



(51) МПК  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*A61K 39/395* (2022.02); *A61P 35/00* (2022.02); *C07K 16/2803* (2022.02); *A61K 2039/505* (2022.02); *C07K 2317/24* (2022.02); *C07K 2317/52* (2022.02); *C07K 2317/56* (2022.02); *C07K 2317/565* (2022.02); *C07K 2317/72* (2022.02); *C07K 2317/76* (2022.02)

(21)(22) Заявка: 2019141289, 15.05.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
15.05.2018

Дата регистрации:  
28.04.2022

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
16.05.2017 EP 17171285.4

(43) Дата публикации заявки: 16.06.2021 Бюл. № 17

(45) Опубликовано: 28.04.2022 Бюл. № 13

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 16.12.2019

(86) Заявка РСТ:  
EP 2018/062473 (15.05.2018)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2018/210793 (22.11.2018)

Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО  
"Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

**ВЕРХЕЙДЕН**, Гейсбертус Франсискус  
Мария (NL),  
**РАУВЕНДАЛ**, Герард (NL),  
**АРЕНДС**, Роланд Ян (NL),  
**ВАН ДЕН БЕРГ**, Тимо Карс (NL),  
**МАТЛУНГ**, Ханке Лотти (NL),  
**ФРАНКЕ**, Катарина (NL)

(73) Патентообладатель(и):  
**БАЙОНДИС Б. В.** (NL)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: WO 2013056352 A1, 25.04.2013. WO  
2015138600 A2, 17.09.2015. VAN BEEK E.M. et  
al. Signal Regulatory Proteins in the Immune  
System. THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY,  
2005, vol.175, no.12, pp.7781-7787. BARCLAY  
A.N., VAN DEN BERG T.K. The interaction  
between signal regulatory protein alpha (SIRPa)  
and CD47: structure, function, and therapeutic  
target, (см. прод.)

(54) АНТИ-SIRP $\alpha$  АНТИТЕЛА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложены варианты анти-SIRP $\alpha$  антитела, которые подходят для применения в противораковой терапии. Изобретение также относится к применению анти-SIRP $\alpha$  антител при лечении солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека, необязательно в

комбинации с другими противораковыми терапевтическими агентами. Предложенные анти-SIRP $\alpha$  антитела проявляют высокое сродство к SIRP $\alpha_1$  и SIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$  и при этом не связываются с SIRP $\gamma$ , что обеспечивает преимущества при применении антител в противораковой терапии. 5 н. и 10 з.п. ф-лы, 4 ил., 4 табл.

(56) (продолжение):

ANNU. REV. IMMUNOL., 2014, vol. 32, pp.25-50. RU 2597831 C2, 20.09.2016.

R U 2 7 7 1 1 7 4 C 2

R U 2 7 7 1 1 7 4 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 39/3955* (2022.02); *A61P 35/00* (2022.02); *C07K 16/2803* (2022.02); *A61K 2039/505* (2022.02); *C07K 2317/24* (2022.02); *C07K 2317/52* (2022.02); *C07K 2317/56* (2022.02); *C07K 2317/565* (2022.02); *C07K 2317/72* (2022.02); *C07K 2317/76* (2022.02)

(21)(22) Application: **2019141289, 15.05.2018**(24) Effective date for property rights:  
**15.05.2018**Registration date:  
**28.04.2022**

Priority:

(30) Convention priority:  
**16.05.2017 EP 17171285.4**(43) Application published: **16.06.2021 Bull. № 17**(45) Date of publication: **28.04.2022 Bull. № 13**(85) Commencement of national phase: **16.12.2019**(86) PCT application:  
**EP 2018/062473 (15.05.2018)**(87) PCT publication:  
**WO 2018/210793 (22.11.2018)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO  
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**VERKHEJDEN, Gejsbertus Fransiskus Mariya (NL),  
RAUVENDAL, Gerard (NL),  
ARENDS, Roland Yan (NL),  
VAN DEN BERG, Timo Kars (NL),  
MATLUNG, Khanke Lotti (NL),  
FRANKE, Katarina (NL)**

(73) Proprietor(s):

**BAJONDIS B. V. (NL)**(54) **ANTI-SIRP $\alpha$  ANTIBODIES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: options of an anti-SIRP $\alpha$  antibody are proposed that are suitable for use in the anticancer therapy. The invention also relates to the use of anti-SIRP $\alpha$  antibodies in the treatment of solid tumors and hematological malignant neoplasms in a human, optionally in a combination with other anticancer

therapeutic agents.

EFFECT: proposed anti-SIRP $\alpha$  antibodies demonstrate high affinity to SIRP $\alpha_1$  and SIRP $\alpha_{BIT}$  and at the same time do not bind with SIRP $\gamma$ , which provides advantages in using antibodies in the anticancer therapy.

15 cl, 4 dwg, 4 tbl

**ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

Настоящее изобретение относится к анти-SIRP $\alpha$  антителам и применению этих антител в лечении рака, необязательно в комбинации с другими противораковыми терапевтическими средствами.

**5 УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

С конца 1990-х годов терапевтические антитела стали доступны для лечения рака. Эти терапевтические антитела могут воздействовать на злокачественные клетки различными путями. Сигнальные пути, запускаемые связыванием антитела со своей мишенью на злокачественных клетках, приводят к подавлению клеточной пролиферации или апоптозу. Fc-область терапевтического антитела может запускать комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). Однако терапевтические антитела, используемые в качестве монотерапии, часто оказываются недостаточно эффективными. Одним из вариантов улучшения эффективности терапевтических антител является усиление ADCC и/или ADCP. Это было сделано путем улучшения средства Fc-области к рецепторам Fc $\gamma$ , например, с помощью аминокислотных замен (Richards et al. Mol. Cancer Ther. 2008, 7(8), 2517-2527) или путем воздействия на гликозилирование Fc-области (Hayes et al. J. Inflamm. Res. 2016, 9, 209-219).

Другим способом усиления ADCC и/или ADCP терапевтического антитела является комбинирование терапевтического антитела с антагонистическим антителом к сигнальному регуляторному белку  $\alpha$  (анти-SIRP $\alpha$ ) или анти-CD47-антителом (WO2009/131453). Когда CD47 связывается с ингибирующим иммунорецептором SIRP $\alpha$ , экспрессируемым на моноцитах, макрофагах, дендритных клетках и нейтрофилах, SIRP $\alpha$  передает ингибирующий сигнал, который предотвращает разрушение раковых клеток путем фагоцитоза или посредством других зависимых от Fc-рецепторов механизмов разрушения иммунных эффекторных клеток.

Опухолевые клетки используют активацию CD47 в качестве механизма, позволяющего избежать противоопухолевого иммунного ответа, индуцированного терапевтическими антителами. Анти-CD47 или анти-SIRP $\alpha$  антитела блокируют передачу ингибирующих сигналов, генерируемых через ось CD47-SIRP $\alpha$ , что приводит к усилению ADCC и/или ADCP.

Большинство клинических исследований, имеющих отношение к взаимодействию CD47-SIRP $\alpha$ , было сосредоточено на анти-CD47 антителах, как в качестве монотерапии, так и в качестве терапии в комбинации с терапевтическим антителом (Weiskopf. Eur. J. Cancer 2017, 76, 100-109). Количество исследований, направленных на изучение анти-CD47 антитела в качестве противораковых лекарственных средств, растут, несмотря на то что CD47 также экспрессируется на поверхности клеток большинства нормальных тканей.

Имеется небольшая работа по изучению противораковой монотерапии или комбинированной терапии с помощью анти-SIRP $\alpha$  антител. Большая часть этой работы по изучению анти-SIRP $\alpha$  антител, выполненная с использованием мышиных анти-SIRP $\alpha$  антител, представляет собой механистические исследования, касающиеся взаимодействия CD47-SIRP $\alpha$ ; например, мышиные 12C4 и 1.23A увеличивали опосредованную нейтрофилами ADCC трастузумаба в опсонизированных клетках SKBR3 (Zhao et al. PNAS 2011, 108(45), 18342-18347). В WO 2015/138600 раскрыто мышиное антитело KWAR23 к человеческому SIRP $\alpha$  и его химерный Fab-фрагмент, который усиливал фагоцитоз *in vitro*, т.е. цетуксимаб. В WO2018/026600 раскрыто гуманизованное KWAR23 с Fc-частью человеческого IgG<sub>1</sub>, содержащей мутацию N297A. В WO2013/

056352 раскрыты 29AM4-5 IgG<sub>4</sub> и другие человеческие анти-SIRP $\alpha$  антитела класса IgG<sub>4</sub>. 29AM4-5 IgG<sub>4</sub>, вводимое три раза в неделю в течение четырех недель в дозе 8 мг/кг, уменьшало приживание лейкемических клеток первичной AML человека, инъецированных в правое бедро NOD-scid-gamma мышей (NSG).

SIRP $\alpha$  является членом семейства сигнальных регуляторных белков (SIRP), трансмембранных гликопротеинов с внеклеточными Ig-подобными доменами, присутствующими на иммунных эффекторных клетках. Домен SIRP $\alpha$ , связывающий NH<sub>2</sub>-терминальный лиганд, является высоко полиморфным (Takenaka et al. Nature Immun. 2007, 8(12), 1313-1323). Однако этот полиморфизм не оказывает значительного влияния на связывание с CD47. SIRP $\alpha$ <sub>ВГТ</sub> (v1) и SIRP $\alpha$ <sub>1</sub> (v2) являются двумя наиболее распространенными и наиболее расходящимися (отличающимися друг от друга 13 остатками) полиморфами (Hatherley et al. J. Biol. Chem. 2014, 289(14), 10024-10028). Другими биохимически охарактеризованными членами человеческого семейства SIRP являются SIRP $\beta$ <sub>1</sub> и SIRP $\gamma$ .

SIRP $\beta$ <sub>1</sub> не связывается с CD47 (van Beek et al. J. Immunol. 2005, 175 (12), 7781-7787, 7788-7789), при этом известны по меньшей мере два полиморфных варианта SIRP $\beta$ <sub>1</sub>: SIRP $\beta$ <sub>1v1</sub> (ENSP00000371018) и SIRP $\beta$ <sub>1v2</sub> (ENSP00000279477). Хотя природный лиганд SIRP $\beta$ <sub>1</sub> пока неизвестен, исследования *in vitro* с использованием антител, специфических к SIRP $\beta$ <sub>1</sub>, показывают, что связывание SIRP $\beta$ <sub>1</sub> способствует фагоцитозу в макрофагах путем индукции фосфорилирования тирозиновых остатков DAP12, Syk и SLP-76 и последующей активации MEK-MAPK-сигнального каскада киназы легких цепей миозина (Matozaki et al. J. Biol. Chem. 2004, 279(28), 29450-29460).

SIRP $\gamma$  экспрессируется на Т-клетках и активированных НК-клетках и связывается с CD47 со сродством в 10 раз более низким, чем с SIRP $\alpha$ . Взаимодействие CD47-SIRP $\gamma$  имеет место во время контакта между антигенпрезентирующими клетками и Т-клетками, костимуляции активации Т-клеток и способствует пролиферации Т-клеток (Piccio et al. Blood 2005, 105, 2421-2427). Кроме того, взаимодействия CD47-SIRP $\gamma$  играют роль в трансэндотелиальной миграции Т-клеток (Stefanisakis et al. Blood 2008, 112, 1280-1289).

Анти-SIRP $\alpha$  антитела, известные в данной области техники, менее пригодны для использования в моно- или комбинированной терапии, направленной на SIRP $\alpha$ , поскольку они либо не являются специфическими к человеческому SIRP $\alpha$ , либо являются слишком специфическими. Антитела предшествующего уровня техники KWAR23, SE5A5, 29AM4-5 и 12C4 не являются специфическими, так как они также связываются с человеческим SIRP $\gamma$ . Связывание с SIRP $\gamma$ , который экспрессируется на Т-клетках, может оказывать негативное влияние на пролиферацию и рекрутирование Т-клеток. Другие анти-SIRP $\alpha$  антитела имеют слишком ограниченную специфичность, например, 1.23A mAb распознает только полиморфный вариант SIRP $\alpha$ <sub>1</sub> человеческого SIRP $\alpha$ , и не распознает вариант SIRP $\alpha$ <sub>ВГТ</sub>, который преобладает по меньшей мере в кавказской популяции (X.W. Zhao et al. PNAS 2011, 108(45), 18342-18347).

Помимо использования анти-SIRP $\alpha$  антител для усиления ADCC терапевтического антитела, эти антитела также могут быть использованы для нацеливания непосредственно на типы рака, экспрессирующие SIRP $\alpha$ . Анти-SIRP $\alpha$  антитела, содержащие человеческий Fc дикого типа, могут быть пригодны для лечения рака, экспрессирующего SIRP $\alpha$ , такого как почечно-клеточный рак и злокачественная меланома, поскольку мышиные анти-SIRP $\alpha$  антитела, имеющие функциональную Fc-область, замедляли образование опухоли у мышей, которым инъецировали клетки

Ренка (Renca) и клетки меланомы B16BL6, экспрессирующие SIRP $\alpha$  (Yanagita et al. JCI Insight 2017, 2(1), e89140).

В заключение следует отметить, что остается потребность в анти-SIRP $\alpha$  антителах, которые имеют низкий уровень связывания с SIRP $\gamma$ , которые специфически связываются с обоими полиморфными вариантами SIRP $\alpha_1$  и SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$  и которые могли бы использоваться в противораковой терапии либо отдельно, либо в комбинации с терапевтическими антителами.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к анти-SIRP $\alpha$  антителам, которые подходят для применения в противораковой терапии. Изобретение также относится к применению антител для лечения солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1. Сравнение ADCC, измеренной в % цитотоксичности только трастузумаба (Tmab), трастузумаба в комбинации с мышинным анти-SIRP $\alpha$  антителом 12C4 (mu12C4), трастузумаба в комбинации с антителом, в котором вариабельные области мышинового 12C4 привиты на константную область человеческого IgG $_1$  (12C4huIgG $_1$ ), и трастузумаба в комбинации с антителом, в котором вариабельные области мышинового 12C4 привиты на константную область человеческого IgG $_1$ , содержащую аминокислотные замены L234A и L235A (12C4huIgG $_1$ LALA), измеренные на HER2-позитивных раковых клетках молочной железы SKBR3 с использованием человеческих нейтрофилов в качестве эффекторных клеток.

Фиг. 2. Сравнение % ADCC, относительно трастузумаба (установленного на 100%), комбинаций трастузумаба с анти-SIRP $\alpha$  антителами 1-9, имеющими константную область человеческого IgG $_1$ , содержащую аминокислотные замены L234A и L235A, анти-SIRP $\alpha$  антителом 12C4huIgG $_1$ LALA (12C4LALA) и анти-CD47 антителом B6H12huIgG $_1$ LALA (B6H12LALA) на клетках SKBR3. Залитые квадраты (■) являются значениями, измеренными с помощью нейтрофилов, полученных от доноров, имеющих вариант SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ , незалитые круги, (○), являются значениями, измеренными с помощью нейтрофилов, полученных от доноров, имеющих вариант SIRP $\alpha_1$ . Столбцы являются средними значениями по всем донорам; планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

Фиг.3. Сравнение % ADCC, относительно только трастузумаба, комбинаций трастузумаба с анти-SIRP $\alpha$  антителами 4, 7, 10, 14 в различных концентрациях (кривые доза-ответ), имеющими константную область человеческого IgG $_1$ , содержащую аминокислотные замены L234A и L235A, и анти-SIRP $\alpha$  антителом 12C4huIgG $_1$ LALA (12C4LALA) на клетках SKBR3. Нейтрофилы, полученные от двух доноров ( $\Delta$ , ○), имели вариант SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ . Столбцы представляют собой среднее значение для двух доноров.

Фиг.4. Сравнение % ADCC, относительно только трастузумаба, комбинаций трастузумаба с анти-SIRP $\alpha$  антителами 4, 7, 10, 13, 14, 15 и 16, имеющими константную область человеческого IgG $_1$ , содержащую аминокислотные замены L234A и L235A, и анти-SIRP $\alpha$  антителом 12C4huIgG $_1$ LALA (12C4LALA) на клетках SKBR3. Использовали нейтрофилы, полученные от доноров, имеющих вариант SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$  ( $\Delta$ ,  $\nabla$ ,  $\diamond$ ), вариант SIRP $\alpha_1$  (d,  $\ominus$ ), и нейтрофилы, полученные от донора, вариант которого не был определен

(□). Столбцы являются средними значениями для доноров.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Не существует апробированных терапевтических средств, направленных против SIRP $\alpha$ , хотя было показано, что эта мишень играет важную роль в механизмах уклонения опухоли от иммунной системы. Кроме того, SIRP $\alpha$  экспрессируется на различных злокачественных клетках, что делает его потенциальным антигеном, ассоциированным с опухолью.

Настоящее изобретение относится к антагонистическим анти-SIRP $\alpha$  антителам, которые имеют специфическое связывание с двумя преобладающими полиморфными вариантами SIRP $\alpha_{\text{WT}}$  и SIRP $\alpha_1$ , которые не связываются с SIRP $\gamma$  и которые увеличивают ADCC и/или ADCP терапевтических антител.

Термин «антитело», используемый в настоящем описании, относится к моноклональному антителу (mAb), содержащему две тяжелые цепи и две легкие цепи. Антитела могут иметь любой изотип, такой как антитела IgA, IgE, IgG или IgM. Предпочтительно антитело представляет собой антитело IgG, более предпочтительно антитело IgG $_1$  или IgG $_2$ . Антитела могут быть химерными, гуманизированными или человеческими. Предпочтительно антитела по изобретению являются гуманизированными. Еще более предпочтительно, антитело представляет собой гуманизированное или человеческое антитело IgG, наиболее предпочтительно гуманизированное или человеческое mAb IgG $_1$ . Антитело может иметь  $\kappa$  (каппа) или  $\lambda$  (лямбда) легкие цепи, предпочтительно  $\kappa$  (каппа) легкие цепи, т.е. гуманизированное или человеческое антитело IgG $_1$ - $\kappa$ . Антитела могут содержать сконструированную константную область, т.е. могут быть введены одна или более мутаций, например, для увеличения периода полураспада и/или усиления или ослабления эффекторной функции.

Используемый в настоящем описании термин «моноклональное антитело» или «mAb» может относиться к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е., отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Антитела могут быть получены путем иммунизации животных смесью пептидов, представляющих желаемый антиген. В-лимфоциты выделяют и сливают с клетками миеломы, или отдельные В-лимфоциты культивируют в течение нескольких дней в присутствии кондиционированной среды и питающих клеток. Супернатанты миеломы или В-лимфоцитов, содержащие продуцированные антитела, тестируют для отбора подходящих В-лимфоцитов или гибридом. Моноклональные антитела могут быть получены из подходящих гибридом методом гибридомы, впервые описанным Köhler et al. Nature 1975, 256, 495-497. Альтернативно, для получения РНК подходящие В-клетки или клетки лимфомы могут быть лизированы, РНК может быть выделена, подвергнута обратной транскрипции и секвенирована. Антитела могут быть получены методами рекомбинантной ДНК в бактериальных, эукариотических клетках животных или растений (см., например, патент США № 4816567). «Моноклональные антитела» также могут быть выделены из фаговых библиотек антител методами, описанными в данной области техники, например, в Clackson et al. Nature 1919, 352, 624-628 и Marks et al. J. Mol. Biol. 1991, 222, 581-597.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент», используемый в настоящем описании, включает фрагмент Fab, Fab' или F(ab') $_2$ , одноцепочечное (sc) антитело, scFv, однодоменное (sd) антитело, диатело или минитело.

В гуманизированных антителах антигенсвязывающие, определяющие

комплементарность области (CDR) в вариабельных областях (VR) тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC), получают из антител не относящегося к человеку вида, обычно мыши, крысы или кролика. Эти не являющиеся человеческими CDR объединяют с человеческими каркасными областями (FR1, FR2, FR3 и FR4) вариабельных областей HC и LC таким образом, чтобы были сохранены функциональные свойства антител, такие как сродство и специфичность связывания. Выбранные аминокислоты в человеческих FR могут быть заменены соответствующими исходными аминокислотами не относящегося к человеку вида для улучшения сродства связывания при сохранении низкой иммуногенности. Альтернативно, выбранные аминокислоты исходных FR не относящегося к человеку вида заменяют соответствующими им человеческими аминокислотами для уменьшения иммуногенности при сохранении сродства связывания антитела. Таким образом, гуманизированные вариабельные области объединяют с человеческими константными областями.

CDR могут быть определены с помощью подхода Кабат (см. Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., NIH publication no. 91-3242, pp. 662, 680, 689 (1991)), Чотиа (Chothia et al., Nature 1989, 342, 877-883) или IMGT (Lefranc, The Immunologist 1999, 7, 132-136). В контексте настоящего изобретения для указания положений в константных областях тяжелой цепи и легкой цепи антитела используется нумерация Eu. Выражение «нумерация Eu» относится к индексу Eu, как указано в Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., NIH publication no. 91-3242, pp. 662, 680, 689 (1991).

Антагонистические антитела имеют сродство к конкретному антигену, и связывание этого антитела со своим антигеном подавляет функцию агониста или обратного агониста в отношении рецепторов. В данном случае связывание антагонистического анти-SIRP $\alpha$  антитела с SIRP $\alpha$  будет либо предотвращать связывание CD47 с SIRP $\alpha$ , либо нарушать ингибирующий сигнал, который запускается связыванием CD47 с SIRP $\alpha$ .

Антагонистические анти-SIRP $\alpha$  антитела могут связываться с тем же участком, с которым связывается CD47, предотвращая лигирование SIRP $\alpha$  с помощью CD47 и, следовательно, ингибируя сигнальный каскад, который отрицательно регулирует зависимые от Fc-рецепторов функции иммунных эффекторных клеток. Антагонистические анти-SIRP $\alpha$  антитела также могут связываться с участком SIRP $\alpha$ , который отличается от CD47-связывающего участка, т.е. с аллостерическим участком, и подавлять передачу ингибирующих сигналов SIRP $\alpha$  без прямого вмешательства в физическое взаимодействие CD47-SIRP $\alpha$ , например, путем изменения пространственной формы SIRP $\alpha$ . Это изменение пространственной формы предотвращает (ниже расположенную) передачу сигналов при связывании с CD47. Когда SIRP $\alpha$  связывается на аллостерическом участке, CD47 может все еще быть связанным с SIRP $\alpha$ , что может уменьшить доступность CD47 для связывания с тромбоспондином-1 (TSP-1).

Лигирование TSP-1 с CD47 является важным, например, при отрицательной регуляции активации Т-клеток (Soto-Pantoja et al. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2015, 50(3), 212-230).

Термин «сродство связывания», используемый в настоящем описании, относится к константе диссоциации ( $K_D$ ) конкретного взаимодействия антиген-антитело.  $K_D$  представляет собой отношение скорости диссоциации ( $k_{off}$ ) к скорости ассоциации ( $k_{on}$ ). Следовательно,  $K_D$  равно  $k_{off}/k_{on}$  и выражается в виде молярной концентрации (M). Отсюда следует, что чем меньше значение  $K_D$ , тем сильнее сродство связывания. Как правило, значения  $K_D$  определяют методом поверхностного плазмонного резонанса



(SPR), обычно с помощью биосенсорной системы (например, Biacore®), используя методы, известные в данной области техники (например, ES Day et al. Anal. Biochem. 2013, 440, 96-107). Термин «средство связывания» также может относиться к концентрации антитела, которая обеспечивает половину максимально достижимого уровня связывания ( $EC_{50}$ ), определенного, например, с помощью анализа ELISA или с помощью проточной цитометрии.

Термин «специфическое связывание», используемый в настоящем описании, относится к связыванию антитела со своим антигеном с  $K_D$  обычно менее  $10^{-7}$  М, например  $10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М,  $10^{-10}$  М,  $10^{-11}$  М или даже менее, определенной методом SPR при 25°C.

Термин «низкое средство», используемый в настоящем описании, используется взаимозаменяемо с фразами «не связывает» или «не связывается» и относится к средству связывания между антителом и его антигеном со значением  $EC_{50}$ , превышающим 1500 нг/мл, определенным с помощью анализа ELISA, или к отсутствию обнаруживаемого специфического связывания между иммобилизованным антигеном и антителом согласно данным SPR.

Термин «высокое средство», используемый в настоящем описании, относится к средству связывания между антителом и его антигеном с  $K_D$  обычно менее  $10^{-10}$  М,  $10^{-11}$  М или даже менее, определенной методом SPR при 25°C.

В частности, настоящее изобретение относится к анти-SIRPα антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющие комплементарность области (CDR) переменных областей (VR) тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC), выбранные из группы, состоящей из:

a. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 1, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 2;

b. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 3, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 4;

c. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 6;

d. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 7, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 8;

e. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 9, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 10;

f. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 11, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 12;

g. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 13, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 14;

h. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 15, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 16; и

i. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 17, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 18,

причем CDR определены согласно нумерации Кабат.

5 Предпочтительно, настоящее изобретение относится к анти-SIRP $\alpha$  антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющие комплементарность области (CDR) переменных областей (VR) тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC), выбранные из группы, состоящей из:

a. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 3, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 4;

b. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 6;

15 c. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 7, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 8;

d. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 9, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 10;

e. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 11, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 12;

f. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 13, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 14;

g. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 15, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 16; и

30 h. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 17, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 18,

причем CDR определены согласно нумерации Кабат.

35 Более предпочтительно, настоящее изобретение относится к анти-SIRP $\alpha$  антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему CDR HCVR и LCVR, выбранные из группы, состоящей из:

a. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 3, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 4;

40 b. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 6;

c. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 7, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 8;

d. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 9, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 10; и

е. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 13, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 14,

причем CDR определены согласно нумерации Кабат.

5 Еще более предпочтительно, настоящее изобретение относится к анти-SIRP $\alpha$  антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему CDR HCVR и LCVR, выбранные из группы, состоящей из:

а. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных  
10 в SEQ ID NO: 6;

б. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 7, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 8; и

с. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 13, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных  
15 в SEQ ID NO: 14,

причем CDR определены согласно нумерации Кабат.

Наиболее предпочтительно, настоящее изобретение относится к анти-SIRP $\alpha$  антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему CDR HCVR и LCVR, выбранные  
20 из группы, состоящей из:

а. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 7, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 8; и

б. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 13, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных  
25 в SEQ ID NO: 14,

причем CDR определены согласно нумерации Кабат.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к определенному выше анти-SIRP $\alpha$  антителу или его антигенсвязывающему фрагменту,  
30 причем антитело демонстрирует специфическое связывание как с SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$ , так и с SIRP $\alpha_1$ , но не связывается с SIRP $\gamma$ .

В более предпочтительном варианте осуществления анти-SIRP $\alpha$  антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$  с  $K_D$  ниже  $10^{-9}$   
35 М и связывается с SIRP $\alpha_1$  с  $K_D$  ниже  $10^{-7}$  М, причем  $K_D$  измеряют методом SPR при 25°C. Предпочтительно, анти-SIRP $\alpha$  антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с SIRP $\alpha_1$  с  $K_D$  ниже  $10^{-8}$  М.

В другом предпочтительном варианте осуществления анти-SIRP $\alpha$  антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$  и SIRP $\alpha_1$  с  $K_D$   
40 ниже  $10^{-9}$  М, причем  $K_D$  измеряют методом SPR при 25°C.

В еще более предпочтительном варианте осуществления анти-SIRP $\alpha$  антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$  и SIRP $\alpha_1$  с  
45  $K_D$  ниже  $10^{-10}$  М. Предпочтительно, анти-SIRP $\alpha$  антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с SIRP $\alpha_{\text{ВГТ}}$  с  $K_D$  ниже  $10^{-10}$  М и с SIRP $\alpha_1$  с  $K_D$  ниже  $10^{-11}$  М. Как правило, анти-SIRP $\alpha$  антитело, определенное выше, представляет собой



Помимо связывания как с человеческим (hu)SIRP $\alpha$ <sub>ВТТ</sub>, так и человеческим (hu)SIRP $\alpha$ <sub>1</sub>, антитела по изобретению также могут связываться с (су)SIRP $\alpha$  яванского макака (су), что позволяет проводить исследования *in vivo* на соответствующей модели на животных.

Антитела по изобретению могут связываться с участком SIRP $\alpha$ , который отличается от CD47-связывающего участка, т.е. с аллостерическим участком, и подавлять передачу ингибирующих сигналов SIRP $\alpha$  без прямого вмешательства в физическое взаимодействие CD47-SIRP $\alpha$ . Альтернативно, антитела могут связываться с тем же участком, с которым связывается CD47, предотвращая лигирование SIRP $\alpha$  с помощью CD47 и, следовательно, ингибируя сигнальный каскад, который отрицательно регулирует зависимые от Fc-рецепторов функции иммунных эффекторных клеток

Анти-SIRP $\alpha$  антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные выше, являются более специфическими, чем известные анти-SIRP $\alpha$  антитела, и демонстрируют высокое сродство как по отношению к SIRP $\alpha$ <sub>ВТТ</sub>, так и по отношению к SIRP $\alpha$ <sub>1</sub>. К тому же, анти-SIRP $\alpha$  антитела по изобретению не связываются с SIRP $\gamma$ .

В одном конкретном варианте осуществления анти-SIRP $\alpha$  антитело по изобретению содержит Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках. Такое анти-SIRP $\alpha$  антитело является подходящим для монотерапии SIRP $\alpha$ -позитивных солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека, поскольку оно может индуцировать ADCC и/или ADCP. Человеческие иммунные эффекторные клетки имеют множество различных активирующих Fc-рецепторов, которые при лигировании запускают фагоцитоз, высвобождение цитокинов, ADCC и/или ADCP и т.д. Примерами этих рецепторов являются рецепторы Fc $\gamma$ , например Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RIIA (CD32), Fc $\gamma$ RIIA (CD16a), Fc $\gamma$ RIIB (CD16b), Fc $\gamma$ RIIC и Fc $\alpha$ -рецептор Fc $\alpha$ RI (CD89). Различные природные изоформы антител связываются с этими рецепторами. Например, IgG<sub>1</sub> связывается с Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB; IgG<sub>2</sub> связывается с Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIA; IgG<sub>3</sub> связывается с Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB; IgG<sub>4</sub> связывается с Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIA; и IgA связывается с Fc $\alpha$ RI.

В предпочтительном варианте осуществления анти-SIRP $\alpha$  антитело по изобретению содержит Fc-область изоформы IgA или IgG. Более предпочтительным является анти-SIRP $\alpha$  антитело, содержащее Fc-область изоформы IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> или IgG<sub>4</sub>; еще более предпочтительным изоформой является IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> или IgG<sub>4</sub>. Наиболее предпочтительным является анти-SIRP $\alpha$  антитело, содержащее Fc-область изоформы IgG<sub>1</sub>.

Хотя анти-SIRP $\alpha$  антитела, содержащие Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках, могут быть пригодными для лечения SIRP $\alpha$ -экспрессирующего рака, химерные анти-SIRP $\alpha$  антитела IgG<sub>1</sub> изоформы не показали ожидаемых результатов при тестировании *in vitro* в комбинации с другими антителами, которые содержат человеческую Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках (т.е. как антитела, которые способны индуцировать ADCC и/или ADCP). Результаты анализов ADCC *in vitro* показали, что химерное анти-SIRP $\alpha$  антитело IgG<sub>1</sub> изоформы не увеличивает ADCC такого другого антитела в той степени, как это ожидалось, исходя из более ранних результатов с использованием мышиных антител.

Следовательно, изобретение относится к анти-SIRP $\alpha$  антителам, которые демонстрируют пониженное связывание или низкое сродство к активирующим Fc-

рецепторам, присутствующим на человеческих иммунных эффекторных клетках. Такие анти-SIRP $\alpha$  антитела содержат модифицированную Fc-область, в которой одна или более аминокислот заменены другой аминокислотой(ами) по сравнению с аналогичной немодифицированной Fc-областью. Пониженное связывание означает, что сродство анти-SIRP $\alpha$  антитела, содержащего модифицированную Fc-область, к активирующим Fc-рецепторам ниже, чем сродство анти-SIRP $\alpha$  антитела с теми же вариabельными областями, содержащими аналогичную немодифицированную Fc-область. Сродство связывания антител к активирующим Fc-рецепторам обычно измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) или проточной цитометрией, используя способы, известные в данной области, например, описанные у Harrison et al. в J. Pharm. Biomed. Anal. 2012, 63, 23-28. Антитела, проявляющие пониженное связывание или низкое сродство к человеческому Fc $\alpha$ - или Fc $\gamma$ -рецептору в комбинации с терапевтическим антителом, являются особенно эффективными при клеточном разрушении раковых клеток за счет увеличения ADCC и/или ADCP эффекторных иммунных клеток. Как правило, Fc-область анти-SIRP $\alpha$  антитела по изобретению модифицируют для уменьшения связывания с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках.

Следовательно, анти-SIRP $\alpha$  антитело по изобретению содержит модифицированную Fc-область, которая проявляет пониженное связывание или низкое сродство к человеческому Fc $\alpha$ - или Fc $\gamma$ -рецептору. Например, связывание IgG<sub>1</sub> с рецептором Fc $\gamma$  может быть уменьшено путем замены одной или более аминокислот в IgG<sub>1</sub>, выбранных из группы, состоящей из L234, L235, G237, D265, D270, N297, A327, P328 и P329 (нумерация Eu); связывание IgG<sub>2</sub> может быть уменьшено путем введения, например, одной или более из следующих аминокислотных замен: V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S и P331S; или H268Q, V309L, A330S и P331S (нумерация аналогична нумерации Eu в IgG<sub>1</sub>) (Vafa et al. Methods 2014, 65, 114-126); связывание IgG<sub>3</sub> может быть уменьшено путем введения, например, аминокислотных замен L234A и L235A или аминокислотных замен L234A, L235A и P331S (Leoh et al. Mol. Immunol. 2015, 67, 407-415); и связывание IgG<sub>4</sub> может быть уменьшено путем введения, например, аминокислотных замен S228P, F234A и L235A (нумерация аналогична нумерации Eu в IgG<sub>1</sub>) (Parekh et al. mAbs 2012, 4(3), 310-318). Связывание IgA с рецептором Fc $\alpha$  может быть уменьшено путем введения, например, одной или более аминокислотных замен L257R, P440A, A442R, F443R и P440R (последовательная нумерация, Pleass et al. J. Biol. Chem. 1999, 271(33), 23508-23514).

Предпочтительно, анти-SIRP $\alpha$  антитело по изобретению содержит модифицированную Fc-область, которая имеет пониженное связывание или низкое сродство к человеческому рецептору Fc $\gamma$ . Более предпочтительно, модифицированная Fc-область представляет собой Fc-область изотипа IgG. Еще более предпочтительно, модифицированная Fc-область представляет собой Fc-область изотипа IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> или IgG<sub>4</sub>.

В предпочтительном варианте осуществления анти-SIRP $\alpha$  антитело по изобретению содержит модифицированную человеческую Fc-область IgG<sub>1</sub>, содержащую одну или более аминокислотных замен в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из: L234, L235, G237, D265, D270, N297, A327, P328 и P329 (нумерация Eu).

Предпочтительно, анти-SIRP $\alpha$  антитело содержит модифицированную Fc-область IgG<sub>1</sub>, которая не содержит ни аминокислотную замену N297A, ни N297G. Более предпочтительно, анти-SIRP $\alpha$  антитело содержит модифицированную Fc-область IgG<sub>1</sub>,

которая не содержит аминокислотную замену N297.

В одном из вариантов осуществления модифицированная человеческая Fc-область IgG<sub>1</sub> содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, D270A, D270E, D270N, N297A, N297G, A327Q, P328A, P329A и P329G. Предпочтительно, одну или более аминокислотных замен выбирают из группы, состоящей из L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, N297A, P328A, P329A и P329G.

В одном из вариантов осуществления модифицированная человеческая Fc-область IgG<sub>1</sub> содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, D270A, D270E, D270N, A327Q, P328A, P329A и P329G. Предпочтительно, одну или более аминокислотных замен выбирают из группы, состоящей из L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, P328A, P329A и P329G. Более предпочтительно, модифицированная Fc-область IgG<sub>1</sub> не содержит ни аминокислотную замену N297A, ни N297G. Еще более предпочтительно, модифицированная Fc-область IgG<sub>1</sub> не содержит аминокислотную замену в положении N297.

В предпочтительном варианте осуществления модифицированная человеческая Fc-область IgG<sub>1</sub> содержит аминокислотные замены L234A и L235A, L234E и L235A, L234A, L235A и P329A или L234A, L235A и P329G. Предпочтительно, модифицированная Fc-область IgG<sub>1</sub> не содержит ни аминокислотную замену N297A, ни N297G. Более предпочтительно, модифицированная Fc-область IgG<sub>1</sub> не содержит аминокислотную замену в положении N297.

В другом предпочтительном варианте осуществления анти-SIRPα антитело по изобретению содержит модифицированную человеческую Fc-область IgG<sub>1</sub>, содержащую аминокислотные замены L234A и L235A или L234E и L235A, предпочтительно аминокислотные замены L234A и L235A. Более предпочтительно, модифицированная Fc-область IgG<sub>1</sub> не содержит ни аминокислотную замену N297A, ни N297G. Еще более предпочтительно, модифицированная Fc-область IgG<sub>1</sub> не содержит аминокислотную замену в положении N297.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей анти-SIRPα антитело, описанное выше, и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов. Типичные фармацевтические составы терапевтических белков, таких как антитела, имеют форму лиофилизированной массы (лиофилизированных порошков), которые перед внутривенной инфузией должны быть растворены (в водной среде) (т.е. восстановлены), или форму замороженных (водных) растворов, которые перед использованием необходимо оттаять.

Как правило, фармацевтическая композиция предоставлена в форме лиофилизированной массы. Фармацевтически приемлемые эксципиенты, подходящие в соответствии с настоящим изобретением для включения в фармацевтическую композицию (перед сублимационной сушкой), включают буферные растворы (например, соли в воде, содержащие цитрат, гистидин или сукцинат), лиопротекторы (например, сахарозу, трегалозу), модификаторы тоничности (например, хлорид натрия), поверхностно-активные вещества (например, полисорбат) и формообразующие агенты (например, маннит, глицин). Эксципиенты, используемые для лиофилизированных белковых композиций, выбирают по их способности предотвращать денатурацию белка в процессе лиофилизации, а также во время хранения.

Настоящее изобретение также относится к анти-SIRP $\alpha$  антителу или фармацевтической композиции, как описано выше, для применения в качестве лекарственного средства.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к анти-SIRP $\alpha$  антителу или фармацевтической композиции, как описано выше, для применения при  
5 лечении солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека. Анти-SIRP $\alpha$  антитела по изобретению могут быть использованы для лечения солидных опухолей, таких как рак молочной железы, рак почки или меланомы, или гематологических злокачественных новообразований, таких как острый миелолейкоз (ОМЛ).

Во втором варианте осуществления изобретение относится к анти-SIRP $\alpha$  антителу, содержащему Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках, для использования при лечении SIRP $\alpha$ -позитивных солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека. Предпочтительно Fc-область, которая связывается с  
15 активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на эффекторных иммунных клетках человека, имеет изотип IgA или IgG. Более предпочтительным является анти-SIRP $\alpha$  антитело, содержащее Fc-область изотипа IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> или IgG<sub>4</sub>; изотип IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> или IgG<sub>4</sub> является еще более предпочтительным. Наиболее предпочтительным для  
20 применения при лечении SIRP $\alpha$ -позитивных солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека является анти-SIRP $\alpha$  антитело, содержащее Fc-область изотипа IgG<sub>1</sub>.

В третьем варианте осуществления настоящее изобретение относится к анти-SIRP $\alpha$  антителу или фармацевтической композиции, как описано выше, для применения при  
25 лечении солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека в комбинации с одним или более другими видами противораковой терапии. Подходящими видами противораковой терапии являются хирургия, химиотерапия, лучевая терапия, гормональная терапия, таргетная терапия и иммунотерапия. Анти-SIRP $\alpha$  антитело или фармацевтическую композицию, как описано выше, можно  
30 использовать для одновременного или последовательного применения при лечении солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека в сочетании с одним или более другими видами противораковой терапии. В частности, анти-SIRP $\alpha$  антитело или фармацевтическую композицию, как описано выше, можно использовать для лечения солидных опухолей и гематологических злокачественных  
35 новообразований у человека после использования одного или более других видов противораковой терапии.

Предпочтительно, настоящее изобретение относится к анти-SIRP $\alpha$  антителу или фармацевтической композиции, как описано выше, для применения при лечении  
40 солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека в комбинации с одним или более другими противораковыми терапевтическими средствами. В частности, анти-SIRP $\alpha$  антитело или фармацевтическую композицию, как описано выше, можно использовать для лечения солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека после применения одного или более других противораковых терапевтических средств.

Подходящие противораковые терапевтические средства включают химиотерапию, лучевую терапию, гормональную терапию, таргетную терапию и иммунотерапевтические агенты. Подходящие химиотерапевтические средства включают алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты, нитрозомочевины, тетразины и азиридины; анти-



метаболиты, такие как антифолаты, фторпиримидины, аналоги дезоксинуклеозидов и тиопурины; антимикротрубочковые агенты, такие как алкалоиды барвинка и таксаны; ингибиторы топоизомеразы I и II; и цитотоксические антибиотики, такие как антрациклины и блеомицины.

5 Подходящие средства лучевой терапии включают радиоизотопы, такие как  $^{131}\text{I}$ -метайодбензилгуанидин (MIBG),  $^{32}\text{P}$  в виде фосфата натрия, хлорид  $^{223}\text{Ra}$ , хлорид  $^{89}\text{Sr}$  и тетраметиленфосфонат диамина  $^{153}\text{Sm}$  (EDTMP).

10 Подходящие агенты для использования в качестве гормональной терапии включают ингибиторы синтеза гормонов, такие как ингибиторы ароматазы и аналоги GnRH; и антагонисты рецепторов гормонов, такие как селективные модуляторы рецепторов эстрогена и антиандрогены.

Терапевтические средства направленного действия - это терапевтические средства, которые влияют на специфические белки, участвующие в онкогенезе и пролиферации, и могут быть низкомолекулярными лекарственными средствами; белками, такими как

15 терапевтические антитела; пептидами и производными пептидов; или гибридами белка с малыми молекулами, такими как конъюгаты антитело-лекарственное средство. Примеры низкомолекулярных лекарственных средств направленного действия включают ингибиторы mTor, такие как эверолимус, темсиролимус и рапамицин; ингибиторы

20 киназы, такие как иматиниб, дазатиниб и нилотиниб; ингибиторы VEGF, такие как сорафениб и регорафениб; и ингибиторы EGFR/HER2, такие как gefitinib, lapatinib и эрлотиниб. Примеры терапевтических средств направленного действия на основе пептидов или производных пептидов включают ингибиторы протеасом, такие как бортезомиб и карфилзомиб.

25 Иммунотерапевтические агенты включают агенты, которые индуцируют, усиливают или подавляют иммунный ответ, такие как цитокины (IL-2 и IFN- $\alpha$ ); иммуномодулирующие препараты на основе имида, такие как талидомид, леналидомид и помалидомид; терапевтические противораковые вакцины, такие как талимоген лагерпарепвек; иммунотерапевтические агенты на основе клеток, такие как вакцины

30 на основе дендритных клетках, адоптивных T-клеток и модифицированных T-клеток с химерными рецепторами антигена); и терапевтические антитела, которые могут запускать ADCC/ADCP или CDC через свою Fc-область при связывании с мембраносвязанными лигандами на раковой клетке.

Предпочтительно, изобретение относится к анти-SIRP $\alpha$  антителу или

35 фармацевтической композиции, как описано выше, для применения при лечении солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека в комбинации с одним или более другими противораковыми терапевтическими средствами, причем противораковое терапевтическое средство является терапевтическим агентом направленного действия или иммунотерапевтическим агентом.

40 Предпочтительным терапевтическим агентом направленного действия в соответствии с изобретением является терапевтическое антитело или конъюгат антитело-лекарственное вещество (ADC). Наиболее предпочтительным терапевтическим агентом направленного действия является терапевтическое антитело.

Термин «терапевтическое антитело», используемый в настоящем описании, относится

45 к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, как определено выше, которое является подходящим для терапии человека. Антитела, подходящие для терапии человека, имеют достаточное качество, безопасны и эффективны для лечения конкретных заболеваний человека. Качество можно оценивать с помощью

установленных нормативов надлежащей практики; безопасность и эффективность, как правило, оценивают с помощью установленных нормативов регулирующих органов в сфере обращения лекарственных средств, например, Европейского агентства по лекарственным средствам (ЕМА) или Управления по контролю за качеством пищевых 5 продуктов и лекарственных препаратов США (FDA). Такие нормативы хорошо известны в данной области.

Предпочтительно терапевтическое антитело представляет собой антитело, одобренное регулирующим органом в сфере обращения лекарственных средств, таким как ЕМА или FDA. Для определения, одобрено ли какое-либо антитело, можно воспользоваться 10 онлайн-базой данных большинства регулирующих органов.

Термин «ADC», используемый в настоящем описании, относится к цитотоксическому лекарственному средству, конъюгированному посредством линкера с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, как определено выше. Как правило, 15 цитотоксические лекарственные вещества являются сильнодействующими, например, дуокармицин, калихеамицин, димер пирролобензодиазепина (ПБД), майтансиноид или производное ауристатина. Линкер может быть расщепляемым, например содержащим расщепляемый дипептид валин-цитруллин (vc) или валин-аланин (va), или нерасщепляемым, например сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилатом (SMCC).

Как правило, терапевтическое антитело для применения в комбинации с анти-SIRP $\alpha$  антителом по изобретению представляет собой моноспецифическое или биспецифическое антитело или фрагмент антитела, содержащий по меньшей мере одну HCVR и LCVR, 20 которая связывается с мишенью, выбранной из группы, состоящей из аннексина A1, B7H3, B7H4, CA6, CA9, CA15-3, CA19-9, CA27-29, CA125, CA242, CCR2, CCR5, CD2, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD47, CD56, CD70, CD74, CD79, CD115, CD123, CD138, CD203c, CD303, CD333, CEA, CEACAM, CLCA-1, CLL-1, c-MET, Cripto, CTLA-4, DLL3, EGFL, EGFR, EPCAM, Eph (например, EphA2 или EphB3), рецептора эндотелина B (ETBR), FAP, FcRL5 (CD307), FGF, FGFR (например, FGFR3), FOLR1, GCC, GPNMB, HER2, HMW-MAA, интегрин  $\alpha$  (например,  $\alpha v \beta 3$  и  $\alpha v \beta 5$ ), IGF1R, 25 TM4SF1 (или антигена L6), Lewis A-подобного углевода, Lewis X, Lewis Y, LIV1, мезотелина, MUC1, MUC16, NaPi2b, Nectin-4, PD-1, PD-L1, PSMA, PTK7, SLC44A4, STEAP-1, антигена 5T4 (или TPBG, гликопротеин трофобласта), TF (тканевого фактора), антигена Томсена-Фриденрейха (TF-Ag), Tag72, TNF, TNFR, TROP2, VEGF, VEGFR и VLA.

Предпочтительным является моноспецифическое терапевтическое антитело. Более предпочтительным является антитело к мембраносвязанной мишени на поверхности 35 опухолевых клеток.

Подходящие терапевтические антитела для применения в комбинации с анти-SIRP $\alpha$  антителом по изобретению включают алемтузумаб, бевацизумаб, цетуксимаб, 40 панитумумаб, ритуксимаб и трастузумаб.

Подходящие ADC для применения в комбинации с анти-SIRP $\alpha$  антителом по изобретению включают трастузумаб эмтанзин и брентуксимаб ведотин.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к анти-SIRP $\alpha$  антителу, описанному выше, для указанного выше применения в комбинации 45 с терапевтическим антителом к мембраносвязанной мишени на поверхности опухолевых клеток, которое содержит человеческую Fc-область, которая связывается с активирующим Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках.

Посредством связывания с этими активирующими Fc-рецепторами, описанными выше, терапевтическое антитело, содержащее человеческую Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках, может индуцировать ADCC и/или ADCP.

5 Терапевтические антитела человеческого изотипа IgG, IgE или IgA содержат человеческую Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках.

Предпочтительным терапевтическим антителом для применения по изобретению является терапевтическое антитело изотипа IgG или IgA. Более предпочтительным является терапевтическое антитело изотипа IgG, такое как антитела IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> и IgG<sub>4</sub>. Еще более предпочтительным является терапевтическое антитело изотипа IgG<sub>1</sub> или IgG<sub>2</sub>. Наиболее предпочтительным является терапевтическое антитело изотипа IgG<sub>1</sub>.

15 Предпочтительно, настоящее изобретение относится к гуманизованному анти-SIRPα антителу, содержащему CDR HCVR и LCVR, выбранные из группы, состоящей из:

а. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 1, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 2;

20 б. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 3, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 4;

25 в. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 6;

д. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 7, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 8;

30 е. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 9, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 10;

35 ф. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 11, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 12;

г. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 13, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 14;

40 х. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 15, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 16; и

и. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 17, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 18

45 для применения при лечении солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека в комбинации с применением терапевтического антитела к мембраносвязанной мишени на поверхности опухолевых клеток, которое содержит человеческую Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами,

присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках, причем анти-SIRP $\alpha$  антитело содержит модифицированную Fc-область, которая имеет пониженное связывание с человеческим рецептором Fc $\alpha$  или Fc $\gamma$  по сравнению с тем же анти-SIRP $\alpha$  антителом, содержащим Fc-область дикого типа.

5 В предпочтительном варианте осуществления гуманизированное анти-SIRP $\alpha$  антитело для применения при лечении солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека в комбинации с терапевтическим антителом содержит модифицированную человеческую Fc-область IgG<sub>1</sub>, содержащую одну или более  
10 аминокислотных замен в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из: L234, L235, G237, D265, D270, N297, A327, P328 и P329 (нумерация Eu).

Предпочтительно гуманизированное анти-SIRP $\alpha$  антитело для применения при лечении солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека в комбинации с терапевтическим антителом содержит модифицированную область Fc IgG<sub>1</sub>, которая не содержит аминокислотной замены ни N297A, ни N297G.

15 Более предпочтительно, анти-SIRP $\alpha$  антитело содержит модифицированную Fc-область IgG<sub>1</sub>, которая не содержит аминокислотную замену N297.

В одном из вариантов осуществления модифицированная человеческая Fc-область IgG<sub>1</sub> содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей  
20 из L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, D270A, D270E, D270N, N297A, N297G, A327Q, P328A, P329A и P329G.

В другом варианте осуществления гуманизированное анти-SIRP $\alpha$  антитело для применения при лечении солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека в комбинации с терапевтическим антителом содержит  
25 модифицированную Fc-область IgG<sub>1</sub>, содержащую одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, D270A, D270E, D270N, A327Q, P328A, P329A и P329G. Предпочтительно, одну или более аминокислотных замен выбирают из группы, состоящей из L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, P328A, P329A и P329G. Более предпочтительно,  
30 модифицированная Fc-область IgG<sub>1</sub> не содержит ни аминокислотную замену N297A, ни N297G. Еще более предпочтительно, модифицированная Fc-область IgG<sub>1</sub> не содержит аминокислотную замену в положении N297.

В предпочтительном варианте осуществления модифицированная человеческая Fc-область IgG<sub>1</sub> содержит аминокислотные замены L234A и L235A, L234E и L235A, L234A,  
35 L235A и P329A или L234A, L235A и P329G. Более предпочтительно, модифицированная Fc-область IgG<sub>1</sub> не содержит ни аминокислотную замену N297A, ни N297G. Еще более предпочтительно, модифицированная Fc-область IgG<sub>1</sub> не содержит аминокислотную замену в положении N297.

40 В другом предпочтительном варианте осуществления гуманизированное анти-SIRP $\alpha$  антитело для применения при лечении солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека в комбинации с терапевтическим антителом содержит модифицированную человеческую Fc-область IgG<sub>1</sub>, содержащую  
45 аминокислотные замены L234A и L235A или L234E и L235A, предпочтительно аминокислотные замены L234A и L235A. Более предпочтительно, модифицированная Fc-область IgG<sub>1</sub> не содержит ни аминокислотную замену N297A, ни N297G. Еще более предпочтительно, модифицированная Fc-область IgG<sub>1</sub> не содержит аминокислотную

замену в положении N297.

В предпочтительном варианте осуществления гуманизованное анти-SIRP $\alpha$  антитело для применения при лечении солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований у человека в комбинации с использованием терапевтического антитела к мембраносвязанной мишени на поверхности опухолевых клеток, которое содержит человеческую Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках, включает Fc-область, содержащую аминокислотные замены L234A и L235A, а также CDR HCVR и LCVR, выбранные из группы, состоящей из:

- а. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 3, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 4;
- б. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 6;
- в. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 7, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 8;
- г. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 9, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 10; и
- д. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 13, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 14.

Во втором предпочтительном варианте осуществления гуманизованное анти-SIRP $\alpha$  антитело для использования, как определено выше, содержит Fc-область, содержащую аминокислотные замены L234A и L235A, а также CDR HCVR и LCVR, выбранные из группы, состоящей из:

- а. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 6;
- б. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 7, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 8; и
- в. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 13, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 14.

В третьем предпочтительном варианте осуществления гуманизованное анти-SIRP $\alpha$  антитело для использования, как определено выше, содержит Fc-область, содержащую аминокислотные замены L234A и L235A, а также CDR HCVR и LCVR, выбранные из группы, состоящей из:

- а. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 7, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 8; и
- б. аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 13, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 14.

В четвертом предпочтительном варианте осуществления гуманизованное анти-

SIRP $\alpha$  антитело для использования, как определено выше, содержит Fc-область, содержащую аминокислотные замены L234A и L235A, и

а. аминокислотную последовательность HCVR, приведенную в SEQ ID NO: 30, и аминокислотную последовательность LCVR, приведенную в SEQ ID NO: 31;

5 б. аминокислотную последовательность HCVR, приведенную в SEQ ID NO: 32, и аминокислотную последовательность LCVR, приведенную в SEQ ID NO: 33;

с. аминокислотную последовательность HCVR, приведенную в SEQ ID NO: 34, и аминокислотную последовательность LCVR, приведенную в SEQ ID NO: 8;

10 d. аминокислотную последовательность HCVR, приведенную в SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность LCVR, приведенную в SEQ ID NO: 36;

е. аминокислотную последовательность HCVR, приведенную в SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность LCVR, приведенную в SEQ ID NO: 37;

f. аминокислотную последовательность HCVR, приведенную в SEQ ID NO: 13, и аминокислотную последовательность LCVR, приведенную в SEQ ID NO: 38; или

15 g. аминокислотную последовательность HCVR, приведенную в SEQ ID NO: 13, и аминокислотную последовательность LCVR, приведенную в SEQ ID NO: 37.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления гуманизованное анти-SIRP $\alpha$  антитело для использования, как определено выше, содержит Fc-область, содержащую аминокислотные замены L234A и L235A и аминокислотную

20 последовательность HCVR SEQ ID NO: 30 и аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO: 31. Более предпочтительно, модифицированная Fc-область IgG<sub>1</sub> не содержит ни аминокислотную замену N297A, ни N297G. Еще более предпочтительно, модифицированная Fc-область IgG<sub>1</sub> не содержит аминокислотную замену в положении N297.

25 В другом предпочтительном варианте осуществления гуманизованное анти-SIRP $\alpha$  антитело для использования, как определено выше, содержит Fc-область, содержащую аминокислотные замены L234A и L235A и аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO: 33.

30 В другом предпочтительном варианте осуществления гуманизованное анти-SIRP $\alpha$  антитело для использования, как определено выше, содержит Fc-область, содержащую аминокислотные замены L234A и L235A и аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID NO: 34 и аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO: 8.

35 В другом предпочтительном варианте осуществления гуманизованное анти-SIRP $\alpha$  антитело для использования, как определено выше, содержит Fc-область, содержащую аминокислотные замены L234A и L235A и аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID NO: 35 и аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO: 36.

40 В другом предпочтительном варианте осуществления гуманизованное анти-SIRP $\alpha$  антитело для использования, как определено выше, содержит Fc-область, содержащую аминокислотные замены L234A и L235A и аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID NO: 35 и аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO: 37.

45 В другом предпочтительном варианте осуществления гуманизованное анти-SIRP $\alpha$  антитело для использования, как определено выше, содержит Fc-область, содержащую аминокислотные замены L234A и L235A и аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID NO: 13 и аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO: 38.

В другом предпочтительном варианте осуществления гуманизованное анти-SIRP $\alpha$  антитело для использования, как определено выше, содержит Fc-область, содержащую аминокислотные замены L234A и L235A и аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID NO: 13 и аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO: 37.

Более предпочтительно, определенные выше гуманизированные анти-SIRP $\alpha$  антитела для использования, как определено выше, содержат Fc-область, содержащую аминокислотные замены L234A и L235A, причем модифицированная Fc-область IgG<sub>1</sub> не содержит аминокислотную замену ни N297A, ни N297G. Еще более предпочтительно, модифицированная Fc-область IgG<sub>1</sub> не содержит аминокислотную замену в положении N297.

Анти-SIRP $\alpha$  антитела, содержащие модифицированную Fc-область, которая демонстрирует пониженное связывание с человеческим рецептором Fc $\alpha$  или Fc $\gamma$  по сравнению с тем же анти-SIRP $\alpha$  антителом, содержащим Fc-область дикого типа, как описано выше, усиливают ADCC *in vitro* терапевтического антитела при использовании нейтрофилов в качестве эффекторных клеток от разных доноров, гомозиготных по SIRP $\alpha$ <sub>ВГТ</sub> или SIRP $\alpha$ <sub>1</sub>. Все эти антитела усиливают ADCC *in vitro* при использовании нейтрофилов большинства доноров, а предпочтительные антитела даже усиливают ADCC *in vitro* при использовании нейтрофилов, полученных от любого донора.

## ПРИМЕРЫ

### Протокол иммунизации и отбора

Кроликов повторно иммунизировали смесью пептидов, представляющих область внеклеточного домена человеческого (hu)SIRP $\alpha$ <sub>ВГТ</sub>, человеческого (hu)SIRP $\alpha$ <sub>1</sub> и (су)SIRP $\alpha$  яванского макака (су). Забор крови осуществляли в разные моменты времени, которую обогащали лимфоцитами. Одиночные В-клетки помещали в отдельные лунки микротитровальных планшетов. Эти В-клетки культивировали в течение нескольких дней в присутствии кондиционированной среды и питающих клеток. В течение этого времени клетки продуцировали и высвобождали моноклональные антитела в среду культивирования (супернатанты В-клеток). Супернатанты этих отдельных В-клеток анализировали на продуцирование IgG; затем определяли специфическое связывание huSIRP $\alpha$ <sub>ВГТ</sub> и huSIRP $\alpha$ <sub>1</sub>, и суSIRP $\alpha$  с анти-Fc антителом. Подходящими супернатантами были те, которые связывались с обоими huSIRP $\alpha$ <sub>ВГТ</sub> и huSIRP $\alpha$ <sub>1</sub> и с суSIRP $\alpha$ . После этапа отбора по лункам измеряли связывание с мышинным (mu)SIRP $\alpha$  и huSIRP $\beta$ <sub>1V1</sub>, huSIRP $\beta$ <sub>1V2</sub> и huSIRP $\gamma$  (в качестве анти-мишеней). Кроме того, определяли связывание с клетками СНО с повышенным уровнем экспрессии SIRP $\alpha$ <sub>ВГТ</sub> и SIRP $\alpha$ <sub>1</sub>. Связывание с родительскими клетками СНО использовали в анализе в качестве контроля.

Подходящие лизаты В-клеток отбирали для выделения РНК, обратной транскрипции и секвенирования. Уникальные вариабельные области легкой и тяжелой цепей антитела синтезировали и клонировали перед последовательностью константной области антитела (каппа LC с SEQ ID NO: 26 и человеческая HC-LALA IgG<sub>1</sub> в формате SEQ ID NO: 27), соответственно.

Клетки НЕК 293 временно трансфицировали плазмидой, содержащей последовательность антитела, с использованием автоматизированной процедуры на платформе Tecan Freedom Evo. Иммуноглобулины очищали от клеточного супернатанта с помощью аффинной очистки (белок А) в системе ВЭЖХ Dionex Ultimate 3000 с автоматическим забором проб из планшета. Полученные антитела тестировали в анализах типа ELISA (ELISA: huSIRP $\alpha$ <sub>1</sub>, huSIRP $\alpha$ <sub>ВГТ</sub>, суSIRP $\alpha$ , muSIRP $\alpha$ , huSIRP $\beta$ <sub>1V1</sub>/ $\beta$ <sub>1V2</sub>/ $\gamma$ ; анализы связывания клеток: huSIRP $\alpha$ <sub>1</sub>, huSIRP $\alpha$ <sub>ВГТ</sub>).

### Временная экспрессия антител

#### а) Получение конструкций кДНК и векторов экспрессии

К каждой аминокислотной последовательности HCVR антител на N-конце

присоединяли лидерную последовательность (SEQ ID NO: 28 для антител 1-9, 15, 16; SEQ ID NO: 39 для антител 10-14), а на С-конце присоединяли константный домен человеческого LALA HC IgG<sub>1</sub> с SEQ ID NO: 27. К каждой из аминокислотных последовательностей HCVR антител 12C4huIgG<sub>1</sub>LALA, 12C4huIgG<sub>1</sub> и 29AM4-5huIgG<sub>1</sub>LALA на N-конце присоединяли лидерную последовательность HAVT20 (SEQ ID NO: 29), а на С-конце присоединяли константный домен человеческой LALA HC IgG<sub>1</sub> с SEQ ID NO: 27 или человеческую HC IgG<sub>1</sub> дикого типа (SEQ ID NO: 25). Полученные химерные аминокислотные последовательности подвергали обратной трансляции в последовательность кДНК, оптимизированную по кодонам, для экспрессии в человеческих клетках (*Homo sapiens*). Аналогичным образом получали химерную последовательность кДНК для LC данной конструкции путем присоединения лидерной последовательности (SEQ ID NO:28 для антител 1-9, 12; SEQ ID NO:40 для антител 10, 11, 13-16, SEQ ID NO:29 для 12C4huIgG<sub>1</sub>LALA, 12C4huIgG<sub>1</sub> и 29AM4-5huIgG<sub>1</sub>LALA) к последовательностям LCVR антител 1-16, 12C4huIgG<sub>1</sub>LALA и 12C4huIgG<sub>1</sub>, и 29AM4-5huIgG<sub>1</sub>LALA на N-конце, а на С-конце присоединяли константную область легкой цепи человеческого IgG (SEQ ID NO: 26). Последовательности HCVR и LCVR использовали в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1. Последовательности HCVR и LCVR антител и эталонных антител

Антитело	HCVR	LCVR
1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2
2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4
3	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
4	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8
5	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10
6	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
7	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14
8	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:16
9	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
29AM4-5huIgG <sub>1</sub> LALA	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20
12C4huIgG <sub>1</sub> LALA	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22
12C4huIgG <sub>1</sub>	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22
KWAR23	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24
10 гуманизированное	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31
11 гуманизированное	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33
12 гуманизированное	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:8
13 гуманизированное	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:36
14 гуманизированное	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:37
15 гуманизированное	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:38
16 гуманизированное	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:37

#### б) векторная конструкция и стратегия клонирования

Для экспрессии цепей антител использовали вектор экспрессии млекопитающих, который содержал экспрессионную кассету CMV:BGHrA. Конечные векторы, содержащие экспрессионную кассету либо HC, либо LC (CMV:HC:BGHrA и CMV:LC-BGHrA, соответственно), трансфицировали и размножали в клетках NEB 5-альфа *E.coli*. Крупномасштабное производство конечных векторов экспрессии для трансфекции осуществляли с помощью наборов Maxi- или Megaprep (Qiagen).

#### с) Временная экспрессия в клетках млекопитающих

Коммерчески доступные клетки Expi293F (Thermo Fisher) трансфицировали векторами



экспрессии с использованием агента для трансфекции ExpiFectamine в соответствии с инструкциями производителя следующим образом:  $75 \times 10^7$  клеток высевали в 300 мл среды FortiCHO, 300 мкг вектора экспрессии объединяли с 800 мкл агента для трансфекции ExpiFectamine и добавляли в клетки. Через день после трансфекции к культуре добавляли 1,5 мл Enhancer 1 и 15 мл Enhancer 2. Через шесть дней после трансфекции супернатант клеточной культуры собирали центрифугированием при 4000 g в течение 15 минут и фильтровали осветленный сбор через фильтры PES bottle/MF 75 (Nalgene).

Связывание антител и специфичность

Эксперимент

ELISA-анализ: Каждый из растворов huSIRP $\alpha_1$ , huSIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$ , huSIRP $\beta_{1\text{V}1}$ , huSIRP $\beta_{1\text{V}2}$ , huSIRP $\gamma$  и cySIRP $\alpha$  в фосфатно-солевом буфере (PBS) добавляли в многолуночный черный полистирольный планшет для ELISA и оставляли на 1 час при комнатной температуре для осуществления адгезии. Несвязанный белок удаляли трехэтапной промывкой стандартным промывочным буфером. Затем в лунки добавляли блокирующий буфер. Через 1 ч инкубации при комнатной температуре лунки промывали три раза стандартным промывочным буфером. В лунки добавляли антитела в буфере в различных концентрациях и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Несвязанные антитела удаляли с помощью трехэтапной промывки стандартным промывочным буфером. Козий античеловеческий (Fab') $_2$  IgG, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP), в буфере добавляли в лунки и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Добавляли 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и после развития окраски достаточной интенсивности добавляли HCl. Поглощение считывали при 450 нм/620 нм.

Анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR): Анализ средства выполняли с помощью одноциклического кинетического анализа на приборе для поверхностного плазмонного резонанса (Biacore T200 system, GE Life Sciences) при 25°C.

Биотинилированные антигены SIRP иммобилизовали на поверхность чипа, подходящего для биотинилированных молекул (Sensor Chip CAP, GE Life Sciences) путем инъектирования 5 мкг/мл антигена SIRP в рабочем буфере (10 mM буфера HEPES при pH 7,4 с 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,005% об./об. полиоксиэтилен (20) сорбитанмонолаурата (сурфактант P20)) в течение 60 сек со скоростью 10 мкл/мин после инъектирования стрептавидинового конъюгата (20-кратный разбавленный реагент биотин-CApTure, GE Life Sciences) в течение 60 сек со скоростью 10 мкл/мин.

Стабилизацию базовой линии устанавливали на 1 мин, после чего инъектировали пять увеличивающихся концентраций анти-SIRP антитела в рабочем буфере (10 mM буфера HEPES при pH 7,4 с 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,005% об./об. полиоксиэтилен (20) сорбитанмонолаурата). Для каждого этапа использовали время ассоциации 150 секунд, а затем время диссоциации 1200 секунд только при самой высокой концентрации, все реакции выполняли при скорости потока 30 мкл/мин. Регенерацию осуществляли с помощью раствора, содержащего 6 M гуанидин-HCl, 0,25 M NaOH (60 сек при скорости потока 30 мкл/мин). Вычитание двойной холостой пробы выполняли на наблюдаемых сенсограммах, используя канал с потоком неиммобилизованного референсного анти-SIRP (холостая проба) и введением подвижного буфера. Сенсограммы подгоняли к модели Ленгмюра 1:1 для всех протестированных анти-SIRP антител. Кинетические параметры ( $k_a$ ,  $k_d$  и KD) вычисляли с помощью программного обеспечения Biacore T200 (v3.1).

**Проточная цитометрия:** Клетки U937, эндогенно экспрессирующие человеческий антиген SIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$ , и клетки, полученные из несконструированного субклона, который был подвергнут скринингу и выделен из клеток яичника китайского хомячка CHO-S (ExpriCHO-S), экспрессирующих антиген человеческого SIRP $\alpha_1$ , SIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$  или cySIRP $\alpha$  (100000 клеток/лунку в 96-луночный планшет) трижды промывали охлажденным на льду буфером FACS (1xPBS (LONZA), содержащим 0,2% мас./об. BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) и 0,02% мас./об. NaN<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich), с последующим добавлением каждого первичного mAb (50 мкл/лунку), разведенного в ледяном буфере FACS, в диапазоне концентраций. После инкубации в течение 30 мин при 4°C клетки трижды промывали охлажденным на льду буфером FACS и добавляли 50 мкл/лунку вторичного mAb (AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент антимышиного человеческого IgG-APC, разбавление 1:6000, Jackson Immuno Research). Через 30 мин при 4°C клетки дважды промывали и ресуспендировали в 150 мкл буфера FACS. Интенсивности флуоресценции определяли с помощью проточной цитометрии (BD FACSVerser, Franklin Lakes, NJ) и указывали в виде медианной интенсивности флуоресценции (MFI-Median) для клеток U937 и клеток ExpriCHO-S. Кривые подгоняли с помощью нелинейного регрессионного анализа, используя сигмоидальное уравнение доза-ответ с разным наклоном (четыре параметра) в GraphPad Prism (версия 7.02 для Windows, GraphPad, San Diego, CA). Значения EC<sub>50</sub> вычисляли в виде концентрации в мкг/мл, которая дает половинный ответ между нижней и верхней частями кривой при подгонке к 4-параметрической логистической кривой.

#### Результаты

**Анализ ELISA:** Значения EC<sub>50</sub> для связывания с huSIRP $\alpha_1$ , huSIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$ , huSIRP $\beta_1$ , huSIRP $\beta_{1\text{V}2}$ , huSIRP $\gamma$ , cySIRP $\alpha$ , полученные методом ELISA для антител 1-9 и эталонных антител, суммированы в таблице 2. Все антитела связываются с huSIRP $\alpha_1$  и huSIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$ . Антитела 29AM4-5huIgG<sub>1</sub>LALA и 12C4huIgG<sub>1</sub>LALA связываются с huSIRP $\beta_{1\text{V}1}$ , huSIRP $\beta_{1\text{V}2}$  и huSIRP $\gamma$ . Антитела 2-6, 8 и 9 демонстрируют низкое сродство к huSIRP $\beta_{1\text{V}1}$  и к huSIRP $\gamma$ . Антитело 7 связывается с huSIRP $\beta_{1\text{V}1}$ , но имеет низкое сродство к huSIRP $\beta_{1\text{V}2}$  и huSIRP $\gamma$ . Антитело 1 связывается с huSIRP $\beta_{1\text{V}2}$  и huSIRP $\gamma$ .

Таблица 2. Специфичность анти-SIRP $\alpha$  антител и эталонных антител

Антитело	huSIRP $\alpha_1$ EC <sub>50</sub> (нг/мл)	huSIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$ EC <sub>50</sub> (нг/мл)	huSIRP $\beta_{1\text{V}1}$ EC <sub>50</sub> (нг/мл)	huSIRP $\beta_{1\text{V}2}$ EC <sub>50</sub> (нг/мл)	huSIRP $\gamma$ EC <sub>50</sub> (нг/мл)	cySIRP $\alpha$ EC <sub>50</sub> (нг/мл)
1	39	21	100000	58	43	305
2	33	27	100000	28	100000	38
3	15	24	100000	89	5216	36
4	53	25	100000	92	100000	99
5	31	21	3518	110	100000	123
6	21	20	100000	24	100000	33
7	23	20	14	100000	100000	335
8	19	20	100000	19	100000	26
9	23	26	100000	47	100000	30
29AM4-5*	9	9	13	17	34	11
12C4*	7	5	8	6	6	5

\*huIgG<sub>1</sub>LALA

Значения EC<sub>50</sub> > 100000 указаны как 100000.

**Анализ SPR:** Значения K<sub>D</sub> для связывания антител 4, 7, 10-14 с huSIRP $\alpha_1$ , huSIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$

и huSIRP $\gamma$  в сравнении с эталонными антителами KWAR23, huIgG<sub>1</sub>12C4LALA и SE5A5 (приобретенными у коммерческого поставщика) суммированы в таблице 3. Антитела 4, 7, 10-14 связываются как с huSIRP $\alpha_1$ , так и с huSIRP $\alpha_{BIT}$  и не связываются с huSIRP $\gamma$ .  
 5 Все эталонные антитела связываются с huSIRP $\gamma$ .

Таблица 3. Данные SPR (кД в М)

Антитело	K <sub>D</sub> (huSIRP $\alpha_{BIT}$ )	K <sub>D</sub> (huSIRP $\alpha_1$ )	K <sub>D</sub> (huSIRP $\gamma$ )
KWAR23 мышинового IgG2a	<1,0E-11 <sup>1</sup>	<1,0E-11	<1,0E-11
KWAR23 huIgG <sub>1</sub> LALA	<1,0E-11 <sup>1</sup>	1,1E-11	<1,0E-11
12C4huIgG <sub>1</sub> LALA	1,5E-11	8,7E-11	1,6E-11
SE5A5	2,6E-9	2,2E-9	4,9E-8
4	<1,0E-11	2,6E-11	N <sup>2</sup>
7	<1,0E-11	<1,0E-11	N
10 гуманизованное	<1,0E-11	3,2E-9	N
11 гуманизованное	1,4E-10	4,1E-8	N
12 гуманизованное	<1,0E-11	5,9E-11	N
13 гуманизованное	1,2E-11	<1,0E-11	N
14 гуманизованное	8,9E-11	<1,0E-11	N

<sup>1</sup><1,0E-11: K<sub>D</sub> находится за пределами диапазона, что означает высокое сродство.

<sup>2</sup> N: Специфическое связывание не обнаружено

Проточная цитометрия: Связывание различных антител с huSIRP $\alpha_1$ , huSIRP $\alpha_{BIT}$  и/или суSIRP $\alpha$ , экспрессируемых клетками, определяли проточной цитометрией. Связывание указано в значениях EC<sub>50</sub>, которые приведены в таблице 4. Антитела 2, 4, 5, 7, 8, 10-14 связываются с huSIRP $\alpha_1$ , huSIRP $\alpha_{BIT}$  и суSIRP $\alpha$ . Антитела 2, 4, 5, 7, 8, 10-14 связываются с суSIRP $\alpha$  в диапазоне низких значений, выраженных в мкг/мл.

Таблица 4. Данные проточной цитометрии

Антитело	Клетки U937 (SIRP $\alpha_{BIT}$ ) EC <sub>50</sub> (мкг/мл)	ExpriCHO-S (huSIRP $\alpha_1$ ) EC <sub>50</sub> (мкг/мл)	ExpriCHO-S (huSIRP $\alpha_{BIT}$ ) EC <sub>50</sub> (мкг/мл)	ExpriCHO-S (суSIRP $\alpha$ ) EC <sub>50</sub> (мкг/мл)
1	–	–	–	–
2	0,14	0,19	0,27	0,16
3	0,22	–	–	–
4	0,12	0,41	0,23	0,18
5	0,16	0,27	0,22	0,26
6	–	–	–	–
7	0,17	0,23	0,21	0,07
8	0,12	0,22	0,18	0,15
9	0,11	–	–	–
29AM4-5 huIgG <sub>1</sub> LALA	0,25	–	–	–
12C4huIgG <sub>1</sub> LALA	0,19	–	–	–
KWAR23 huIgG <sub>1</sub> LALA	0,09	–	–	–
10	0,17	0,38	0,2	0,27
11	0,13	1,05	0,3	0,32
12	0,2	0,1	0,46	0,17
13	0,14	0,36	0,23	0,44
14	0,22	0,37	0,29	0,38
15	0,16	–	–	–
16	0,23	–	–	–

«-» - значение не определено

Блокирование антителами связыванием CD47-SIRP $\alpha$

*Эксперимент*

Клетки CHO, трансфицированные либо SIRP $\alpha_1$ , либо SIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$ , либо родительские  
 5 клетки CHO, использованные в качестве контроля, высевали в 20 мкл клеточной среды в лунки с прозрачным дном и инкубировали в течение ночи. Антитела 1-9, референсные антитела 29AM4-5huIgG $_1$ LALA или 12C4huIgG $_1$ LALA вместе со смесью His tag® CD47 и анти-His tag® антитела для детектирования флуоресценции добавляли в лунки и  
 10 инкубировали в течение 2 часов. После инкубации клетки промывали буфером для промывки клеток. Флуоресценцию определяли с помощью системы для скрининга (CellInsight®, Thermo Scientific®) и определяли общую флуоресценцию на лунку.

*Результаты*

Антитела 29AM4-5huIgG $_1$ LALA, 12C4huIgG $_1$ LALA, 3 и 7 полностью блокируют  
 15 связывание CD47 как с клетками CHO, экспрессирующими huSIRP $\alpha_1$ , так и клетками CHO, экспрессирующими huSIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$ , антитела 1, 2, 4-6, 8 и 9 не блокируют связывание CD47 ни с клетками CHO, экспрессирующими huSIRP $\alpha_1$ , ни с клетками CHO, экспрессирующим huSIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$ .

*Анализ ADCC*

Нейтрофилы доноров, гомозиготных по SIRP $\alpha_1$  или SIRP $\alpha_{\text{ВIT}}$ , выделяли и  
 20 культивировали в соответствии с методом, описанным в Chao et al. PNAS 2011, 108(45), 18342-18347. ADCC определяли с помощью анализа высвобождения  $^{51}\text{Cr}$  или анализа цитотоксичности с помощью комплекса нерадиоактивный европий-TDA (EuTDA)  
 25 (DELFIА, PerkinElmer). Клетки SKBR3 использовали в качестве клеток-мишеней и метили 100 мкКи  $^{51}\text{Cr}$  (Perkin-Elmer) в течение 90 мин при 37°C или бис(ацетоксиметил)2,2':6',2"-терпиридин-6,6"-дикарбоксилатом (реагент BATDA Delfia) в течение 5 мин при 37°C.  
 После 2 промывок PBS  $5 \times 10^3$  клеток-мишеней на лунку инкубировали в культуральной  
 30 среде IMDM с добавлением 10% (об./об.) фетальной сыворотки теленка (FCS) в течение 4 часов при 37°C и 5% CO $_2$  в 96-луночном планшете с U-дном вместе с нейтрофилами в отношении эффектора к клетке-мишени 50:1 в присутствии соответствующих антител. После инкубации супернатант собирали и анализировали на радиоактивность в гамма-счетчике (Wallac) или добавляли к раствору европия (DELFIА, PerkinElmer) и определяли  
 35 флуоресценцию комплекса европий-2,2':6',2"-терпиридин-6,6"-дикарбоновая кислота (EuTDA) с помощью спектрофлуориметра (Envision, PerkinElmer). Процент цитотоксичности вычисляли следующим образом: [(высвобождение в эксперименте - спонтанное высвобождение)/(общее высвобождение - спонтанное высвобождение)]  
 x100%. Все условия измеряли в двух и/или в трех экземплярах.

40 *Данные ADCC для 12C4huIgG $_1$ LALA относительно 12C4IgG $_1$*

На фиг. 1 показаны результаты анализа ADCC в виде цитотоксичности, выраженной в %. % цитотоксичности, измеренный для клеток SKBR3 с помощью нейтрофилов в качестве эффекторных клеток и одного трастузумаба, был меньше, чем %  
 цитотоксичности трастузумаба в комбинации с мышинным антителом 12C4 ( $\mu$ 12C4).  
 45 Трастузумаб в комбинации с антителом, в котором переменные области 12C4 привиты на константную область человеческого IgG $_1$  (12C4huIgG $_1$ ), имеет аналогичный % цитотоксичности по сравнению с одним только трастузумабом при низких концентрациях 12C4huIgG $_1$ . При более высоких концентрациях 12C4huIgG $_1$  наблюдается

снижение % цитотоксичности. Трастузумаб в комбинации с антителом, в котором  
 5 варьируемые области 12C4 привиты на константную область человеческого IgG<sub>1</sub>,  
 содержащую аминокислотные замены L234A и L235A (12C4huIgG<sub>1</sub>LALA), демонстрируют  
 10 повышенный % цитотоксичности по сравнению с % цитотоксичности одного  
 трастузумаба и повышенный % цитотоксичности по сравнению с комбинацией  
 12C4huIgG<sub>1</sub> с трастузумабом.

#### *Данные ADCC*

На фиг. 2 приведено сравнение % ADCC с использованием человеческих нейтрофилов,  
 10 относительно трастузумаба (установлен на 100%), в присутствии антитела 1-9, имеющего  
 константную область человеческого IgG<sub>1</sub>, содержащую аминокислотные замены L234A  
 и L235A (LALA), в комбинации с трастузумабом, по сравнению с 12C4huIgG<sub>1</sub>LALA.  
 В6H12IgG<sub>1</sub>LALA, имеющий VR мышинового анти-CD47 антитела и константную область  
 15 человеческого IgG<sub>1</sub>, содержащую аминокислотные замены L234A и L235A, и несущую  
 среду (без трастузумаба), использовали в качестве положительного и отрицательного  
 контроля, соответственно. Залитые квадраты, (■), являются значениями, измеренными  
 с помощью нейтрофилов от доноров, имеющих вариант SIRP<sub>α</sub>ВГТ (гомозиготных по  
 SIRP<sub>α</sub>ВГТ), незалитые круги, (○), являются значениями, измеренными с нейтрофилами  
 20 от доноров, имеющих вариант SIRP<sub>α</sub>1 (гомозиготных по SIRP<sub>α</sub>1). Для всех антител  
 среднее значение ADCC было выше по сравнению с таковым для одного трастузумаба.  
 Для антител 1, 2, 4, 5, 7 и 8 среднее увеличение ADCC было даже больше, чем увеличение  
 ADCC, вызванное 12C4huIgG<sub>1</sub>LALA. При сравнении увеличения ADCC у каждого донора  
 25 на каждое антитело, антитела 1, 3-6, 8 и 9 показали более низкое изменение в %  
 увеличения ADCC, чем 12C4huIgG<sub>1</sub>LALA.

На фиг.3 приведено сравнение % ADCC с использованием человеческих нейтрофилов  
 в присутствии различных концентраций химерных антител 4 и 7 и гуманизированных  
 30 антител 10 и 14, имеющих константную область человеческого IgG<sub>1</sub>, содержащую  
 аминокислотные замены L234A и L235A (LALA), в комбинации с трастузумабом, с  
 одним трастузумабом и с комбинацией трастузумаба с 12C4huIgG<sub>1</sub>LALA, взятом в  
 различных концентрациях. Использовали нейтрофилы двух доноров, гомозиготных  
 по SIRP<sub>α</sub>ВГТ. Даже при низких концентрациях антитела 4, 7, 10 и 14 увеличивают ADCC.  
 Увеличение ADCC зависит от концентрации.

На фиг. 4 приведено сравнение % ADCC с использованием человеческих нейтрофилов  
 в присутствии антител 4, 7, 10, 13, 14, 15 и 16 в комбинации с трастузумабом (Tmab) с  
 35 % ADCC одного трастузумаба и 12C4huIgG<sub>1</sub>LALA. Все антитела увеличивают ADCC  
 по сравнению с одним трастузумабом. Увеличение ADCC нейтрофилами большинства  
 доноров в присутствии антител 4, 7, 10, 13, 14, 15 и 16 в комбинации с трастузумабом  
 40 аналогично или превышает таковое по сравнению с комбинацией 12C4huIgG<sub>1</sub>LALA с  
 трастузумабом.

Списки последовательностей с подчеркнутыми аминокислотными  
 последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3 в аминокислотных последовательностях  
 45 варьируемых областей (VR) тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) (определенные по  
 методу Кабата).

SEQ ID NO:1 (HC VR 1)

1 QSVESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGIDLSS YAMSWVRQAP GKGLEWIGII

51 SSGGITYYASWAKGRFTISK TSTTVDLKIP SPTTEDTATY FCARSLWAAS  
 101 NYYMALWGPG TLVTVSS

SEQ ID NO:2 (LC VR 1)

1 AIKMTQTPAS VSAVGGTVS INCQASEDIESYLAWYQQKP GQPPKLLIYR

5 51 ASTLASGVSS RFKGSGSGTQ FTLTISDLES ADAATYYCLGDYSSSGDTG

101 AFGGGTEVVV K

SEQ ID NO:3 (HC VR 2)

1 QSVEESGGR L VTPGTPLTLT CTVSGFSLSN YAMHWVRQAP GKGLEWIGII

10 51 YTGGATSYATWAKGQFTISK TSTTVDLKIT SPTTEDTATY FCARGDRDGY

101 AYFNIWGPGT LVTVSL

SEQ ID NO:4 (LC VR 2)

1 QIVMTQTPFS VSAVGGTVT IKCQASHNIGSWLAWYQQKP GQRPKLLIYD

51 ASTLASGVSS RFKGSGSGTE FTLTISGVES ADAATYYCQQGYGISYVHNV

101 FGGGTEVVVK

15 SEQ ID NO:5 (HC VR 3)

1 QSVEESGGR L VTPGTPLTLA CTVSGFSLIS YYISWVRQAP EKGLEYIGII

51 NIGGGASYASWAKGRFTISK TSTTVDLKIT SPTPEDTATY FCAMSYGMDT

101 GAFNIWGPGT LVTVSL

SEQ ID NO:6 (LC VR 3)

20 1 AQVLTQTPAS VSAVGGTVT ISCQSSSESVYKNNFLSWYQQ KPGKPPKLLI

51 YGASTLASGV PSRFKSGSG TQFTLTISDL ESDDAATYFC QGGYRTDIYP

101 FGGGTEVVVK

SEQ ID NO:7 (HC VR 4)

1 QSVEESGGR L GTPGTPLTLT CTVSGFSLSS YVMGWFRQAP GKGLEYIGII

25 51 SSSGSPYYASWVNGRFTISK TSTTMDLKMN SPTTEDTATY FCARVGPLGV

101 DYFNIWGPGT LVTVSL

SEQ ID NO:8 (LC VR 4)

1 DIVMTQTPSS VEAAGGTVT IKCQAGQSINSYLAWYQQKP GQRPKLLIYY

51 ASTLESGVPS RFKGSGSGTD YTLTISDLES ADAATYYCQSWHYISRSYAF

30 101 GGGTEVVVK

SEQ ID NO:9 (HC VR 5)

1 QSVEESGGR L VTPGTPLTLT CTVSGFSLSS YVMGWFRQAA GKGLEYIGYI

51 NADGSPYYATWVNGRFTISK TPTTMDLKIN SPTTEDTATY FCARVGPLGV

101 DYFNIWGPGT LVTVSL

35 SEQ ID NO:10 (LC VR 5)

1 DIVMTQTPAS VEAAGGTVT IKCQASQSINRYLTWYQQKP GQRPKLLIYY

51 ASTLESGVPS RFEGSGSGTD YTLTISDLES ADAATYYCQSYYYISRTYAF

101 GGGTEV VVK

SEQ ID NO:11 (HC VR 6)

40 1 QSVEESGGR L VTPGTPLTLT CTVSGIDLSS YTMTWVRQAP GKGLEWIGII

51 YAGGSTAYASWAKGRFTISK TSTTVDLKIT SPTTEDTATY FCARSSSDGY

101 DYFNIWGPGT LVTVSL

SEQ ID NO:12 (LC VR 6)

1 GIVMTQTPSS VSAVGGTVT INCQASQSIGSWLAWYQQKP GQPPKLLIYQ

45 51 ASKLASGVPS RFSGRGSGTH FTLTISDVQS DDAATYYCQQTVAASNVDNA

101 FGGGTEVVVK

SEQ ID NO:13 (HC VR 7)

1 RSVEESGGR L VTPGTPLTLT CTVSGFSLSS HGISWVRQAP GKGLEYIGTI

51 GTGVITYFASWAKGRFTGSK TSTTVDLKIT SPTTEDTATY FCARGSAWND  
 101 PFDPWGPGL VTVSS  
 SEQ ID NO:14 (LC VR 7)

1 ALVMTQTPAS VSAVGGT VTKCQASQS~~VYGN~~DLAWYQH KPGQPPKLLI  
 5 51 YLASTLATGV PSRFSGSGSG TQFTLTITGV QSDDAATYYC LGGGDDEADN  
 101 VFGGGTEVVV K  
 SEQ ID NO:15 (HC VR 8)

1 QSLEESGGRL VTPGTPLTLT CTASGVDLSN YAMGWVRQAP GKGLEWIGII  
 51 YAGGSTSYATWAKGRFTISK TSTTMDLKMT SPTTEDTATY FCARHRSDGY  
 10 101 DYFHLWGPGL LTVVSL  
 SEQ ID NO:16 (LC VR 8)

1 AIDMTQTPAS VSEPVGGT VTKCQASQS~~ISSW~~LAWYQQKP GQRPKLLIYD  
 51 ASKLASGVPS RFSGSGSGTE FTLTISGVQS DDAAAYCQQGYAVSYVENI  
 101 FGGGTEVVVK  
 15 SEQ ID NO:17 (HC VR 9)

1 QSMEESGGRL VTPGTPLTLT CTASGFSLSN YGVSWVRQAP GKGLEWIGII  
 51 YGGSDITAYASWAKGRFTIS KTSTTVDLTI TSPTTEDTAT YFCAKSYTNG  
 101 MDYYNIWGPGL TLVTVSL  
 SEQ ID NO:18 (LC VR 9)

1 AFDLTQTPSS VEAPVGGT VI KCQASQS~~ISSY~~LAWYQQKP GQPPKLLIYS  
 20 51 ASTLASGVSS RFKGSGSETQ FPLTISDLES ADAATYYCQSYYGSRSNVFG  
 101 GGTEVVVK  
 SEQ ID NO:19 (HC VR 29AM4-5)

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIS YYFIHWVRQA PGKGLEWVAS  
 25 51 VYSSEFGYTYADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARET  
 101 FPGLFDGFFGAYLGLSLDYWG QGTLVTVSS  
 SEQ ID NO:20 (LC VR 29AM4-5)

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSVSSAVAWYQQKP GKAPKLLIYS  
 51 ASSLYSGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQAVNWV GALVT  
 30 101 FGQGTKVEIK  
 SEQ ID NO:21 (HC VR 12C4)

1 EVKLEESGGG LMQPGGSMKL SCVASGFTFS NYWMNWVRQS PEKGLEWVAE  
 51 IRLKSNNYATHYAESVKGRF TISRDDSKSS VYLQMNNLRA EDTGIYYCIR  
 101 DYDYDAYFDY WGQGTTLTVS S  
 35 SEQ ID NO:22 (LC VR 12C4)

1 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVSTSGYNYMYWY QQKPGQPPKL  
 51 LIYLASNLESGV PARFSGSG SGTDFLNIH PVEEEDAATY YCQHS~~GELPY~~  
 101 TFGGGTKLEI K  
 SEQ ID NO:23 (HC VR KWAR23)

1 EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGENIKDYIHWVQQR TEQGLEWIGR  
 40 51 IDPEDGETKYAPKFQDKATI TADTSSNTAY LHLSSLTSED TAVYYCARWG  
 101 AYWGQGT LVT VSS  
 SEQ ID NO:24 (LC VR KWAR23)

1 QIVLTQSPAI MSASPGEKVT LTCASSSVSSSYLYWYQQK PGSSPKLWIY  
 45 51 STSNLASGVP ARFSGSGSGT SYSLTISSME AEDAASYFCHQWSSYPRTFG  
 101 AGTKLELK  
 SEQ ID NO:25 (константная область HC антитела человеческого IgG<sub>1</sub>)

1 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP  
 101 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS  
 151 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK  
 201 EYKCKVSNKA LPAIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC  
 5 251 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW  
 301 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

SEQ ID NO:26 (константная область к LC антитела человеческого IgG<sub>1</sub>)

1 RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG  
 51 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK  
 10 101 SFNRGEC

SEQ ID NO:27 (мутантный вариант LALA константной области HC антитела человеческого IgG<sub>1</sub>) (мутации подчеркнуты underlined)

1 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
 51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP  
 15 101 KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS  
 151 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK  
 201 EYKCKVSNKA LPAIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC  
 251 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW  
 301 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

20 SEQ ID NO:28 (лидерная последовательность HC 1-9, 15+16, LC 1-9+12)

1 MGWSCIIFL VATATGVHS

SEQ ID NO:29 (лидерная последовательность HAVT20)

MACPGFLWAL VISTCLEFSMA

SEQ ID NO:30 (HC VR 10)

25 1 KVEESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFSLSY VMGWVRQAPG KGLEWVSIIS  
 51 SSGSPYYASW VNGRFTISKD NSEGMVYLQM NSLRAEDTAV YYCARVGPLG  
 101 VDYFNIWGQG TTVTVSS

SEQ ID NO:31 (LC VR 10)

30 1 DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCQAGQSIN SYLAWYQQKP GQPPKLLIYY  
 51 ASTLESGVPD RFGSGSGTD FTLTISSLQA EDVAVYYCQS WHYISRSYAF  
 101 GGGTKLEIK

SEQ ID NO:32 (HC VR 11)

35 1 EVKVEESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFSLS SYVMGWVRQA PGKGLEWVSI  
 51 ISSGSPYYA SWVNGRFTIS KTSTMDLQM NSLRAEDTAV YYCARVGPLG  
 101 VDYFNIWGQG TTVTVSS

SEQ ID NO:33 (LC VR 11)

40 1 DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCQAGQSIN SYLAWYQQKP GKVPKLLIYY  
 51 ASTLESGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCQS WHYISRSYAF  
 101 GQGTKVEIK

SEQ ID NO:34 (HC VR 12)

1 VQLVESGGRL VQPGTPLTLS CTVSGFSLSS YVMGWFRQAP GKGLEIYIGII  
 51 SSSGSPYYAS WVNGRFTISK TSTTMDLKMN SLRSEDATY FCARVGPLGV  
 101 DYFNIWGPGT LTVVSS

45 SEQ ID NO:35 (HC VR 13+14)

1 RQLVESGGGL VQPGGSLRLS CTASGFSLS HGISWVRQAP GKGLEIYIGTI  
 51 GTGVITYFAS WAKGRFTGSK TSSTAYMELS SLRSEDATY FCARGSAWND  
 101 PFDPWGQGT LTVVSS

SEQ ID NO:36 (LC VR 13)



1 AIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQSVY GNNDLAWYQQ KPGKAPKLLI  
 51 YLASTLATGV PSRFSGSGSG TDFTLTISL QPEDFATYYC LGGGDDEADN  
 101 VFGGGTKVEI K

SEQ ID NO:37 (LC VR 14+16)

5 1 DIEMTQSPSS VSASVGDRVT LTCQASQSVY GNNDLAWYQQ KPGQAPKLLI  
 51 YLASTLATGV PSRFSGSGSG TDFTLTISL QPEDFATYYC LGGGDDEADN  
 101 VFGGGTKVEI K

SEQ ID NO:38 (LC VR 15)

10 1 ELVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQSVY GNNDLAWYQQ KPGEAPKLLI  
 51 YLASTLATGV PSRFSGSGSG TDFTLTISGL QSEDFATYYC LGGGDDEADN  
 101 VFGQGTKVEI K

SEQ ID NO:39 (лидерная последовательность тяжелых цепей 10-14)

1 MGWTLVFLFL LSVTAGVHS

SEQ ID NO:40 (лидерная последовательность легких цепей 10, 11, 13-16)

15 1 MVSSAQFLGL LLLCFQGTRC

СПИСКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Synthon Biopharmaceuticals B.V.

VERHEIJDEN Gijsbertus Franciscus Maria

ROUWENDAL Gerard Johan Adolph

20 ARENDS Roland Jan

BERG, VAN DEN Timo Kars

MATLUNG Hanke Lottie

SZILAGYI Katarina

<120> АНТИ-SIRPальфа АНТИТЕЛЛА С МУТАЦИЕЙ LALA

25 <130> P1703PC00/PB-078

<140> PCT/EP2018/062473

<141> 2018-05-15

<160> 40

<170> BiSSAP 1.3.6

30 <210> 1

<211> 117

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

35 <223> SEQ ID NO:1 (HC VR 1)

<400> 1

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala

40 20 25 30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35 40 45

Ile Ile Ser Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

50 55 60

45 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Pro

65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Leu

85 90 95

RU 2 771 174 C2

Trp Ala Ala Ser Asn Tyr Tyr Met Ala Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 2  
 <211> 111  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>

10 <223> SEQ ID NO:2 (LC VR 1)  
 <400> 2  
 Ala Ile Lys Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Ala Ala Val Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Thr Val Ser Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Glu Ser Tyr  
 15 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly  
 50 55 60  
 20 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Ser  
 65 70 75 80  
 Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Asp Tyr Tyr Ser Ser Ser  
 85 90 95  
 Gly Asp Thr Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
 25 100 105 110  
 <210> 3  
 <211> 116  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>

30 <223> SEQ ID NO:3 (HC VR 2)  
 <400> 3  
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
 1 5 10 15  
 35 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr Ala  
 20 25 30  
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 35 40 45  
 Ile Ile Tyr Thr Gly Gly Ala Thr Ser Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly  
 40 50 55 60  
 Gln Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr  
 65 70 75 80  
 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Asp  
 85 90 95  
 45 Arg Asp Gly Tyr Ala Tyr Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Leu  
 115

<210> 4  
 <211> 110  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 5 <220>  
 <223> SEQ ID NO:4 (LC VR 2)  
 <400> 4  
 Gln Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Phe Ser Val Ser Ala Val Val Gly  
 1 5 10 15  
 10 Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser His Asn Ile Gly Ser Trp  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly  
 15 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Ser  
 65 70 75 80  
 Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ile Ser Tyr  
 85 90 95  
 20 Val His Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
 100 105 110

<210> 5  
 <211> 116  
 <212> Белок  
 25 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> SEQ ID NO:5 (HC VR 3)  
 <400> 5  
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
 30 1 5 10 15  
 Leu Thr Leu Ala Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Ser Tyr Tyr  
 20 25 30  
 Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly  
 35 35 40 45  
 Ile Ile Asn Ile Gly Gly Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly  
 50 55 60  
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr  
 65 70 75 80  
 Ser Pro Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Met Ser Tyr  
 40 85 90 95  
 Gly Met Asp Thr Gly Ala Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Leu  
 115

45 <210> 6  
 <211> 110  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

RU 2 771 174 C2

<220>

<223> SEQ ID NO:6 (LC VR 3)

<400> 6

Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Ala Ala Val Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Glu Ser Val Tyr Lys Asn  
 20 25 30  
 Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu  
 35 40 45  
 10 Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu  
 65 70 75 80  
 Glu Ser Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gly Gly Tyr Arg Thr  
 15 85 90 95  
 Asp Ile Tyr Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
 100 105 110

<210> 7

<211> 116

20 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> SEQ ID NO:7 (HC VR 4)

<400> 7

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Gly Thr Pro Gly Thr Pro  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Val  
 20 25 30  
 Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly  
 30 35 40 45  
 Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Asn Gly  
 50 55 60  
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Met Asp Leu Lys Met Asn  
 65 70 75 80  
 35 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Val Gly  
 85 90 95  
 Pro Leu Gly Val Asp Tyr Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Leu  
 40 115

<210> 8

<211> 109

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

45 <220>

<223> SEQ ID NO:8 (LC VR 4)

<400> 8

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Glu Ala Ala Val Gly



RU 2 771 174 C2

```

                35                40                45
Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Glu Gly
    50                55                60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Ser
5 65                70                75                80
Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ile Ser Arg
    85                90                95
Thr Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
    100                105
10 <210> 11
    <211> 116
    <212> Белок
    <213> Искусственная последовательность
    <220>
15 <223> SEQ ID NO:11 (HC VR 6)
    <400> 11
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1          5          10          15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Thr
20          20          25          30
Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
    35          40          45
Ile Ile Tyr Ala Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
    50          55          60
25 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
    65          70          75          80
Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ser
    85          90          95
Ser Asp Gly Tyr Asp Tyr Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
30          100          105          110
Thr Val Ser Leu
    115
    <210> 12
    <211> 111
35 <212> Белок
    <213> Искусственная последовательность
    <220>
    <223> SEQ ID NO:12 (LC VR 6)
    <400> 12
40 Gly Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1          5          10          15
Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Trp
    20          25          30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
45          35          40          45
Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50          55          60
Arg Gly Ser Gly Thr His Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Ser

```



RU 2 771 174 C2

100 105 110

<210> 15  
 <211> 116  
 <212> Белок  
 5 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> SEQ ID NO:15 (HC VR 8)  
 <400> 15

10 Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Val Asp Leu Ser Asn Tyr Ala  
 20 25 30  
 Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 35 40 45  
 15 Ile Ile Tyr Ala Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly  
 50 55 60  
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Met Asp Leu Lys Met Thr  
 65 70 75 80  
 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg His Arg  
 20 85 90 95  
 Ser Asp Gly Tyr Asp Tyr Phe His Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Leu  
 115

25 <210> 16  
 <211> 110  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 30 <223> SEQ ID NO:16 (LC VR 8)  
 <400> 16

Ala Ile Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Glu Pro Val Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp  
 35 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 35 40 45  
 Tyr Asp Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 40 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Asp Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ala Val Ser Tyr  
 85 90 95  
 Val Glu Asn Ile Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
 45 100 105 110

<210> 17  
 <211> 117  
 <212> Белок



RU 2771 174 C2

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> SEQ ID NO:17 (HC VR 9)

<400> 17

5 Gln Ser Met Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr Gly  
 20 25 30  
 Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 10 35 40 45  
 Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Asp Ile Thr Ala Tyr Ala Ser Trp Ala Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Thr Ile  
 65 70 75 80  
 15 Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Lys Ser  
 85 90 95  
 Tyr Thr Asn Gly Met Asp Tyr Tyr Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Leu

20 115

<210> 18

<211> 108

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

25 <220>

<223> SEQ ID NO:18 (LC VR 9)

<400> 18

Ala Phe Asp Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Glu Ala Pro Val Gly  
 1 5 10 15  
 30 Gly Thr Val Ile Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly  
 35 50 55 60  
 Ser Gly Ser Glu Thr Gln Phe Pro Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Ser  
 65 70 75 80  
 Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Gly Ser Arg Ser  
 85 90 95  
 40 Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
 100 105

<210> 19

<211> 129

<212> Белок

45 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> SEQ ID NO:19 (HC VR 29AM4-5)

<400> 19

RU 2771174 C2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Tyr  
 20 25 30  
 5 Phe Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Ser Val Tyr Ser Ser Phe Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 10 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Phe Thr Phe Pro Gly Leu Phe Asp Gly Phe Phe Gly Ala Tyr  
 100 105 110  
 15 Leu Gly Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 115 120 125

Ser

<210> 20

<211> 110

20 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> SEQ ID NO:20 (LC VR 29AM4-5)

<400> 20

25 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 30 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 35 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Val Asn Trp Val Gly  
 85 90 95  
 Ala Leu Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 21

40 <211> 121

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> SEQ ID NO:21 (HC VR 12C4)

<400> 21

45 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Met Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

RU 2771 174 C2

```

                20                25                30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
                35                40                45
Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
5      50                55                60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65                70                75                80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
                85                90                95
10     Tyr Cys Ile Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
                100                105                110
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
                115                120
<210> 22
15     <211> 111
        <212> Бeлoк
        <213> Искусственная последовательность
        <220>
        <223> SEQ ID NO:22 (LC VR 12C4)
20     <400> 22
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1      5                10                15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
                20                25                30
25     Gly Tyr Asn Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
                35                40                45
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50     55                60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
30     65                70                75                80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Gly
                85                90                95
Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
                100                105                110
35     <210> 23
        <211> 113
        <212> Бeлoк
        <213> Искусственная последовательность
        <220>
        <223> SEQ ID NO:23 (HC KWAR23 )
40     <400> 23
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1      5                10                15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
45     20                25                30
Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
                35                40                45
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe

```

RU 2 771 174 C2

```

50              55              60
Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65              70              75              80
Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
5              85              90              95
Ala Arg Trp Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
              100              105              110
Ser
<210> 24
10 <211> 108
    <212> Белок
    <213> Искусственная последовательность
    <220>
    <223> SEQ ID NO:24 (LC VR KWAR23)
15 <400> 24
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1              5              10              15
Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
              20              25              30
20 Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
              35              40              45
Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
              50              55              60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
25 65              70              75              80
Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
              85              90              95
Arg Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
              100              105
30 <210> 25
    <211> 330
    <212> Белок
    <213> Искусственная последовательность
    <220>
35 <223> SEQ ID NO 25: (константная область HC человеческого антитела IgG1)
    <400> 25
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1              5              10              15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
40              20              25              30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
              35              40              45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
              50              55              60
45 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65              70              75              80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
              85              90              95

```

RU 2771174 C2

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 5 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 10 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 15 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 20 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 25 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 30 325 330  
 <210> 26  
 <211> 107  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 35 <220>  
 <223> SEQ ID NO 26: (константная область LC человеческого антитела IgG)  
 <400> 26  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15  
 40 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 40 45  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 45 50 55 60  
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 65 70 75 80  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

RU 2 771 174 C2

85 90 95  
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105  
 <210> 27  
 5 <211> 330  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> SEQ ID NO 27: (мутантный вариант LALA константной области HC  
 10 человеческого антитела IgG1  
 (мутации подчеркнуты)  
 <400> 27  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 15 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 20 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 25 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 30 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 35 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 40 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 45 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

RU 2771174 C2

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 5 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330  
 <210> 28  
 <211> 19  
 <212> Белок  
 10 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> SEQ ID NO:28 (лидерная последовательность антител 1-9)  
 <400> 28  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 15 1 5 10 15  
 Val His Ser  
 <210> 29  
 <211> 21  
 <212> Белок  
 20 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> SEQ ID NO:29 (HAVT20 лидерная последовательность)  
 <400> 29  
 Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu  
 25 1 5 10 15  
 Glu Phe Ser Met Ala  
 20  
 <210> 30  
 <211> 117  
 30 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> SEQ ID NO:30 (HC10)  
 <400> 30  
 35 Lys Val Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Val Met  
 20 25 30  
 Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ile  
 40 35 40 45  
 Ile Ser Ser Ser Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Asn Gly Arg  
 50 55 60  
 Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Glu Gly Met Val Tyr Leu Gln Met  
 65 70 75 80  
 45 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val  
 85 90 95  
 Gly Pro Leu Gly Val Asp Tyr Phe Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 31  
 <211> 109  
 5 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> SEQ ID NO:31 (LC 10)  
 <400> 31  
 10 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Gln Ala Gly Gln Ser Ile Asn Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 15 35 40 45  
 Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
 65 70 75 80  
 20 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp His Tyr Ile Ser Arg  
 85 90 95  
 Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
 <210> 32  
 25 <211> 117  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> SEQ ID NO:32 (HC VR 11)  
 30 <400> 32  
 Glu Val Lys Val Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 35 Val Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Asn  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Met Asp Leu Gln Met  
 40 65 70 75 80  
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val  
 85 90 95  
 Gly Pro Leu Gly Val Asp Tyr Phe Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110  
 45 Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 33  
 <211> 109



<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> SEQ ID NO:33 (LC VR 11)

5 <400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Gly Gln Ser Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

10 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

15 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp His Tyr Ile Ser Arg  
85 90 95

Ser Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

20 <210> 34

<211> 116

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

25 <223> SEQ ID NO:34 (HC VR 12)

<400> 34

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Gln Pro Gly Thr Pro  
1 5 10 15

30 Leu Thr Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Val  
20 25 30

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly  
35 40 45

Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Asn Gly  
50 55 60

35 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Met Asp Leu Lys Met Asn  
65 70 75 80

Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Val Gly  
85 90 95

40 Pro Leu Gly Val Asp Tyr Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 35

<211> 116

45 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> SEQ ID NO:34 (HC VR 12)

RU 2771174 C2

<400> 35

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Gln Pro Gly Thr Pro  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Val  
 5 20 25 30  
 Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly  
 35 40 45  
 Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Asn Gly  
 50 55 60  
 10 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Met Asp Leu Lys Met Asn  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Val Gly  
 85 90 95  
 Pro Leu Gly Val Asp Tyr Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val  
 15 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 36

<211> 111

20 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> SEQ ID NO:36 (LC VR 13)

<400> 36

Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Gly Asn  
 20 25 30  
 Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
 30 35 40 45  
 Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
 65 70 75 80  
 35 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Gly Asp Asp  
 85 90 95  
 Glu Ala Asp Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 37

40 <211> 111

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> SEQ ID NO:37 (LC VR 14 +16)

45 <400> 37

Asp Ile Glu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Gly Asn

RU 2771 174 C2

```

                20                25                30
Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu
    35                40                45
Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe
5    50                55                60
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65                70                75                80
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Gly Asp Asp
    85                90                95
10   Glu Ala Asp Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
    100                105                110
<210> 38
<211> 111
<212> Белок
15   <213> Искусственная последовательность
<220>
<223> SEQ ID NO:38 (LC VR 15)
<400> 38
Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
20   1                5                10                15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Gly Asn
    20                25                30
Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu
    35                40                45
25   Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe
    50                55                60
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65                70                75                80
Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Gly Asp Asp
30   85                90                95
Glu Ala Asp Asn Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
    100                105                110
<210> 39
<211> 19
35   <212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> SEQ ID NO:39 (лидерная последовательность тяжелых цепей 10-14)
<400> 39
40   Met Gly Trp Thr Leu Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
    1                5                10                15
Val His Ser
<210> 40
<211> 20
45   <212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> SEQ ID NO:40 (лидерная последовательность легких цепей 10, 11, 13-16)

```

&lt;400&gt; 40

Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln

1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys

5 20

## (57) Формула изобретения

1. Анти-SIRP $\alpha$  антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющие комплементарность области (CDR) переменных областей (VR) тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC), выбранные из группы, состоящей из:

а) аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области HC, приведенных в SEQ ID NO: 3, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области LC, приведенных в SEQ ID NO: 4;

б) аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области HC, приведенных в SEQ ID NO: 5, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в SEQ ID NO: 6;

в) аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области HC, приведенных в SEQ ID NO: 7, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области LC, приведенных в SEQ ID NO: 8;

г) аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области HC, приведенных в SEQ ID NO: 9, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области LC, приведенных в SEQ ID NO: 10;

д) аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области HC, приведенных в SEQ ID NO: 11, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области LC, приведенных в SEQ ID NO: 12;

е) аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области HC, приведенных в SEQ ID NO: 13, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области LC, приведенных в SEQ ID NO: 14;

ж) аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области HC, приведенных в SEQ ID NO: 15, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области LC, приведенных в SEQ ID NO: 16; и

з) аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области HC, приведенных в SEQ ID NO: 17, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области LC, приведенных в SEQ ID NO: 18;

причем CDR определены согласно нумерации Кабат.

2. Анти-SIRP $\alpha$  антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, которое является химерным, гуманизированным или человеческим.

3. Анти-SIRP $\alpha$  антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, содержащее CDR HCVR и LCVR, выбранные из группы, состоящей из:

а) аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области HC, приведенных в SEQ ID NO: 7, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области LC, приведенных в SEQ ID NO: 8; и

б) аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области HC, приведенных в SEQ ID NO: 13, и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области LC, приведенных в SEQ ID NO: 14;

причем антитело является гуманизированным.

4. Анти-SIRP $\alpha$  антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, содержащее:

а) аминокислотную последовательность HCVR, приведенную в SEQ ID NO: 30, и

аминокислотную последовательность LCVR, приведенную в SEQ ID NO: 31;

b) аминокислотную последовательность HCVR, приведенную в SEQ ID NO: 32, и аминокислотную последовательность LCVR, приведенную в SEQ ID NO: 33;

5 c) аминокислотную последовательность HCVR, приведенную в SEQ ID NO: 34, и аминокислотную последовательность LCVR, приведенную в SEQ ID NO: 8;

d) аминокислотную последовательность HCVR, приведенную в SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность LCVR, приведенную в SEQ ID NO: 36;

e) аминокислотную последовательность HCVR, приведенную в SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность LCVR, приведенную в SEQ ID NO: 37;

10 f) аминокислотную последовательность HCVR, приведенную в SEQ ID NO:13, и аминокислотную последовательность LCVR, приведенную в SEQ ID NO:38; или

g) аминокислотную последовательность HCVR, приведенную в SEQ ID NO:13, и аминокислотную последовательность LCVR, приведенную в SEQ ID NO:37.

5. Анти-SIRP $\alpha$  антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 15 1–4, содержащее модифицированную Fc-область, которая имеет пониженное связывание с человеческим рецептором Fc $\alpha$  или Fc $\gamma$  по сравнению с тем же анти-SIRP $\alpha$  антителом, содержащим Fc-область дикого типа.

6. Анти-SIRP $\alpha$  антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 5, содержащее модифицированную человеческую Fc-область IgG<sub>1</sub>, содержащую одну или более 20 аминокислотных замен в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из: L234, L235, G237, D265, D270, N297, A327, P328 и P329 согласно нумерации Eu.

7. Анти-SIRP $\alpha$  антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, содержащее аминокислотные замены L234A и L235A, L234E и L235A, L234A, L235A и P329A или 25 L234A, L235A и P329G.

8. Анти-SIRP $\alpha$  антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7, содержащее аминокислотные замены L234A и L235A или L234E и L235A.

9. Фармацевтическая композиция для лечения солидных опухолей или гематологических злокачественных новообразований у человека, содержащая 30 анти-SIRP $\alpha$  антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–8 и один или более фармацевтически приемлемых наполнителей.

10. Применение анти-SIRP $\alpha$  антитела по любому из пп. 1–8 или фармацевтической композиции по п. 9 для лечения рака.

11. Применение анти-SIRP $\alpha$  антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по 35 любому из пп. 1-8 или фармацевтической композиции по п. 9 для получения лекарственного средства для лечения солидных опухолей или гематологических злокачественных новообразований у человека.

12. Применение комбинации анти-SIRP $\alpha$  антитела или его антигенсвязывающего 40 фрагмента по любому из пп. 1-8 или фармацевтической композиции по п. 9 с одним или более другими противораковыми терапевтическими средствами для получения лекарственного средства для лечения солидных опухолей или гематологических злокачественных новообразований у человека.

13. Применение по п. 12, в котором одно или более из других противораковых терапевтических средств представляют собой терапевтические средства направленного действия или иммунотерапевтические агенты.

45 14. Применение по п. 13, в котором терапевтическое средство направленного действия представляет собой терапевтическое антитело или конъюгат антитело-лекарственное вещество.

15. Применение по п. 14, в котором терапевтическое антитело представляет собой

терапевтическое антитело к мембраносвязанной мишени на поверхности опухолевых клеток, которое содержит человеческую Fc-область, которая связывается с активирующими Fc-рецепторами, присутствующими на человеческих иммунных эффекторных клетках.

5

10

15

20

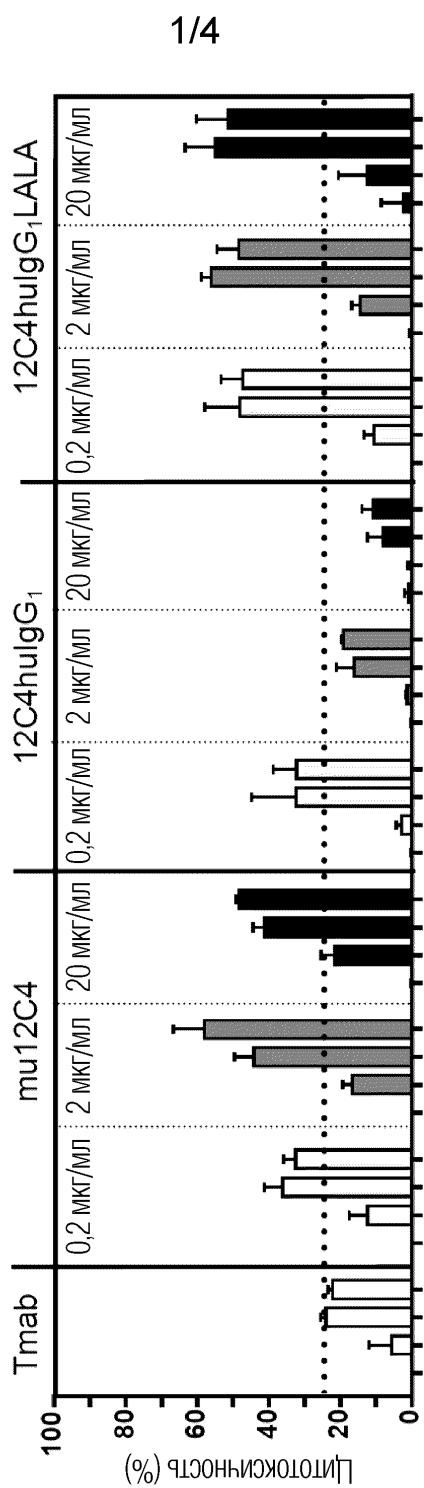
25

30

35

40

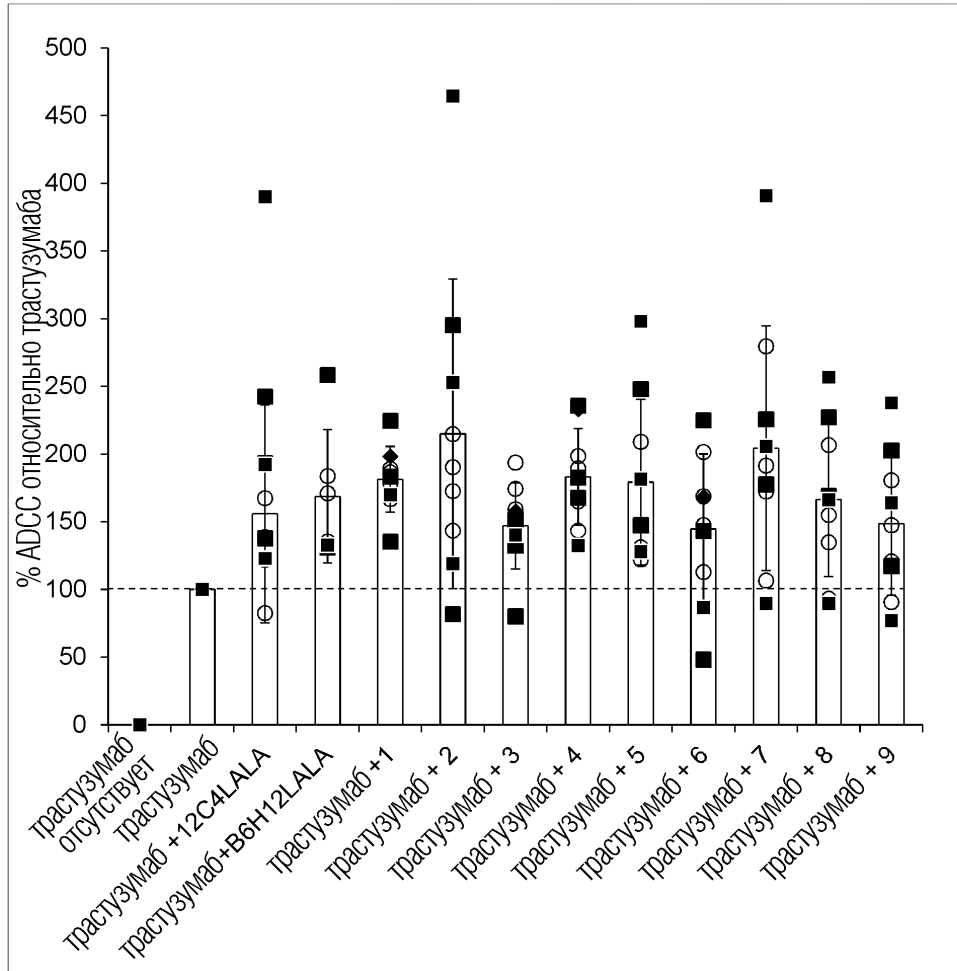
45



Увеличение концентрации трастузумаба слева направо (0, 0,05, 0,5 и 5 мкг/мл)

ФИГ. 1

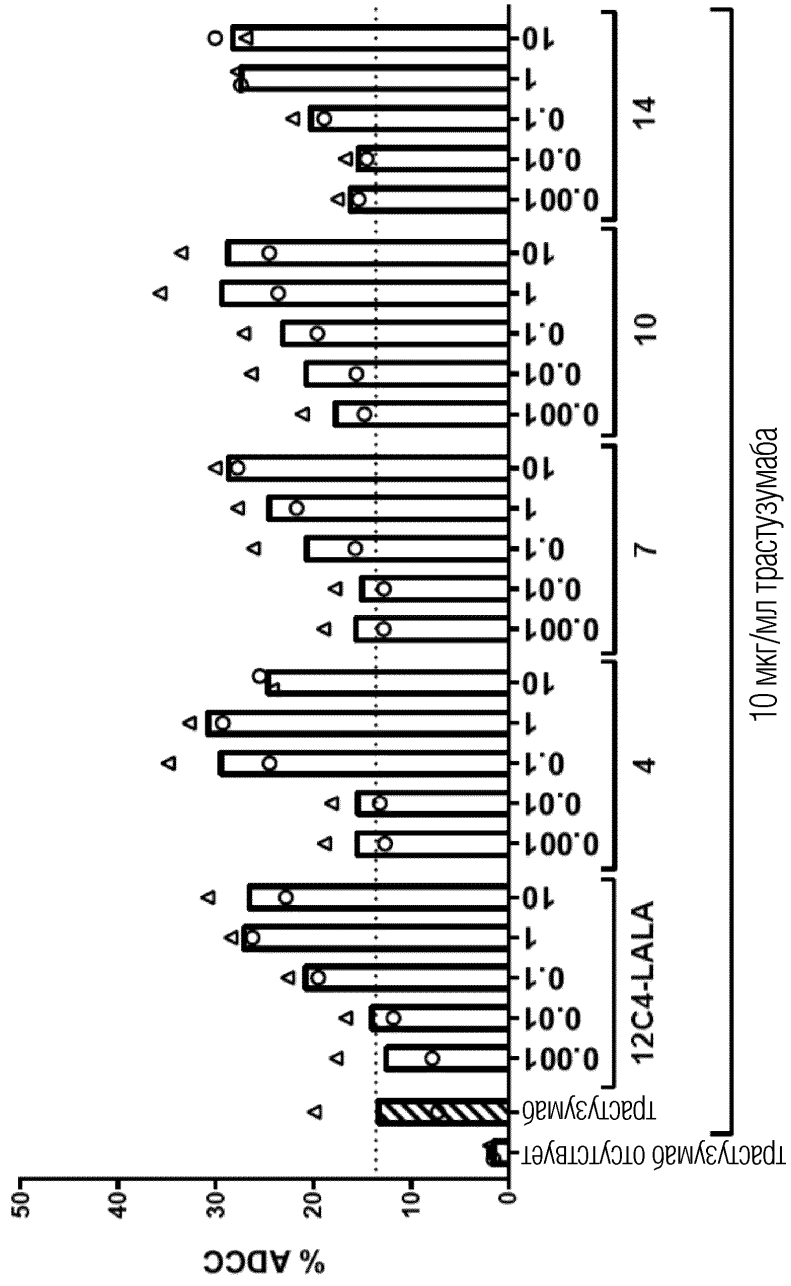
2/4



ФИГ. 2

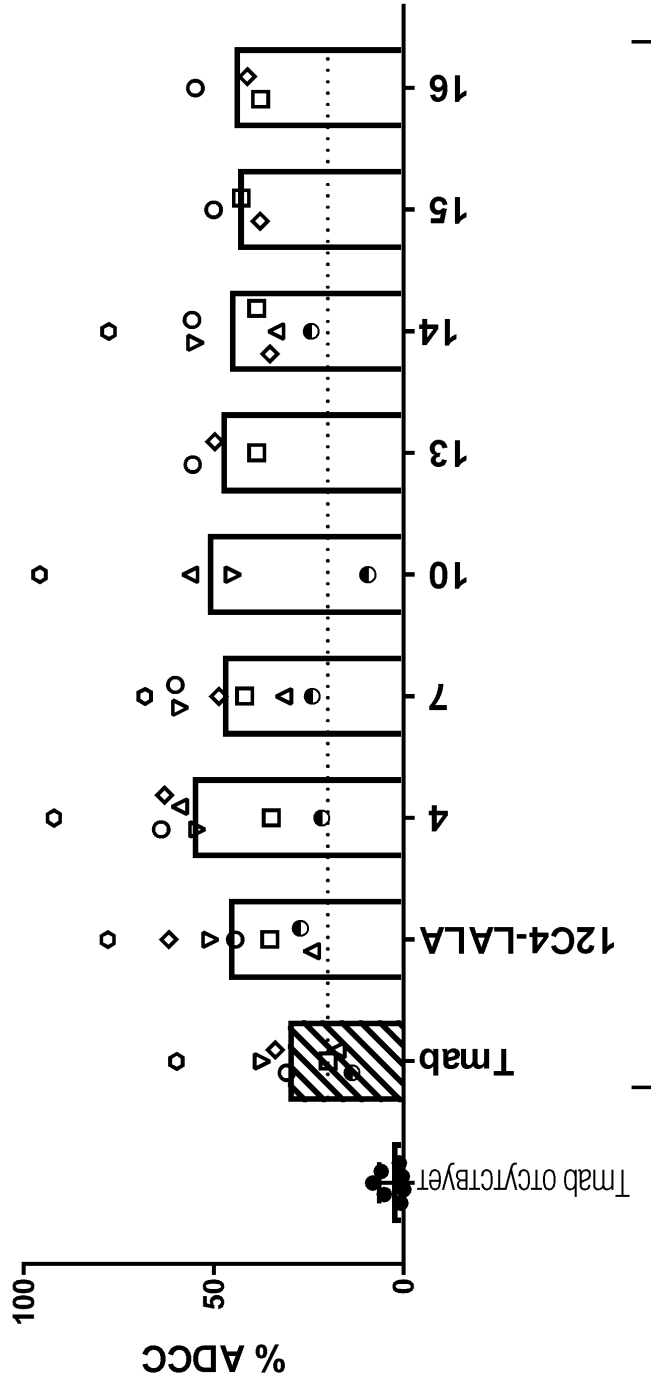


3/4



ФИГ. 3

4/4



10 мкг/мл Тmab

ФИГ. 4