагах опухоли человека; однако в этих экспериментах вариант PS оказывается частично более эффективным, чем вариант NSLF.

Медиированную антителом отрицательную регуляцию SIRPA также оценивают в моноцитах периферической крови и моноцитах селезенки, чтобы сравнить активность анти-SIRPA антител настоящего изобретения в компартментах опухоли и периферической иммунной системы. Популяции человеческих моноцитов были определены как CD45+ CD11b+ CD14+ CD16- CD3-CD19- клетки. Мыши получают две ВВ инъекции анти-SIRPA антител с интервалом в три дня в дозе 10 мг/кг. Контрольные мыши получают 2 ВВ инъекции контрольного антитела huIgG1 в дозе 10 мг/кг. Селезенки и кровь собирают у мышей через 1 день после введения второй дозы антитела. Как показано в фиг. 21А, Fc вариант анти-SIRPA антитела 3F9-22 NSLF показал более высокую отрицательную регуляцию SIRPA по сравнению с той, которая наблюдается с Fc вариантом анти-SIRPA антитела 3F9-22 PS в моноцитах селезенки. Однако в моноцитах периферической крови оба Fc варианта проявляют сходную активность (фиг. 21В). Анти-SIRPA антитела настоящего изобретения демонстрируют большую отрицательную регуляцию рецепторов в моноцитах, полученных от донора В, чем от донора А, что может коррелировать с более высоким исходным уровнем экспрессии SIRPA на моноцитах у донора В, чем у донора А.

Взяты вместе, эти результаты демонстрируют, что анти-SIRPA антитела настоящего изобретения эффективны при отрицательной регуляции уровней SIRPA как в моноцитах периферической крови, так и в моноцитах селезенки.

Пример 19. Анти-SIRPA антитела, сконструированные для селективного привлечения FcR, сохраняют активность медиированной антителом отрицательной регуляции.

Для дальнейшей оценки роли FcR в активности анти-SIRPA антитела настоящего изобретения, вариабельный домен анти-SIRPA антитела 3F9-22 экспрессируют с разными Fc доменами с разными профилями связывания FcR. Измерения аффинности FcR для Fc вариантов анти-SIRPA антитела получают с использованием биослойной интерферометрии (БСИ) на инструменте Pall ForteBio Octet RED96. Имобилизованное анти-человеческое антитело Fab-CH1 захватывает гуманизированные Fc варианты анти-SIRPA антитела 3F9-22 на биосенсорах (10 мкг/мл, время загрузки 300 с). Кинетику одного цикла проводят с 100 нМ растворимого человеческого FcR, протекающими через захваченное антитело для записи следов (время ассоциации 300 с, время диссоциации 300 с). Анализ данных проводят с использованием программы ForteBio Data Analysis Software, версия 9.0. Стандартный кинетический буфер (ФРФБ, 0,1% АБС, 0,02% Tween-20, pH 7,2) используют для анализа и для приготовления реагентов.

Измерения относительной аффинности, полученные из анализа подбора кривых сенсограмм, полученных в этих экспериментах, суммированы ниже в табл. 19. Fc варианты демонстрируют спрогнозированные шаблоны связывания FcR. Например, Fc мутации LALAPS аннулируют связывание со всеми FcR, кроме рецептора с высокой аффинностью, FcγR1. Fc мутации N325S/L328F (NSLF) специфически аннулируют связывание с человеческим FcγR3A. Также, изотипы IgG2 и IgG4 не могут связывать FcγR3A, и только IgG4 сохраняет связывание с FcγR1.

Таблица 19

Fc вариант	FcγR1	FcγR2A H131	FcγR2A R131	FcγR2B	FcγR3A F158	FcγR3A V158
IgG1 LALAPS	+	-	-	-	-	-
IgG1	++	+	++	++	-	-
NSLF						
IgG2	-	+	+	-	-	-
IgG 4 SP	++	+	++	++	-	-

Fc варианты анти-SIRPA антитела 3F9-22 затем оценивают на способность отрицательно регулировать экспрессию SIRPA или уровни в макрофагах, полученных из моноцитов человека. Как описано вы-

ше, человеческие моноциты выделяют из периферической крови здоровых доноров и дифференцируют в макрофаги *in vitro* путем добавления в питательную среду человеческого M-CSF. После дифференциации, человеческие макрофаги собирают и высевают на 96-луночные планшеты для культивирования тканей с увеличивающейся концентрацией контрольного антитела или растворимого анти-SIRPA антитела, и инкубируют в течение ночи при 37°C. Клетки анализируют проточной цитометрией на поверхностноклеточную экспрессию SIRPA с использованием DyLight650-конъюгированного анти-человеческого SIRPA антитела, принадлежащего к отдельной эпитопной группе, отличной от анти-SIRPA антитела 3F9-22.

Как показано на фиг. 22 и суммированные в табл. 20, большинство Fc вариантов анти-SIRPA антитела 3F9-22 максимально отрицательно регулирует поверхностноклеточные уровни SIRPA на макрофагах с аналогичными значениями IC50. Однако анти-SIRPA антитело 3F9-22 LALAPS только частично подавляет поверхностноклеточные уровни SIRPA, подтверждая, что привлечение FcR вовлечено в потенцирование этой активности анти-SIRPA антител. Кроме того, поскольку Fc варианты, которые не связывают FcγR3A, демонстрируют аналогичную отрицательную регуляцию рецептора, как и анти-SIRPA антитело 3F9-22PS, которое связывает все FcR, предполагается, что вовлечение FcγR3A является необязательным для медирированной антителом интернализации рецептора.

Таблица 20

Fc вариант	IC50 (нМ)	Max % OP
3F9-22 PS	0,04701	73,825
3F9-22 LALAPS	0,04468	41,575
3F9-22 NSLF	0,045125	74,61
3F9-22 IgG2	0,02185	67,955
3F9-22 IgG4	0,032415	70,455

Пример 20. Анти-SIRPA антитела, сконструированные для селективного привлечения FcR, улучшают фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами.

Помимо медирированной антителом отрицательной регуляции рецептора, как описано выше, оценивают роль FcR в медирированном анти-SIRPA антителом усилении фагоцитоза опухолевых клеток с различными Fc вариантами анти-SIRPA антитела 3F9-22. Дополнительно, параллельно оценивают фагоцитарную активность других антител, нацеленных на этот путь.

Первичные человеческие макрофаги обрабатывают в течение ночи контрольным антителом или указанным тестовым антителом. Опухолевые клетки метят красителем CFSE и добавляют к макрофагам при 37°C в течение ночи. На следующий день макрофаги собирают и окрашивают на льду анти-CD14 АПК в буфере СКАФ, содержащем FcR-блокирующие антитела. Фагоцитарную активность измеряют путем подсчета процента CD14/CFSE двойных положительных макрофагов.

Результаты этих экспериментов показаны на фиг. 23 и представлены как кратное увеличение процента популяции CD14/CFSE двойных положительных макрофагов. Как показано на фиг. 23 и суммировано ниже в табл. 21, варианты и анти-SIRPA-антитела 3F9-22PS, и анти-SIRPA-антитела 3F9-22NSLF значительно усиливают фагоцитоз клеток меланомы A375 по сравнению с таковым, наблюдаемым в макрофагах, обработанных контрольным антителом. Наблюдаемое усиление фагоцитоза оказалось сопоставимым с анти-CD47 антителом, тестируемым в этих исследованиях (aCD47), которое, в первую очередь, функционирует через опсонизацию CD47-экспрессирующих опухолевых клеток для ADCP. Наоборот, два разных CD47-блокирующих анти-SIRPA антитела KWAR23 (см. WO 2015/138600) и 18D5 (см. WO 2017/178653) не показали какое-либо усиление фагоцитоза опухолевых клеток. Эти результаты показывают, что оба Fc варианта PS и NSLF анти-SIRPA антитела 3F9-22 сохраняют свойства усиления фагоцитоза опухолевых клеток в отсутствие опсонизирующего противоопухолевого антигена антитела. Поскольку анти-SIRPA антитела настоящего изобретения являются не блокирующими по отношению к взаимодействию SIRPA/CD47, эти результаты также показывают, что не блокирующие анти-SIRPA антитела настоящего изобретения были эффективны при увеличении или усилении фагоцитоза опухолевых клеток по сравнению с наблюдаемым для не блокирующего анти-SIRPA антитела KWAR23 и 18D5.

Таблица 21

Антитело	EC50 (нМ)	Max*
3F9-22PS	0,1144575	2,06925
3F9-22NSLF	0,457625	1,774
KWAR23	0,3631	1,126
18D5	2,148	1,06446667
aCD47	0,777775	2,6235

*Кратное повышение фагоцитоза к базовой активности.

Пример 21. Варианты анти-SIRPA антитела 3F9-22 не вызывают изменения в количестве эритроцитов и тромбоцитов.

Отчеты показывают, что введение анти-CD47 антитело 5F9 не человеческим приматам приводит к анемии (Liu et al, 2015, PLOS ONE, DOI: 10,1371/journal.pone.0137345) и что введение анти-SIRPAFc TTI-621 человеку приводит к дозозависимому снижению тромбоцитов (Ansell et al., 2016, Blood 128: 1812). Чтобы проверить, оказывают ли анти-SIRPA антитела настоящего изобретения какое-либо влияние на количество эритроцитов или количество тромбоцитов *in vivo*, выполняют следующие исследования. Самок яванского макака делят на пять групп, которым вводят контрольное антитело, анти-SIRPA антитело 3F9-22 PS, анти-SIRPA антитело 3F9-22 IgG4, анти-SIRPA антитело 3F9-22 IgG2 или анти-SIRPA антитело 3F9-22 NSLF, как указано в табл. 22 ниже. Животным вводят антитела внутривенной инфузией через подкожную вену.

Таблица 22

Группа	Количество самок	Тестируемый образец	Путь дозирования	Целевой уровень дозы (мг/кг)	Целевая концентрация дозы (мг/мл)	Целевой объем дозы (мл/кг)
1	3	IgG	IV	10	2,5	4
2	3	3F9-22 PS	IV	10	2,5	4
3	3	3F9-22 IgG4	IV	10	2,5	4
4	3	3F9-22 IgG2	IV	10	2,5	4
5	3	3F9-22 NSLF	IV	10	2,5	4

Кровь собирают у животных через бедренную вену для определения количества эритроцитов (RBC) и количества тромбоцитов один раз во время фазы перед введением дозы и затем приблизительно через 72, 168, 240, 408, 576, 672 и 744 часа после введения антитела.

Как показано на фиг. 24, количество эритроцитов и тромбоцитов не изменяется ни одним из анти-SIRPA антител 3F9-22 PS, 3F9-22 IgG4, 3F9-22 IgG2 и 3F9-22 NSLF в ходе этих экспериментов.

Некоторые дополнительные последовательности анти-SIRPA антитела настоящего изобретения показаны ниже. Подчеркнутые аминокислоты указывают на определенные различия в аминокислотных последовательностях следующих анти-SIRPA антител.

3F9-22-IgG1 ДТ Тяжелая цепь (SEQ ID №: 47)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEY
 GGSYTYAAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFQY
 WGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAG
 QPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

3F9-22 huIgG1 PS Тяжелая цепь (SEQ ID №: 48)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEY
 GGSYTYAAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFQY
 WGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS

GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASP^SIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

3F9-22 SELF Тяжелая цепь (SEQ ID №: 49)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEY
 GGSYTYAAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFQY
 WGQGT^LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASP^IIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

3F9-22 hIgG1 NSLF Тяжелая цепь (SEQ ID №: 53)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEY
 GGSYTYAAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYXAPPPYDDYYGGFQY
 WGQGT^LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASP^IIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

3F9-22 hIgG1 LALAPS Тяжелая цепь (SEQ ID №: 54)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEY
 GGSYTYAAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYXAPPPYDDYYGGFQY
 WGQGT^LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPE^AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASP^SIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

3F9-22 huIgG1 Легкая цепь (SEQ ID №: 50)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSSGGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLA
 SNLESGVPSRFGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQHNRELPTVFGQGTKLEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

3F9-14 huIgG1 ДТ Тяжелая цепь (SEQ ID №: 51)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEY
 GGSYTYAAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFRY

WGQGT^LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

3F9-14 PS Тяжелая цепь (SEQ ID №: 57)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEY
 GGSYTYAAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYXAPPPYDDYYGGFRY
 WGQGT^LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

3F9-14 SELF Тяжелая цепь (SEQ ID №: 52)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEY
 GGSYTYAAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYYGGFRY
 WGQGT^LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

3F9-14 NSLF Тяжелая цепь (SEQ ID №: 55)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEY
 GGSYTYAAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYXAPPPYDDYYGGFRY
 WGQGT^LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

3F9-14 LALAPS Тяжелая цепь (SEQ ID №: 56)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEY
 GGSYTYAAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYXAPPPYDDYYGGFRY
 WGQGT^LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

3F9-14 huIgG1 Легкая цепь (SEQ ID №: 50)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSVSSGGYSYMHYQKPKGKAPKLLIYLA
 SNLESGVPSRFGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQHNRELPTVFGQGTKEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит: HVR-H1, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID №: 20; HVR-H2, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID №: 21; HVR-H3, содержащий последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID №№: 22, 23 и 24; и переменная область легкой цепи содержит: HVR-L1, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID №: 9; HVR-L2, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID №: 10; и HVR-L3, содержащий последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID №№: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 и 19.

2. Антитело по п.1, где переменная область тяжелой цепи содержит HVR-H1, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID №: 20; HVR-H2, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID №: 21; и HVR-H3, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID №: 23; и где переменная область легкой цепи содержит: HVR-L1, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID №: 9; HVR-L2, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID №: 10; и HVR-L3, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID №: 16.

3. Антитело по п.1, где переменная область легкой цепи содержит HVR-H1, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID №: 20; HVR-H2, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID №: 21; HVR-H3, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID №: 24; и где переменная область легкой цепи содержит: HVR-L1, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID №: 9; HVR-L2, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID №: 10; и HVR-L3, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID №: 16.

4. Антитело по пп.1, 2 или 3, где переменная область тяжелой цепи содержит один, два, три или четыре каркасных участка, выбранных из VH FR1, содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 25, VH FR2, содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 26, VH FR3, содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 27 и VH FR4, содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 28; и/или где переменная область легкой цепи содержит один, два, три или четыре каркасных участка, выбранных из VL FR1, содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 29, VL FR2, содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 30, VL FR3, содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 31 и VL FR4, содержащего последовательность аминокислот SEQ ID №: 32.

5. Антитело по пп.1, 2 или 3, где переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот на, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% или, по меньшей мере, 99% идентичную последовательности аминокислот, выбранной из SEQ ID №№: 33, 34 и 35; и/или, где переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот на, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% или, по меньшей мере, 99% идентичную последовательности аминокислот, выбранной из SEQ ID №№: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 и 44.

6. Выделенное антитело, которое связывается с человеческим SIRPA, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID №№: 33, 34 и 35, и где переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID №№: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 и 44.

7. Антитело по п.6, где переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 34, и где переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 41.

8. Антитело по п.6, где переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 35, и где переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 41.

9. Антитело по любому из пп.1-8, где антителом является моноклональное антитело.

10. Антитело по любому из пп.1-9, где антителом является гуманизованное антитело.

11. Антитело по любому из пп.1-10, где антителом является Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv фрагмент.

12. Антитело по любому из пп.1-11, где антителом является мультивалентное антитело.

13. Антитело по любому из пп.1-12, где антителом является одно из IgG класса, IgM класса или IgA класса.

14. Антитело по п.13, где антителом является одно из IgG класса, и является IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 изотипом.

15. Антитело по любому из пп.1-14, где антитело связывается с ингибирующим Fc рецептором.

16. Антитело по п.15, где ингибирующим Fc рецептором является ингибирующий Fc-гамма рецептор IIВ (FcγRIIВ).

17. Антитело по п.16, где антитело снижает клеточные уровни FcγRIIВ.

18. Антитело по любому из пп.1-17, где анти-SIRPA антитело имеет человеческий или мышинный

IgG1 изотип и содержит одно или более аминокислотных замещений в Fc области на аминокислотном остатке, выбранном из группы, состоящей из: N297A, D265A, D270A, L234A, L235A, G237A, P238D, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D и любого их сочетания, где нумерация остатков проведена согласно нумерации EU или содержит аминокислотную делецию в Fc области в положении, соответствующем глицину 236.

19. Антитело по любому из пп.1-18, где антитело содержит одно или более аминокислотных замещений в Fc области в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из: C127S, L234A, L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, E345R, E430G, S440Y и любого их сочетания, где нумерация аминокислотных остатков проведена согласно нумерации EU или Кэбота.

20. Выделенное антитело, которое связывает человеческий SIRPA, где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где (a) тяжелая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 47 и легкая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 50; (b) тяжелая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 48 и легкая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 50; (c) тяжелая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 49 и легкая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 50; (d) тяжелая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 53 и легкая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 50; (e) тяжелая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 54 и легкая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 50; (f) тяжелая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 51 и легкая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 50; (g) тяжелая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 52 и легкая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 50; (h) тяжелая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 55 и легкая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 50; (i) тяжелая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 56 и легкая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 50; или (j) тяжелая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 57 и легкая цепь содержит последовательность аминокислот SEQ ID №: 50.

21. Антитело по любому из пп.1-20, где анти-SIRPA антитело снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA, снижает внутриклеточные уровни SIRPA, снижает общие клеточные уровни SIRPA или любое их сочетание.

22. Антитело по любому из пп.1-21, где анти-SIRPA антитело вызывает разрушение SIRPA, вызывает расщепление SIRPA, вызывает интернализацию SIRPA, вызывает сбрасывание SIRPA, отрицательно регулирует экспрессию SIRPA или любое их сочетание.

23. Антитело по любому из пп.1-22, где антитело снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA *in vitro*.

24. Антитело по любому из пп.1-23, где антитело снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA *in vivo*.

25. Антитело по любому из пп.1-24, где антитело отрицательно регулирует экспрессию SIRPA в человеческих моноцитах.

26. Антитело по любому из пп.1-25, где антитело отрицательно регулирует экспрессию SIRPA в человеческих макрофагах.

27. Антитело по п.26, где антитело отрицательно регулирует экспрессию SIRPA в человеческих макрофагах на около 70-95%.

28. Антитело по любому из пп.1-27, где антитело имеет аффинность (КД) к человеческому SIRPA v1 менее чем 6 нМ, менее чем 5 нМ, менее чем 4 нМ, менее чем 3 нМ, менее чем 2 нМ или менее чем 1 нМ.

29. Антитело по любому из пп.1-28, где антитело имеет аффинность (КД) к человеческому SIRPA v1 от около 0,1 до 2 нМ.

30. Антитело по любому из пп.1-25, где антитело имеет аффинность к человеческому SIRPA v1 с КД, которая, по меньшей мере, 2-кратно, по меньшей мере, 3-кратно, по меньшей мере, 4-кратно, по меньшей мере, 5-кратно, по меньшей мере, 6-кратно, по меньшей мере, 7-кратно, по меньшей мере, 8-кратно, по меньшей мере, 9-кратно или по меньшей мере, 10-кратно ниже, чем аффинность к человеческому SIRPA анти-SIRPA антитела, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 2 и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 5.

31. Антитело по любому из пп.1-30, где антитело снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA v1 *in vitro* с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC50) от около 0,05 до 2 нМ по данным проточной цитометрии.

32. Антитело по любому из пп.1-31, где антитело снижает поверхностноклеточные уровни SIRPA *in vitro* с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC50) от около 0,05 до 0,20 нМ для человеческого SIRPA v1, от около 0,05 до 0,10 нМ для человеческого SIRPA v2, и/или от около 0,05 до 1 нМ для SIRPA яванского макака по данным проточной цитометрии.

33. Антитело по любому из пп.1-32, где антитело связывает человеческий SIRPA, человеческий

SIRPA v1, человеческий SIRPA v2, SIRPA яванского макака, SIRPA мартышки и человеческий SIRPβ3.

34. Антитело по любому из пп.1-33, где антитело связывается с D3 доменом человеческого SIRPA v1 SEQ ID №: 1.

35. Антитело по любому из пп.1-34, где антитело связывается с аминокислотными остатками R282, Q284 и G337 человеческого SIRPA v1 SEQ ID №: 1.

36. Антитело по любому из пп.1-35, где анти-SIRPA антитело повышает фагоцитоз опухолевой клетки в макрофагах, повышает фагоцитоз опухолевой клетки в M1 макрофагах, повышает фагоцитоз опухолевой клетки в M2 макрофагах, отрицательно регулирует CD14 экспрессию в макрофагах, и/или любое их сочетание.

37. Антитело по любому из пп.1-36, где анти-SIRPA антитело (a) улучшает пролиферацию T-клетки, (b) улучшает пролиферацию T-клетки без блокирования взаимодействия SIRPγ и CD47, и/или (c) стимулирует выработку ROS в моноцитах и/или повышает экспрессию IL-8 в моноцитах.

38. Антитело по любому из пп.1-37, где анти-SIRPA антитело ингибирует рост опухоли *in vivo*, снижает количество CD14+ миелоидных клеток в периферической крови и/или повышает количество CD14+ миелоидных клеток в опухоли.

39. Антитело по любому из пп.1-38, где антитело связывает человеческий SIRPA, но не блокирует по существу связывание CD47 с SIRPA.

40. Анти-SIRPA антитело по любому из пп.1-39, где антитело распознает первый и второй антигены, где первым антигеном является SIRPA и второй антиген выбран из:

(a) антигена, способствующего транспорту через гематоэнцефалический барьер;

(b) антигена, способствующего транспорту через гематоэнцефалический барьер, выбранного из трансферринового рецептора (TR), инсулинового рецептора (HIR), рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGFR), белков 1 и 2, связанных с рецептором липопротеинов низкой плотности (LPR-1 и 2) и рецептора дифтерийного токсина;

(c) вызывающего заболевание агента, выбранного из вызывающих заболевание пептидов или белков, вызывающих заболевание нуклеиновых кислот, где вызывающими заболевание нуклеиновыми кислотами являются антисмысловые GGCCCC (G2C4) РНК экспансии повторов, вызывающие заболевание белки выбирают из амилоида бета, олигомерного амилоида бета, амилоидных бета бляшек, белка-предшественника амилоида или их фрагментов, Тау, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, FUS белка, C9orf72 (открытая рамка считывания 72 хромосомы 9), c9RAN белка, белка приона, PrPSc, хантингтина, кальцитонина, пероксидадисмутаза, атаксина, атаксина 1, атаксина 2, атаксина 3, атаксина 7, атаксина 8, атаксина 10, телец Леви, предсердного натрийуретического фактора, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида A, медины, пролактина, транстиретины, лизозима, бета 2 микроглобулина, желсолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, S-IBM белка, связанных с повтором не-ATG (RAN) продуктом трансляции, пептида дипептидного повтора (DPR), пептида глицин-аланинового (GA) повтора, пептидов глицин-пролинового (GP) повтора, пептидов глицин-аргининового повтора (GR), пептидов пролин-аланинового (PA) повтора, убиквитина и пептидов пролин-аргининового (PR) повтора; и

(d) лигандов и/или белков, экспрессированных на иммунных клетках, где лиганды и/или белки выбирают из PD1/PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, VTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, CD73 и фосфатидилсерина; и белок, липид, полисахарид или гликолипид, экспрессированный на одной или более опухолевых клетках.

41. Способ лечения рака, где способ включает введение индивиду, нуждающемуся в таковом, терапевтически эффективного количества анти-SIRPA антитела по одному из пп.1-40.

42. Способ по п.41, где рак выбирают из саркомы, рака мочевого пузыря, рака мозга, рака груди, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, рака почек, рака почечной лоханки, лейкоза, рака легких, мелкоклеточного рака легких, меланомы, лимфомы, рака поджелудочной железы, рака простаты, рака яичников и фибросаркомы, мультиформной глиобластомы; почечной светлоклеточной карциномы; аденокарциномы почечной лоханки; аденокарциномы мочевого пузыря, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, аденокарциномы легкого; аденокарциномы поджелудочной железы, почечно-клеточного рака, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, медленно растущей В-клеточной лимфомы, агрессивной В-клеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), хронического миелолейкоза (ХМЛ), множественной миеломы, миелодиспластических синдромов, миелолифферативных новообразований, инвазивной карциномы молочной железы, плоскоклеточного рака шейки матки, эндоцервикальной аденокарциномы, холангиокарциномы, аденокарциномы толстой кишки, плоскоклеточной карциномы шеи, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, карциномы пищевода, плоскоклеточного рака головы и шеи, хромофобного рака почек, папиллярного рака почки, глиомы низкой степени злокачественности, печеночно-клеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы легкого, мезотелиомы, серозной цистаденокарциномы яичника, аденокарциномы поджелудочной железы, феохромо-

цитомы и параангиомы, аденокарциномы простаты, аденокарциномы прямой кишки, кожной меланомы, аденокарциномы желудка, опухолей половых клеток яичек, карциномы щитовидной железы, тимомы, эндометриальной карциномы тела матки, карциносаркомы матки и увеальной меланомы.

43. Способ по п.41 или 42, где способ дополнительно включает введение терапевтического агента, который ингибирует или вызывает агонизм PD1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39 или CD73.

44. Способ по любому из пп.41-43, дополнительно включающий введение индивиду, по меньшей мере, одного антитела, которое специфически связывается с ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки, и/или одной или более стандартной или экспериментальной терапий.

45. Способ по п.44, где способ включает введение, по меньшей мере, одного антитела, которое специфически связывается с ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки.

46. Способ по п.44 или 45, где, по меньшей мере, одно антитело, которое специфически связывается с ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки, выбирают из анти-PD-L1 антитела, анти-CTLA4 антитела, анти-PD-L2 антитела, анти-PD-1 антитела, анти-B7-H3 антитела, анти-B7-H4 антитела и анти-HVEM антитела, антитела анти- В- и Т-лимфоцитного аттенуатора (BTLA), антитела анти-киллерного ингибирующего рецептора (KIR), анти-GAL9 антитела, анти-TIM-1 антитела, анти-TIM3 антитела, анти-TIM-4 антитела, анти-A2AR антитела, анти-CD39 антитела, анти-CD73 антитела, анти-LAG-3 антитела, анти-фосфатидилсеринового антитела, анти-CD27 антитела, анти-CD30 антитела, анти-TNF α антитела, анти-CD33 антитела, анти-Siglec-5 антитела, анти-Siglec-7 антитела, анти-Siglec-9 антитела, анти-Siglec-11 антитела, антагонистического анти-TREM1 антитела, антагонистического анти-TREM2 антитела, анти-TIGIT антитела, анти-VISTA антитела, анти-CD2 антитела, анти-CD5 антитела и любого их сочетания.

47. Способ по п.44, где одну или более стандартных или экспериментальных терапий выбирают из радиотерапии, цитотоксической химиотерапии, таргетной терапии, терапии иматинибом, терапии трастузумабом, терапии этанерцептом, терапии адоптивным клеточным переносом (АКП), терапии химерным антигенным рецептором Т-клеточного трансфера (ХАР-Т), вакцинной терапии и цитокиновой терапии.

48. Способ по любому из пп.41-47, дополнительно включающий введение индивиду, по меньшей мере, одного антитела, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином.

49. Способ по п.48, где, по меньшей мере, одно антитело, которое специфически связывается ингибирующим цитокином, выбирают из анти-CCL2 антитела, анти-CSF-1 антитела, анти-IL-2 антитела и любого их сочетания.

50. Способ по любому из пп.41-49, дополнительно включающий введение индивиду, по меньшей мере, одного агонистического антитела, которое специфически связывается со стимулирующим белком иммунной контрольной точки.

51. Способ по п.50, где, по меньшей мере, одно агонистическое антитело, которое специфически связывается со стимулирующим белком иммунной контрольной точки, выбирают из агониста анти-CD40 антитела, агониста анти-OX40 антитела, агониста анти-ICOS антитела, агониста анти-CD28 антитела, агонистического анти-TREM1 антитела, агонистического анти-TREM2 антитела, агониста анти-CD137/4-1BB антитела, агониста анти-CD27 антитела, агониста анти-глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка GITR антитела, агониста анти-CD30 антитела, агониста анти-BTLA антитела, агониста анти-HVEM антитела, агониста анти-CD2 антитела, агониста анти-CD5 антитела и любого их сочетания.

52. Способ по любому из пп.41-51, дополнительно включающий введение индивиду, по меньшей мере, одного стимулирующего цитокина.

53. Способ по п.52, где, по меньшей мере, один стимулирующий цитокин выбирают из IFN- α 4, IFN- β , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, CRP, члена семейства IL-20, LIF, IFN- γ , OSM, CNTF, GM-CSF, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, CXCL10, IL-33, MCP-1, MIP-1-бета и любого их сочетания.

54. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеотидов, кодирующую антитело по любому из пп.1-40.

55. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.54.

56. Выделенная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.54 или вектор по п.55.

57. Выделенная клетка-хозяин, которая экспрессирует антитело по любому из пп.1-40.

58. Способ выработки антитела, которое связывается с человеческим SIRPA, включающий культивирование клетки по п.56 или 57.

59. Способ по п.58, дополнительно включающий восстановление антитела, выработанного клеткой.

60. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-40 и фармацевтически приемлемый носитель.

Потенциальная гуманизированная последовательность на основе IGKV3-11*01 акцепторном каркасном участке (AbM OKO определение)

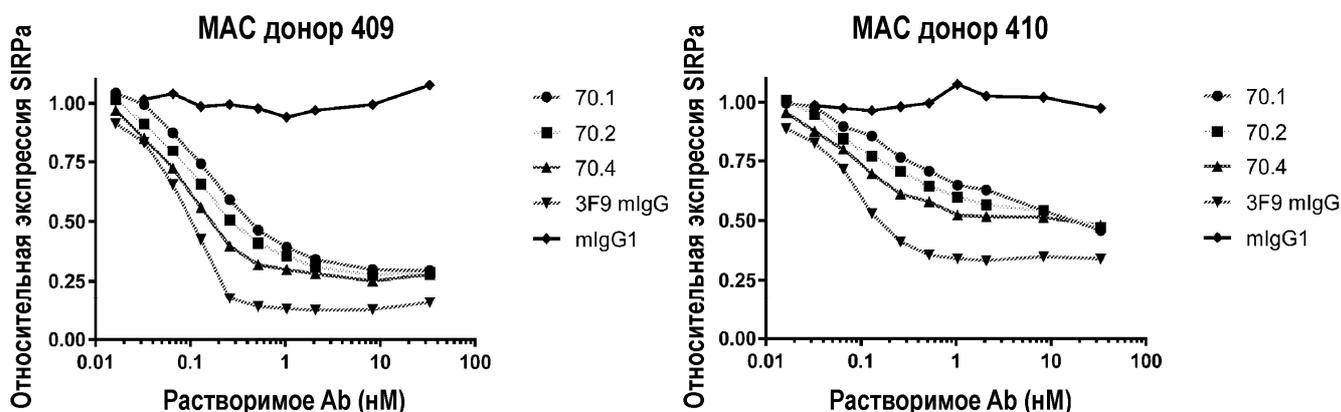
IGKV3-11*01 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPP

Объединяющая область IGMТ J00242 | IGKJ2*01 | YTFGQGTKLEIK

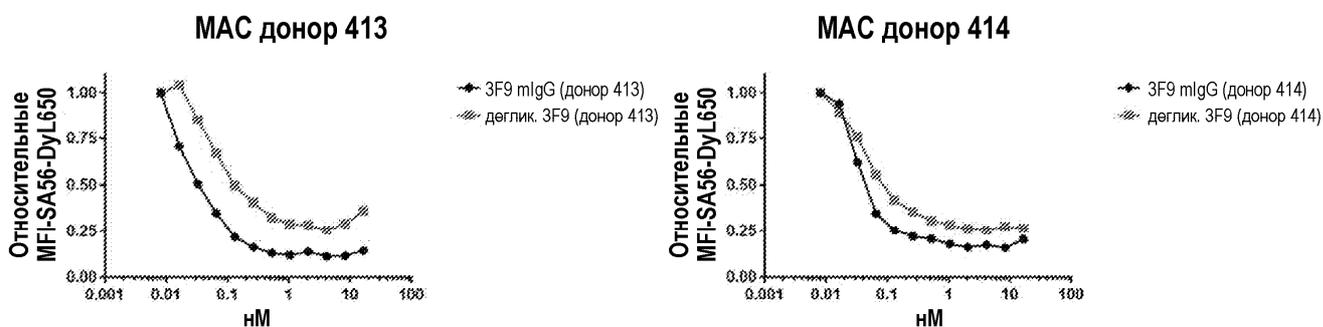
seq	10	20	30	40	50	60
AbM	10	20	30abcd	40	50	60
	b b b	p p	b b b	b b	b i b i i	i i i b b i i
SB-3F9	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC	RASKSVSSSGYSYMH	WYQQKPGQPPKLLIY	LASNLES		
	*	* * * * *	*		* *	
3-11*01	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVS----	SYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	DASNRAT	
hSB-3F9-L1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASKSVSSSGYSYMH	WYQQKPGQAPRLLIY	LASNLES		
hSB-3F9-L2	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASKSVSSSGYSYMH	WYQQKPGQAPRLLIY	LASNLES		
hSB-3F9-L3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASKSVSSSGYSYMH	WYQQKPGQAPRLLIY	LASNLES		
		V		P	#	

seq	70	80	90	100	110
AbM	60	70	80	90	100
	b b	b b b b	i b b i b	i b i i b i	b b b
SB-3F9	GVPARFSGSGSGTDFTLTNIHPVEEEDAATYYC	QHNRELPCT	FGGGTKLEIK		
	*	* * * * *	*		*
3-11*01	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC	QQRSNWPP			
hSB-3F9-L1	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC	QHNRELPCT	FGGGTKLEIK		
hSB-3F9-L2	GVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC	QHNRELPCT	FGGGTKLEIK		
hSB-3F9-L3	GVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC	QHNRELPCT	FGGGTKLEIK		
		A	#	^	

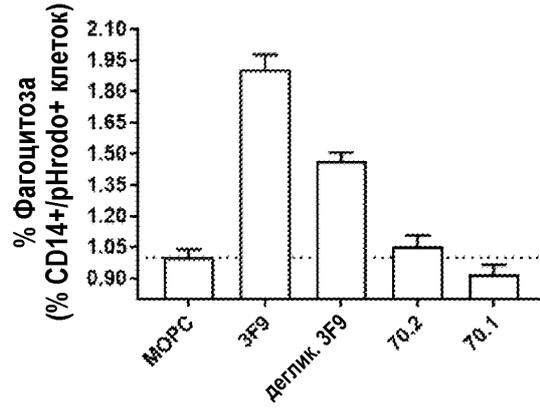
Фиг. 2B



Фиг. 3

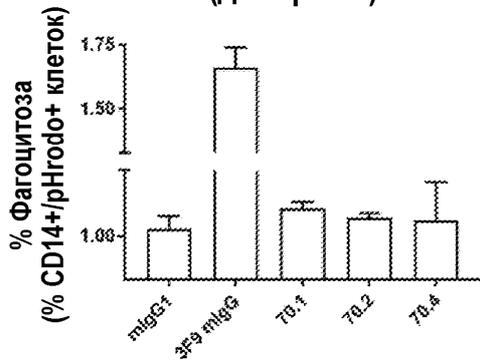


Фиг. 4A

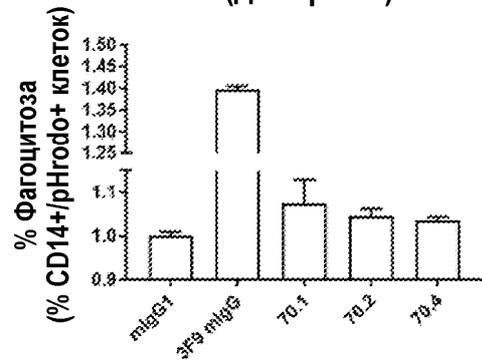


Фиг. 4В

Анализ фагоцитоза Raji-Red (донор 413)

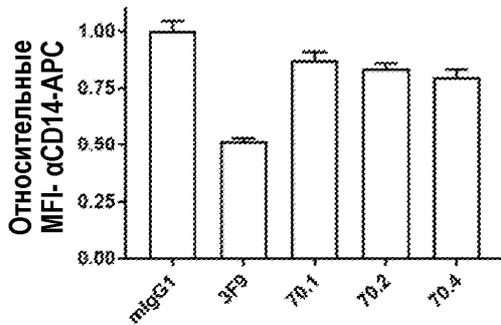


Анализ фагоцитоза Raji-Red (донор 414)

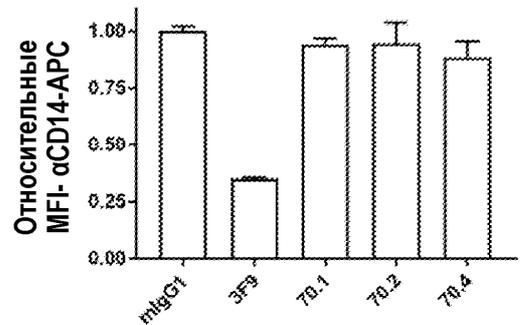


Фиг. 5А

МАС донор 413

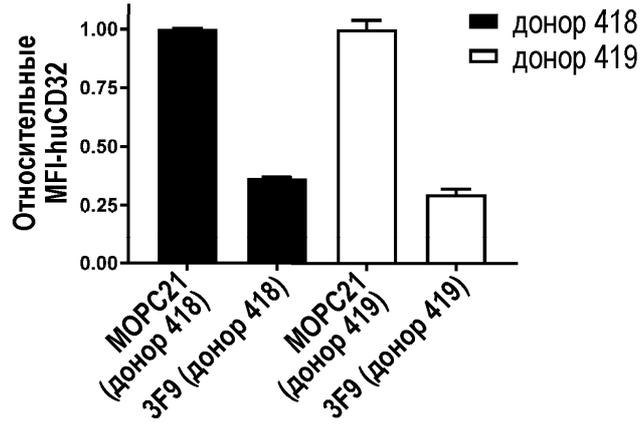


МАС донор 414



Фиг. 5В

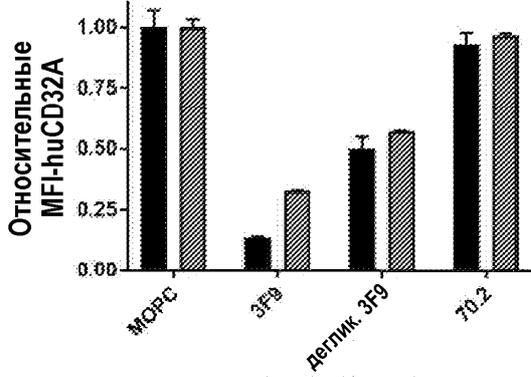
044628



Растворимое Ab (2 мкг/мл)

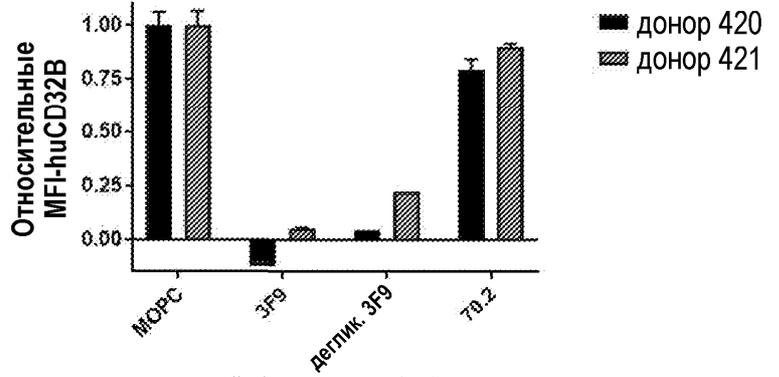
Фиг. 6А

Отрицательная регуляция FcγR2A



Растворимое Ab (2 мкг/мл)

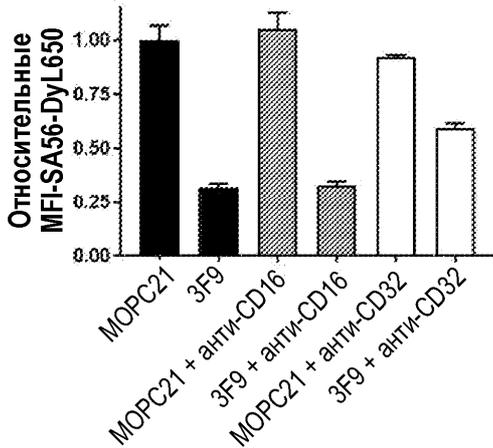
Отрицательная регуляция FcγR2B



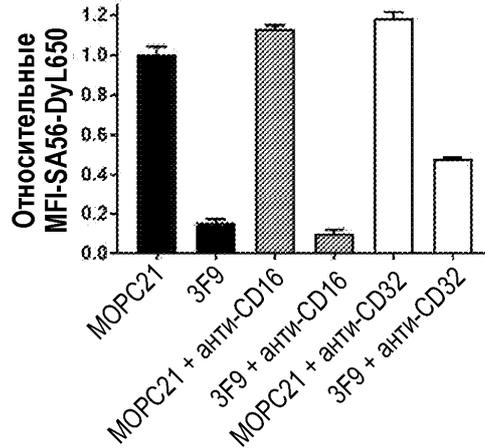
Растворимое Ab (2 мкг/мл)

Фиг. 6В

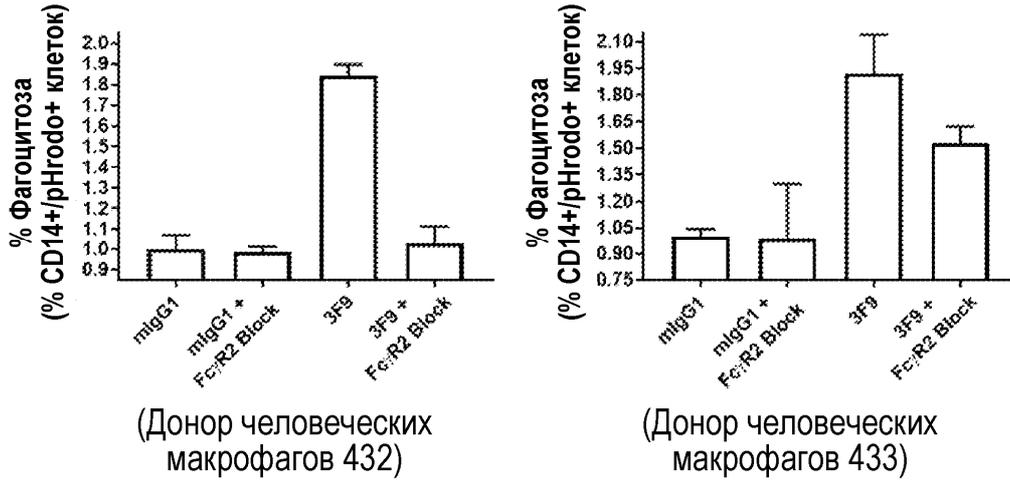
МАС донор 418



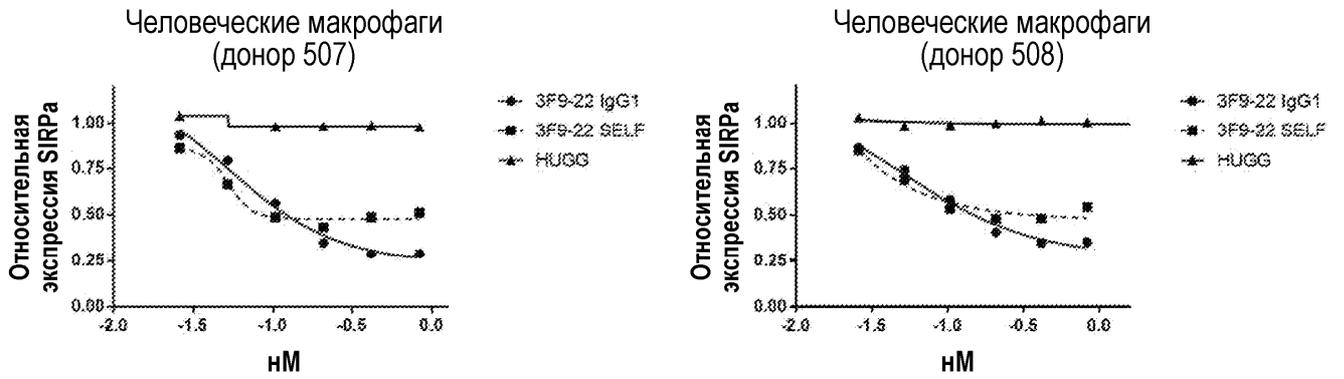
МАС донор 419



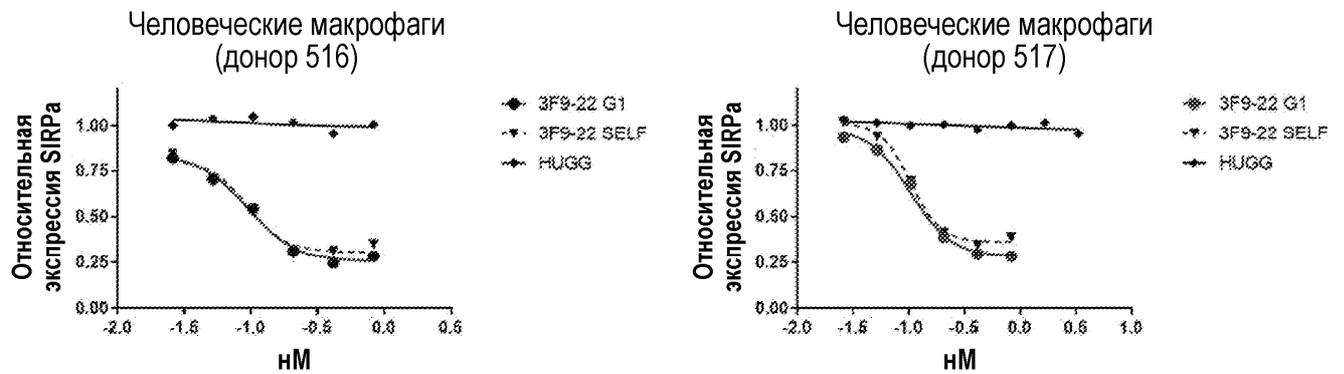
Фиг. 7А



Фиг. 7B



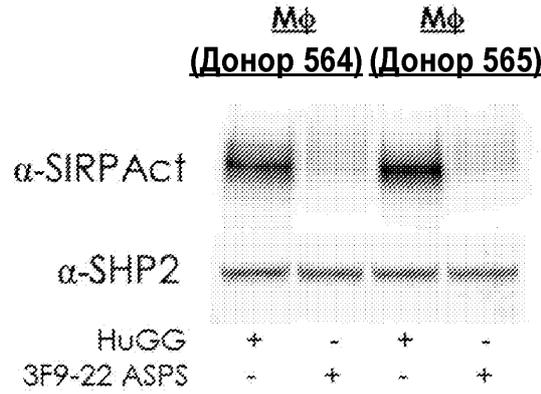
Фиг. 8A



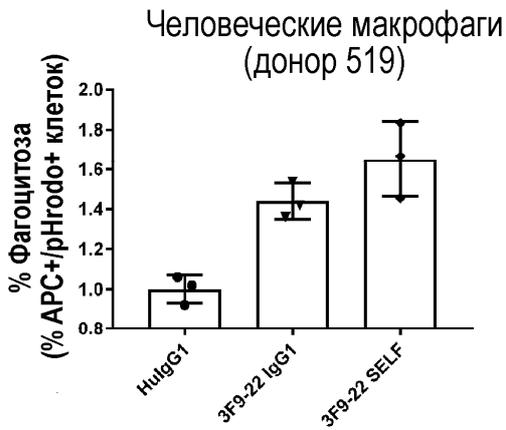
Фиг. 8B



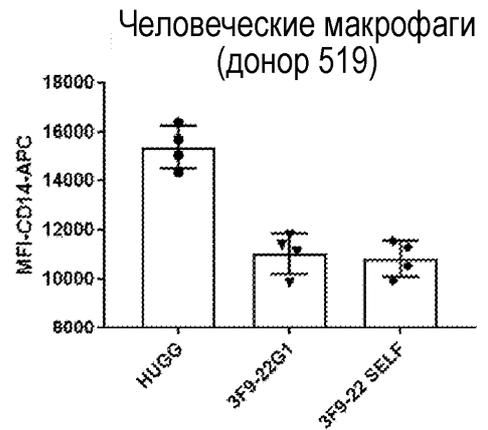
Фиг. 9A



Фиг. 9В

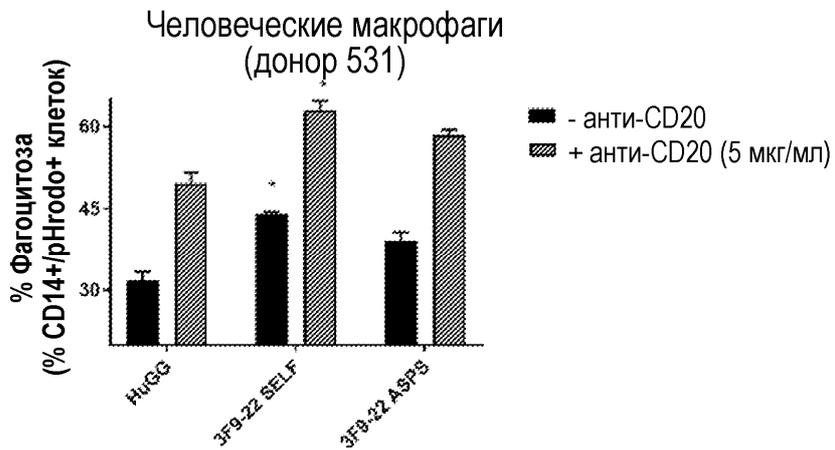


Растворимое антитело (0,5 мкг/мл)



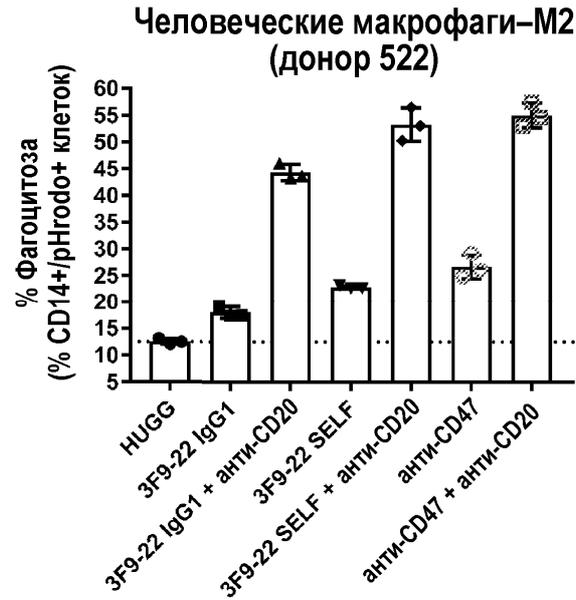
Растворимое антитело (0,5 мкг/мл)

Фиг. 10А

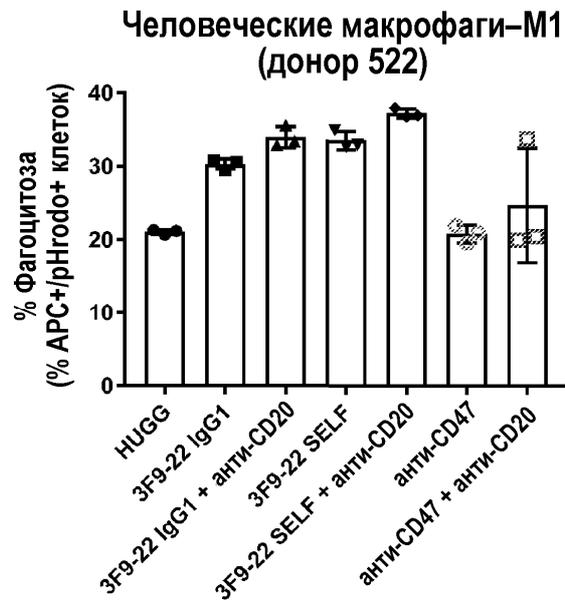


Растворимое антитело (0,5 мкг/мл)

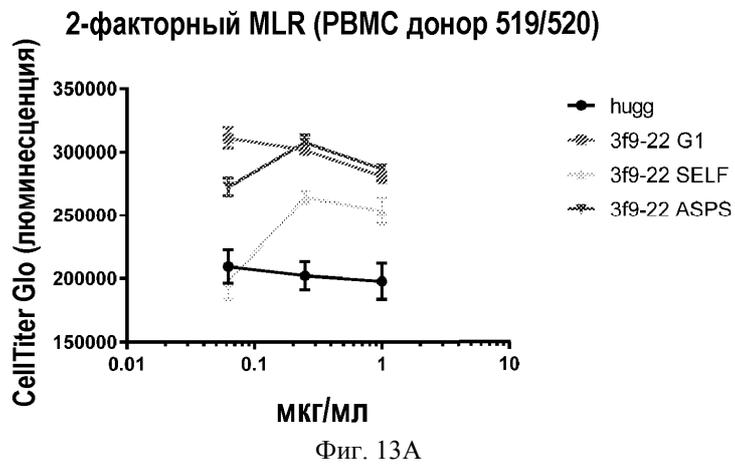
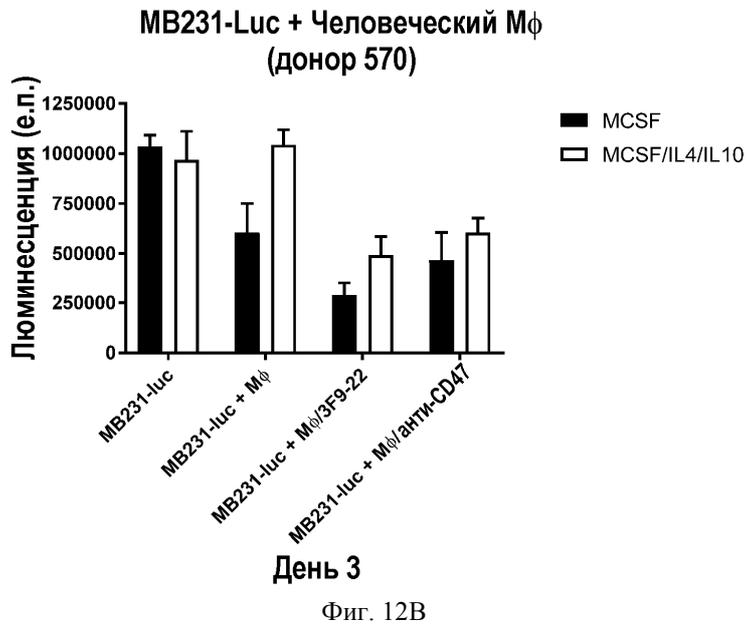
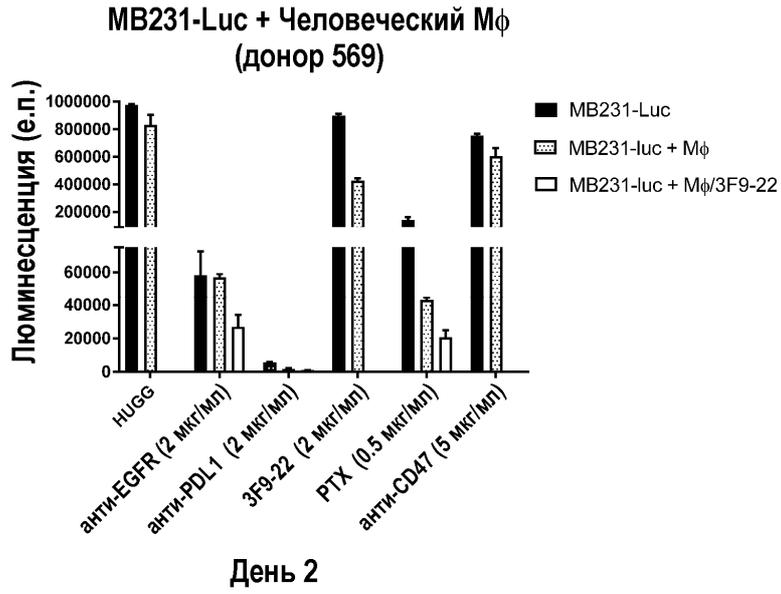
Фиг. 10В

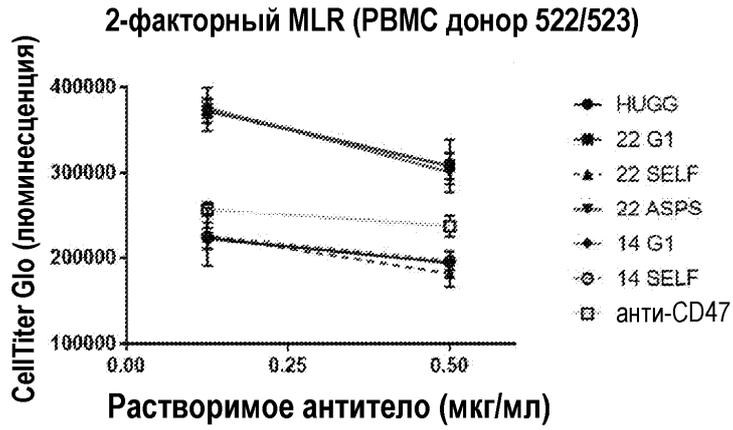


Фиг. 11А

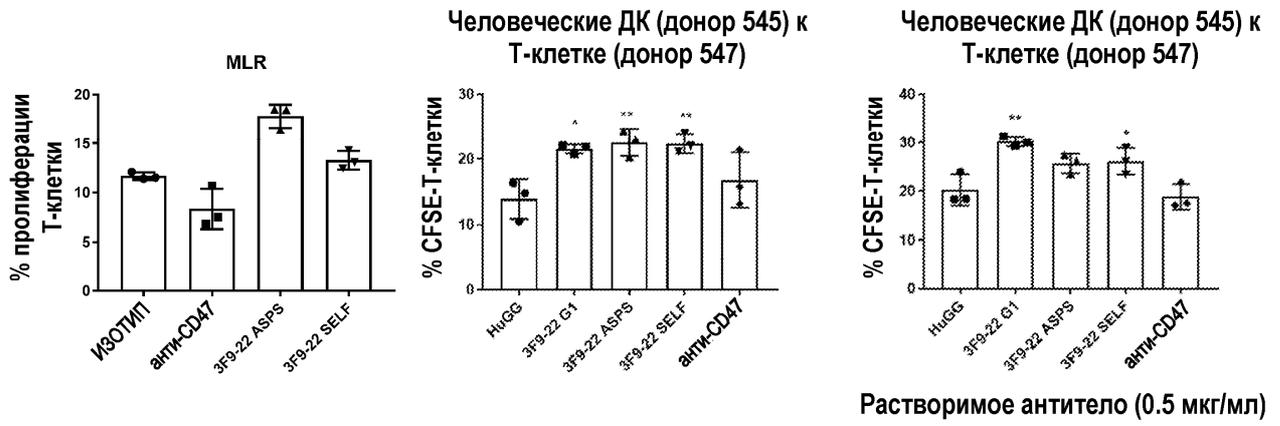


Фиг. 11В

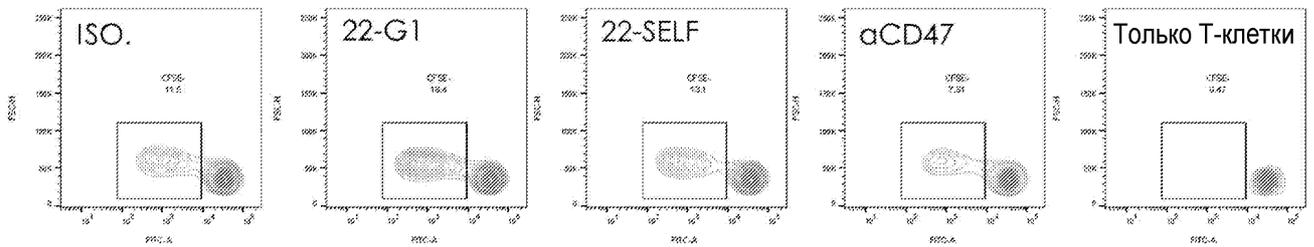




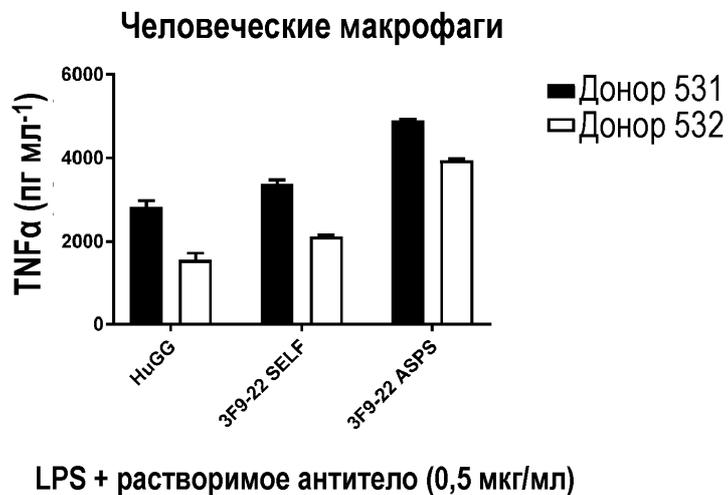
Фиг. 13В



Фиг. 14А

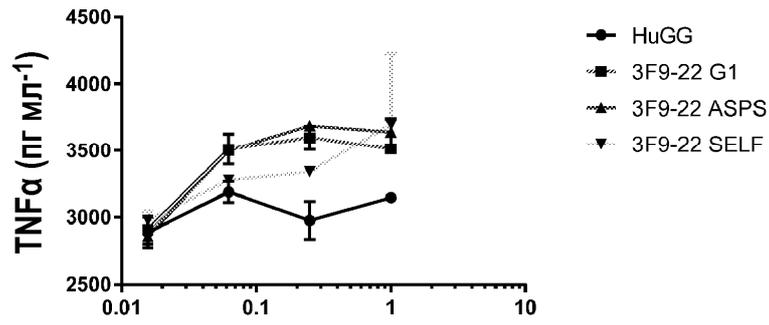


Фиг. 14В



Фиг. 15А

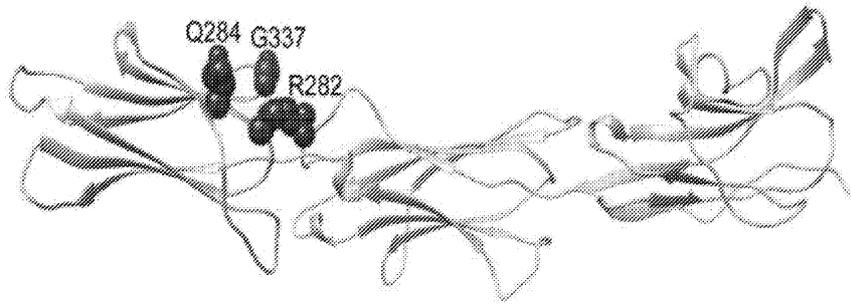
Человеческие макрофаги (донор 546)



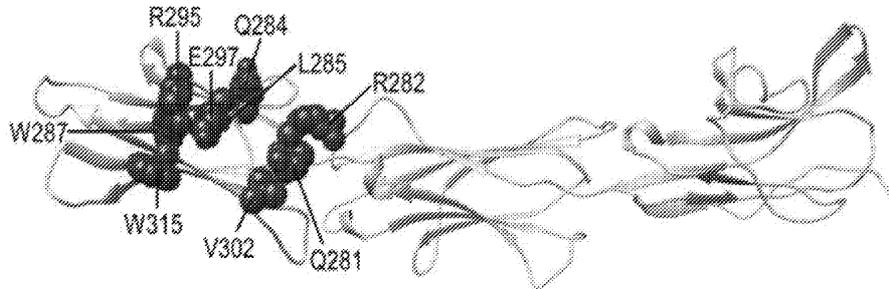
Растворимое антитело + LPS (0,5 мкг/мл)

Фиг. 15B

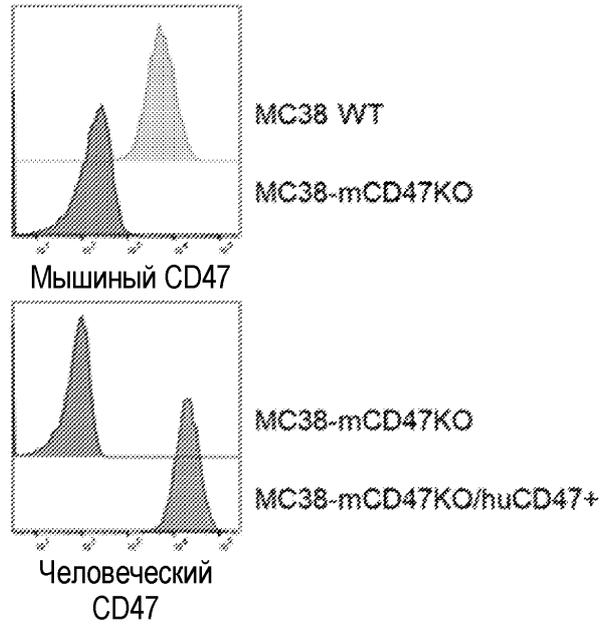
3F9 Fab



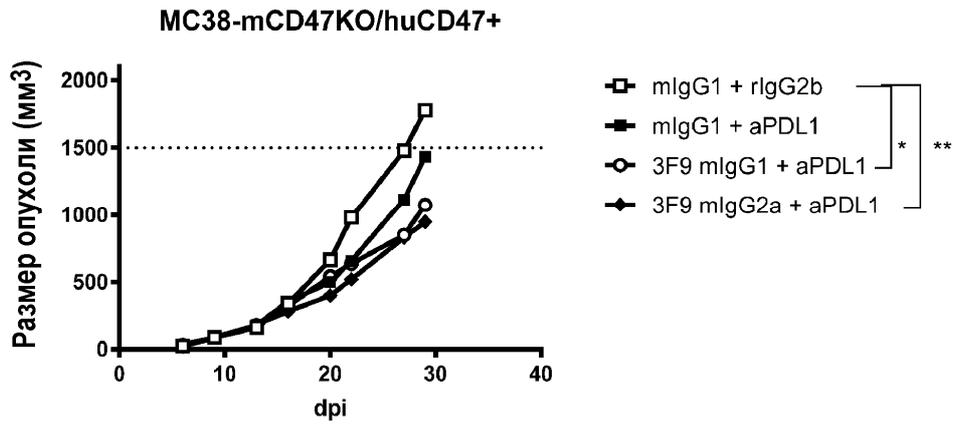
9C2 Fab



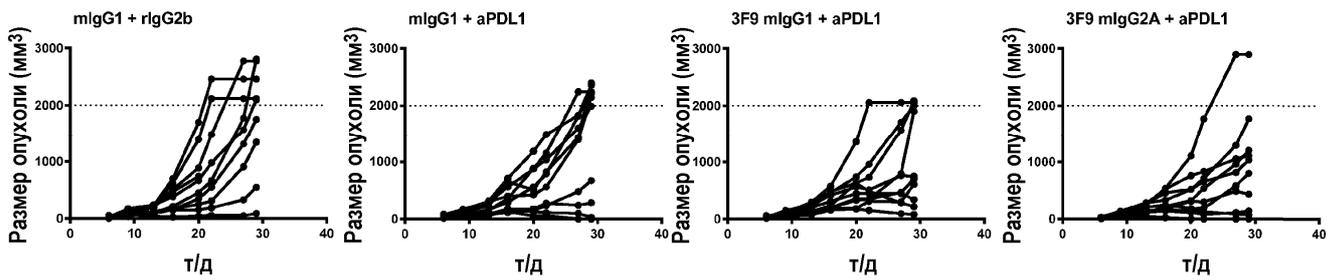
Фиг. 16



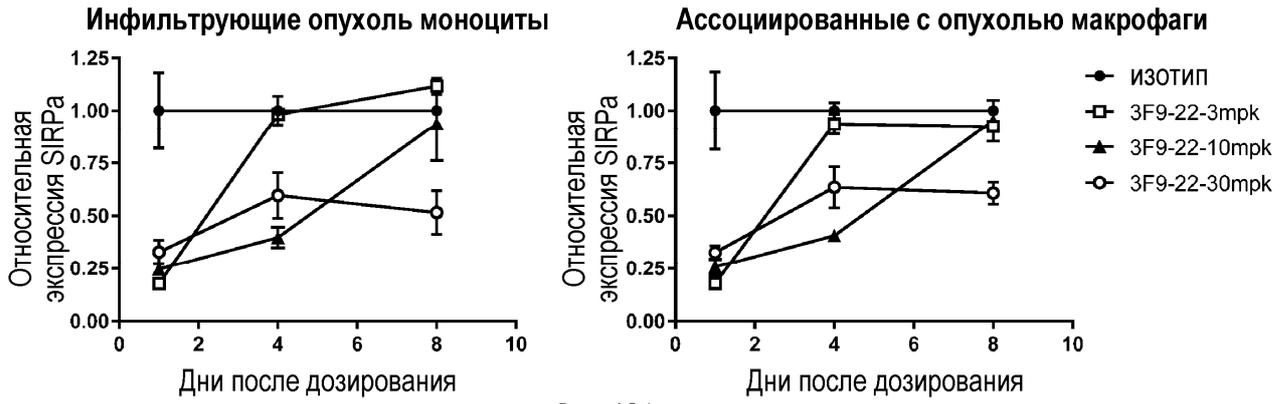
Фиг. 17А



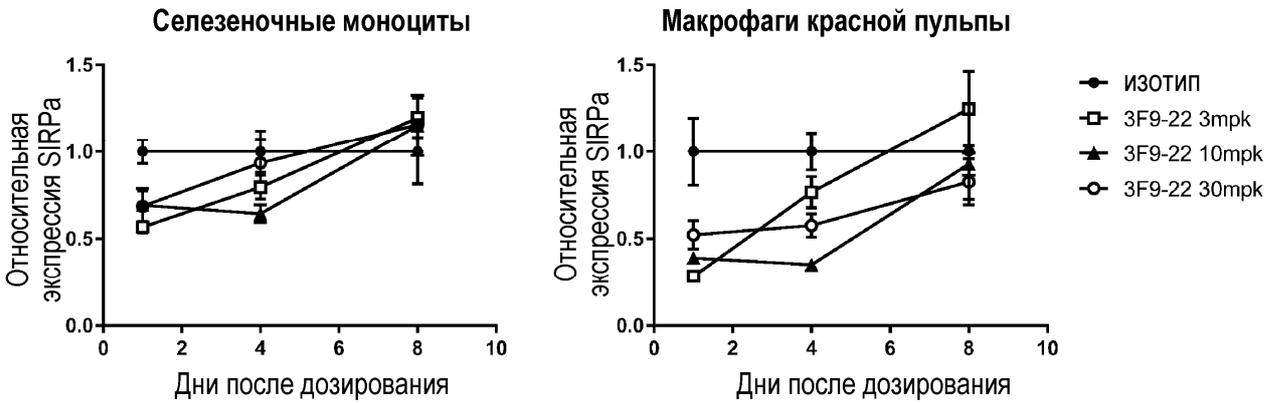
Фиг. 17В



Фиг. 17С



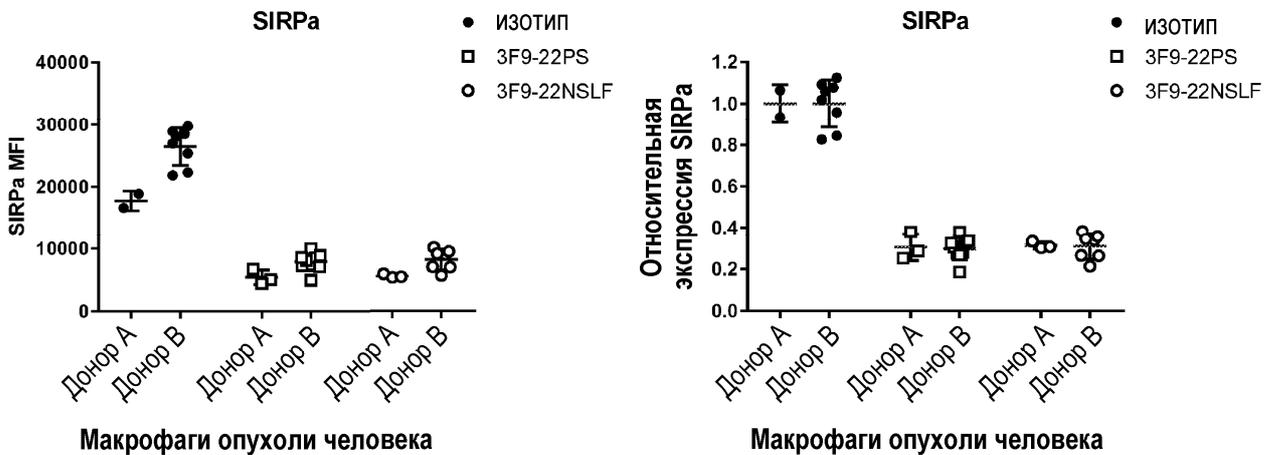
Фиг. 18А



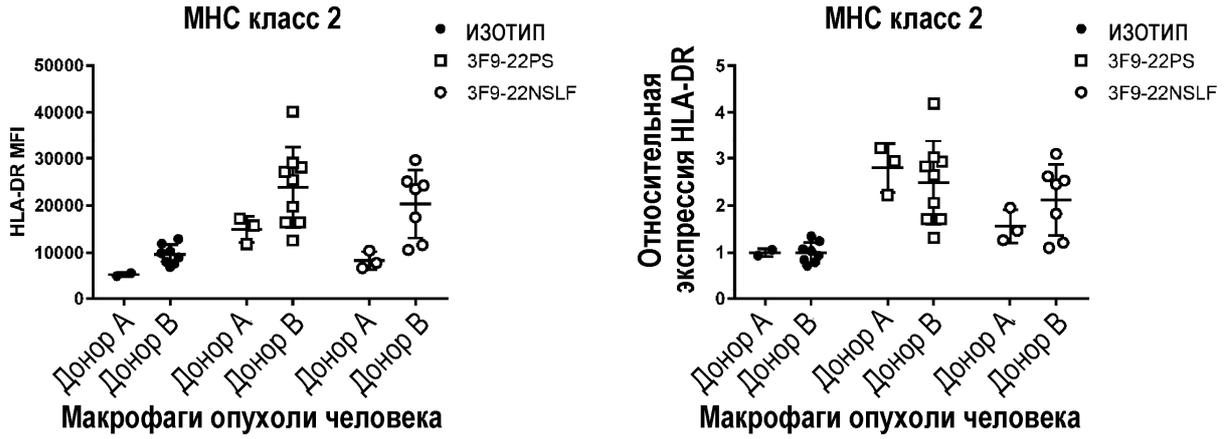
Фиг. 18В

Группа	CD34+ HSC Донор А # мыши	CD34+ HSC Донор В # мыши	Лечение антителом	Доза	Схема	Инокулят
1	2	9	huIgG1	10 mpk	q3dx2	3 миллиона клеток A375
2	3	10	3F9-22 PS	10 mpk	q3dx2	3 миллиона клеток A375
3	3	10	3F9-22 NSLF	10 mpk	q3dx2	3 миллиона клеток A375

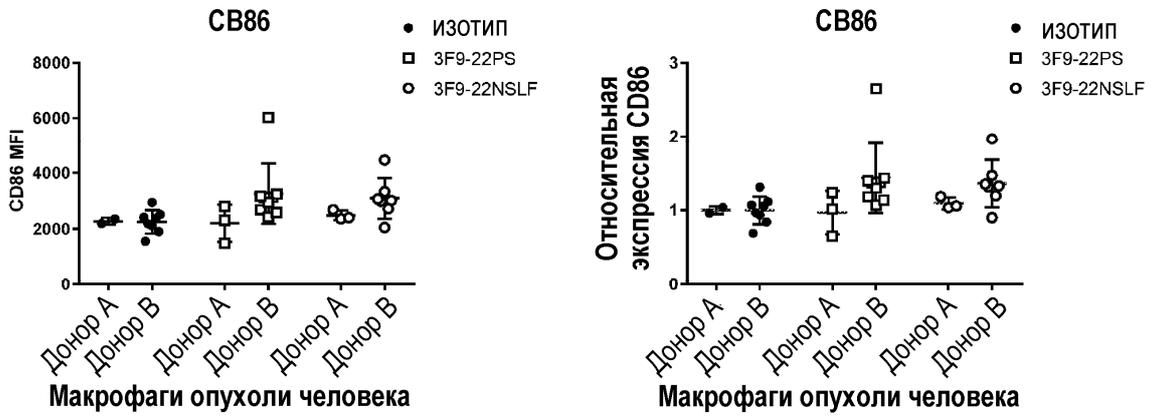
Фиг. 19А



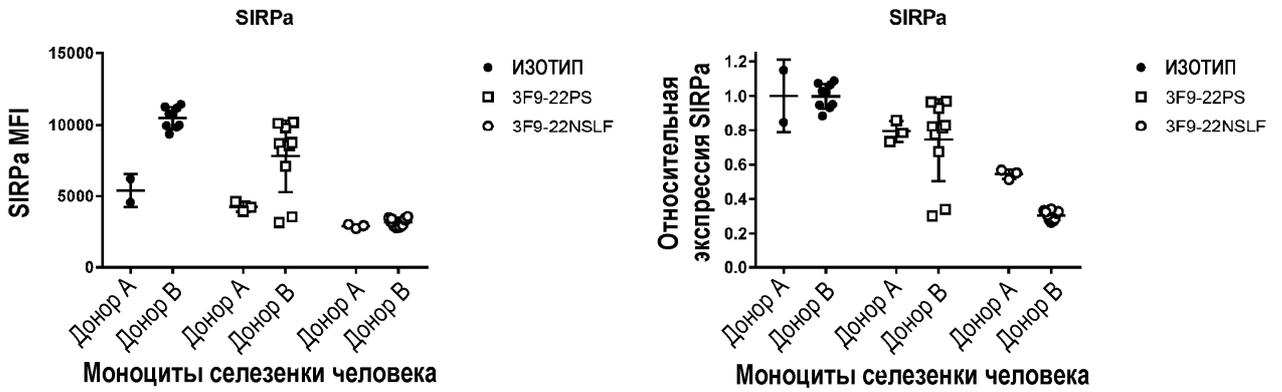
Фиг. 19В



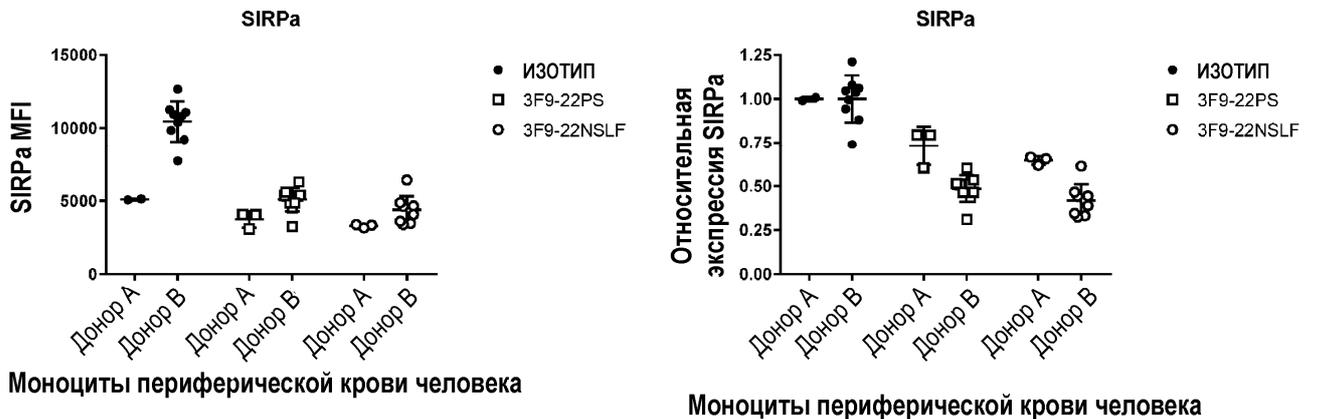
Фиг. 20А



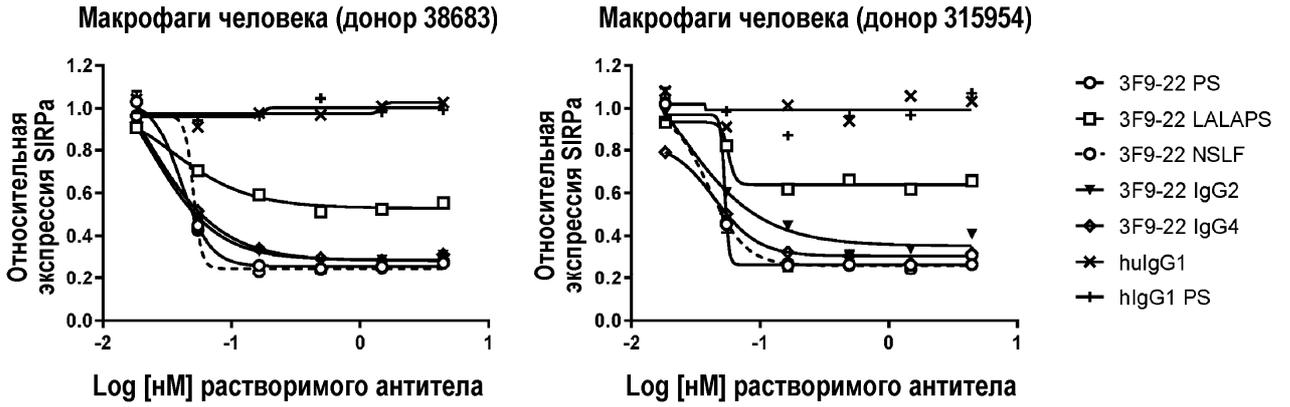
Фиг. 20В



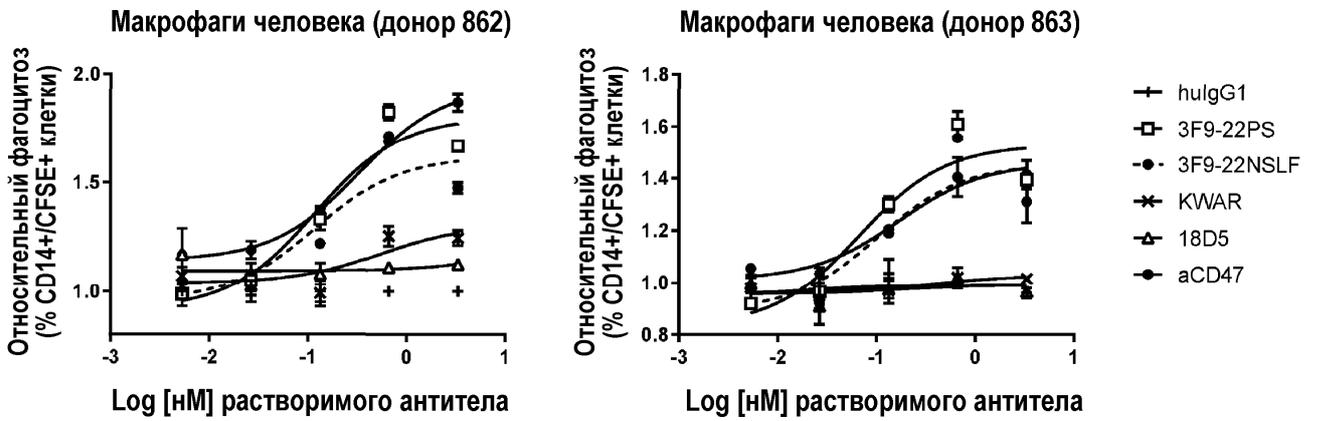
Фиг. 21А



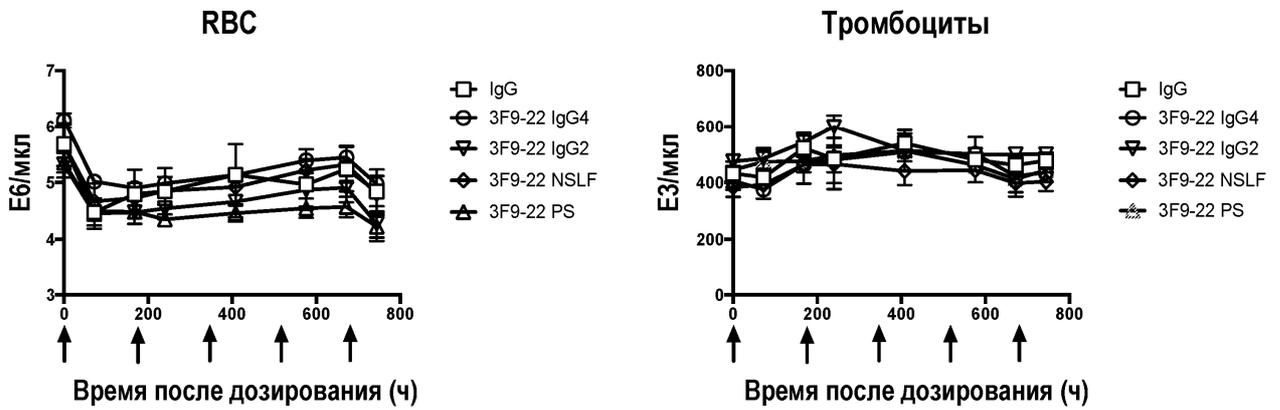
Фиг. 21В



Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24

