



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **126658** (13) **C2**
(51) МПК (2022.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2018 09487 (22) Дата подання заявки: 14.04.2017 (24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 12.01.2023 (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/322,707, 17305182.2 (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 14.04.2016, 17.02.2017 (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US, EP (41) Публікація відомостей про заявку: 25.04.2019, Бюл.№ 8 (46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 11.01.2023, Бюл.№ 2 (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/EP2017/059071, 14.04.2017	(72) Винахідник(и): Пуарьє Ніколя (FR), Марі Кароліна (FR), Ванхове Бернард (FR), Готьє Ванесса (FR), Тепеньє Віржині (FR), Пенгам Сабріна (FR) (73) Володілець (володільці): ОСЕ ІММЬЮНОТЕРАПЬЮТИКС, 22 Bd Benoni Goullin, 44200 Nantes, France (FR) (74) Представник: Кістерський Тимофій Арсенійович, реєстр. №457 (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: D. HATHERLEY ET AL, "The Structure of the Macrophage Signal Regulatory Protein (SIRP) Inhibitory Receptor Reveals a Binding Face Reminiscent of That Used by T Cell Receptors", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (20070316), vol. 282, no. 19, doi:10.1074/jbc.M611511200, ISSN 0021-9258, pages 14567 - 14575, XP055081473 LIU ET AL, "Functional Elements on SIRP@α IgV Domain Mediate Cell Surface Binding to CD47", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, (20061223), vol. 365, no. 3, doi:10.1016/J.JMB.2006.09.079, ISSN 0022-2836, pages 680 - 693, XP005733360 Y. LIU ET AL, "Signal Regulatory Protein (SIRPα), a Cellular Ligand for CD47, Regulates Neutrophil Transmigration", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (20020315), vol. 277, no. 12, doi:10.1074/jbc.M109720200, ISSN 0021-9258, pages 10028 - 10036, XP055030073 LEE ET AL, "Novel structural determinants on SIRP α that mediate binding to CD47.", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (20070101), pages 7741 - 7750, XP055081468 WO 2015/138600 A2, 17.09.2015
--	---

(54) НОВІ АНТИТИЛА ДО SIRPα ТА ВАРІАНТИ ЇХ ТЕРАПЕВТИЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ**(57) Реферат:****UA 126658 C2**

Винахід стосується антитіл до SIRPa людини, що є антагоністичними антитілами до SIRPa, які інгібують зв'язування CD47 людини з SIRPa людини.

Даний винахід відноситься до області імунотерапії. Даний винахід відноситься до нових антитіл до SIRPa, здатних специфічно зменшувати взаємодію SIRPa з CD47, не впливаючи на взаємодію SIRPg з CD47.

Націлений вплив на контрольні точки імунітету у випадку адаптивного імунітету показав значну терапевтичну ефективність у боротьбі з численними видами раку, але в обмеженій кількості пацієнтів. Контрольна точка імунітету на мієлоїдних клітинах (макрофагах, дендритних клітинах, супресорних клітинах мієлоїдного походження (MDSC), поліморфноядерних клітинах (PMN)) залишається недостатньо дослідженою, у той час як ці клітини представляють найпоширеніший тип імунних клітин у багатьох солідних пухлинах і часто пов'язані з несприятливим результатом.

Сигнальний регуляторний білок-альфа або SIRP α (також називається SIRPa, CD172a або SHPS-1) експресується на моноцитах, більшості субпопуляцій тканинних макрофагів, гранулоцитах, підгрупах дендритних клітин в лімфоїдних тканинах, деяких клітинах-попередниках кісткового мозку, а також до різноманітних рівнів на нейронах, при цьому особливо високий рівень експресії спостерігається у багатих на синапси областях мозку, таких як зернистий шар мозочка та гіпокамп. SIRPa є прототипним членом сімейства парних рецепторів SIRP близькоспоріднених білків SIRP. Кодуючий ген SIRPa людини являє собою поліморфний ген. декілька варіантів якого описані в людини. Найпоширенішими варіантами білка є SIRPa v1 і v2 (номери доступу NP_542970 (P78324) і CAA71403). Поліморфізми в SIRP людини призводять до змін в експонованих на поверхні амінокислотах, але це не впливає на зв'язування з CD47.

Взаємодія SIRPa, експресованого мієлоїдними клітинами, з повсюдно розповсюдженим рецептором CD47 є важливою контрольною точкою імунітету при вродженій імунній відповіді, що бере участь в регуляції мієлоїдних функцій. Взаємодія SIRPa з CD47 широко описана та забезпечує пригнічуючий сигнал, який інгібує фагоцитоз клітин хазяїна. CD47 широко експресується на більше низьких рівнях більшістю здорових клітин, але він також надекспресується в деяких ракових клітинах. Таким чином, CD47 функціонує як сигнал "не їж мене". Обидва і CD47, і SIRPa також залучені у багато інших взаємодій. Однією з найбільше добре охарактеризованих фізіологічних функцій взаємодії

CD47-SIRPa є участь у підтримці гомеостазу гемопоетичних клітин, зокрема, еритроцитів і тромбоцитів. Оскільки CD47 виконує функцію сигналу "не їж мене" і, відповідно, є важливою детермінантою фагоцитозу клітин хазяїна макрофагами, в останні роки інтенсивно вивчався потенційний внесок взаємодії CD47-SIRPa в усуненні ракових клітин. Було показано, що поширеність рецепторів CD47 у пухлинах обернено пропорційна загальному виживанню пацієнтів й являє собою несприятливий прогностичний фактор для декількох типів раку.

У даний час шлях SIRPa/CD47 є об'єктом різних фармацевтичних розробок, спрямованих на посилення фагоцитозу макрофагами. Фактично, як й інфіковані клітини, ракові клітини несуть аберантне навантаження, таке як чужорідні білки або патологічні рівні нормальних білків, крім того, ці клітини часто порушують вроджені механізми імунного контролю за рахунок одночасної надекспресії імунних регуляторних молекул. Стає очевидним, що один такий механізм включає CD47, аутологічний білок, експресований нормальними клітинами. CD47 взаємодіє з SIRPa та призводить до передачі сигналу "не їж мене" фагоцитарним макрофагам, які після цього не зачіпають клітини-мішені. Надекспресія CD47 раковими клітинами робить їх стійкими до макрофагів, навіть у тих випадках, коли ракові клітини покриті терапевтичними антитілами, і корелює з несприятливими клінічними результатами при численних видах солідного раку та гемобластозів. В експериментальних моделях, зокрема, ксенотрансплантатних моделях пухлин в людини в імунодефіцитних мишей, блокування шляху CD47/SIRPa з агентами, націленими на CD47, дуже ефективно стимулювало видалення пухлини макрофагами, а також зменшувало поширення ракових клітин й утворення метастазів. Було описано, що блокування шляху CD47/SIRPa агентами, націленими на CD47, шляхом посилення антитілозалежного фагоцитозу макрофагами, виявляє синергетичну дію з виснажуючими терапевтичними протираковими антитілами, такими як трастузумаб (Trastuzumab) (антитіло до Her2), цетуксимаб (Cetuximab) (антитіло до EGFR), ритуксимаб (Rituximab) (антитіло до CD20) й алемтузумаб (Alemtuzumab) (антитіло до CD52).

Проте, нещодавно було показано, що агенти, націлені на CD47 (анти-CD47 або SIRPa-Fc) викликають гематологічну токсичність (анемію або тромбоцитопенію), пов'язану з фізіологічною роллю CD47.

Крім цього, CD47 також зв'язується з іншим членом сімейства SIRP, SIRP-гамма (також називається SIRPg, SIRPy, CD172g або SIRP-бета 2), який є присутнім на поверхні Т-клітин людини, але не на мієлоїдних клітинах людини. SIRPg виник в результаті подвоєння гена SIRPb

у приматів східної півкулі майже 35 мільйонів років тому й обмежено експресується на Т-лімфоцитах, на відміну від SIRPa, який експресується на мієлоїдних клітинах. SIRPg відсутній в мишей. Було показано, що взаємодія SIRPg-CD47 опосередковує міжклітинну адгезію, підсилює проліферацію, яка залежить від суперантигена й опосередкована Т-клітинами, і коstimулює активацію Т-клітин (Piccio et al., Blood, 105:6,2005).

Внаслідок високої подібності послідовностей SIRPa і SIRPg, зокрема, в області, яка взаємодіє з CD47, антитіла до SIRPa, розкриті у попередньому рівні техніки, також зв'язуються з SIRPg і мають небажані ефекти в людини, такі як інгібування проліферації Т-клітин і зниження імунної відповіді. Такі побічні ефекти антитіл до CD47 або неселективних антитіл до SIRPa непередбачувані, оскільки випробовування відомих антитіл проводили в моделях на мишах, які не мають гена SIRPg, і в зв'язку з цим згадані побічні ефекти були відсутні.

В даній області техніки, як і раніше, є значна потреба в нових і вдосконалених агентах, зокрема, антитілах, для безпечної імунотерапії, зокрема, проти раку, націлених на клітини вродженого імунітету, які не мають шкідливого впливу на імунні відповіді Т-клітин. Зокрема, існує потреба в інгібуванні взаємодії SIRPa-CD47 без негативного впливу на взаємодію SIRPg-CD47. Автори даного винаходу досягли значного прогресу за допомогою винаходу, розкритого у даному документі.

Завдання даного винаходу полягає в тому, щоб задовольнити цю потребу шляхом забезпечення нових агентів, зокрема, антитіл, які дозволяють розв'язати, повністю або частково, зазначені вище проблеми.

У даній заявці автори винаходу пропонують нові антитіла до SIRPa, зокрема, гуманізовані антитіла, які виявляють антагоністичну дію на взаємодію SIRPa-CD47, але не зв'язуються специфічно з SIRPg і, відповідно, не мають негативного впливу на взаємодію SIRPg-CD47.

Антитіла згідно з даним винаходом мають, зокрема, такі переваги:

- Вони не викликають гематологічної токсичності внаслідок обмеженої експресії SIRPa (не зв'язуються з еритроцитами людини (червоними клітинами крові) і тромбоцитами);

- Вони зменшують ріст пухлини та модифікують мікрооточення пухлини при застосуванні у вигляді монотерапії;

- Вони проявляють синергічний ефект із інгібіторами контрольних точок і коstimулюючими агентами;

- Вони індукують довготривалі та стійкі відповіді протипухлинних Т-лімфоцитів пам'яті;

- Вони забезпечують умови для імунних відповідей Т-клітин людини, будучи селективними антагоністами взаємодії SIRPa-CD47, не порушуючи при цьому взаємодію CD47/SIRPg. Всупереч очікуванням, автори даного винаходу отримали такі селективні антитіла, незважаючи на високу ідентичність послідовностей SIRPa та SIRPg.

Ці нові антитіла, відібрані на підставі цих характеристик, є особливо перспективними для численних варіантів терапевтичного застосування, зокрема, для лікування раку, включаючи різновиди запального раку та різновиди раку з інфільтрованими мієлоїдними клітинами (зокрема, з інфільтрованими MDSC й/або асоційованими з пухлиною макрофагами (TAM)).

АНТИТІЛА ДО SIRPa (З ЕПІТОПАМИ)

Відповідно до одного аспекту даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який специфічно зв'язується з щонайменше одним пептидом, що містить або складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDLTKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) і SEQ ID NO: 6 (YPQLQLTWLE), в межах SIRPa.

Якщо не зазначено інше, всі технічні та наукові терміни, використовуються у даному документі в значенні, що відповідає звичайному розумінню фахівця у відповідній області техніки.

Для зручності наведені значення деяких термінів і виразів, що використовуються в описі, прикладах і формулі винаходу.

У даному документі термін "антитіло" включає поліклональні антитіла, моноклональні антитіла або рекомбінантні антитіла.

У даному документі термін "моноклональне антитіло" призначений для позначення препарату молекул антитіл, тобто антитіл, що мають загальну амінокислотну послідовність важкого ланцюга та загальну амінокислотну послідовність легкого ланцюга, на відміну від препаратів "поліклональних" антитіл, які містять суміш антитіл з різною амінокислотною послідовністю. Моноклональні антитіла можуть бути отримані за допомогою декількох відомих технологій, таких як фаговий, бактеріальний, дріжджовий або рибосомний дисплей, а також за

допомогою класичних способів, прикладом яких є антитіла, отримані з гібридами. Відповідно, термін "моноклональний" використовується для позначення всіх антитіл, отриманих з одного клону нуклеїнової кислоти.

Антитіла згідно з даним винаходом включають рекомбінантні антитіла. У даному документі термін "рекомбінантне антитіло" відноситься до антитіл, які отримані, експресовані, створені або виділені за допомогою рекомбінантних засобів, таких як антитіла, які експресуються з використанням рекомбінантного вектора експресії, трансфікованого в клітину-хазяїна; антитіла, виділені з рекомбінантної, комбінаторної бібліотеки антитіл; антитіла, виділені з тварини (наприклад, миші), яка є трансгенною за генами імуноглобуліну людини; або антитіла, які отримані, експресовані, створені або виділені за допомогою будь-якого іншого способу, в якому конкретні послідовності генів імуноглобулінів (такі, як послідовності генів імуноглобулінів людини) з'єднані з іншими послідовностями ДНК. Рекомбінантні антитіла включають, наприклад, химерні та гуманізовані антитіла.

У даному документі термін "химерне антитіло" відноситься до антитіла, в якому послідовність варіабельного домену, що походить із зародкової лінії будь-якого виду ссавців, такого як миша, була щеплена на послідовність константного домену, що походить із зародкової лінії іншого виду ссавців, такого як людина.

У даному документі термін "гуманізоване антитіло" відноситься до антитіла, в якому послідовності гіперваріабельних ділянок (CDR), що походять із зародкової лінії іншого виду ссавців, такого як миша, були щеплені на каркасні послідовності людини.

У даному документі термін "антигензв'язуючий фрагмент антитіла" означає частину антитіла, тобто молекулу, що відповідає частині структури антитіла згідно з даним винаходом, яка проявляє антигензв'язуючу здатність у відношенні SIRPa, можливо, у нативній формі; такий фрагмент проявляє антигензв'язуючу специфічність відносно зазначеного антигена, ідентичну або по суті ідентичну антигензв'язуючій специфічності відповідного чотирьохланцюгового антитіла. Переважно антигензв'язуючі фрагменти мають афінність зв'язування, близьку до такої для відповідних 4-ланцюгових антитіл. Однак антигензв'язуючий фрагмент, що має антигензв'язуючу афінність, знижену у порівнянні з відповідними 4-ланцюговими антитілами, також включений в обсяг даного винаходу. Антигензв'язуюча здатність може бути визначена шляхом вимірювання афінності антитіла та цільового фрагмента. Такі антигензв'язуючі фрагменти також можуть бути позначені як "функціональні фрагменти" антитіл.

Антигензв'язуючі фрагменти антитіл являють собою фрагменти, які містять їх гіперваріабельні домени, позначені CDR (ділянки, що визначають комплементарність), або їх частини, що включають сайт розпізнавання для антигена, тобто позаклітинний домен SIRPa, визначаючи тим самим специфічність розпізнавання антигена.

Кожний варіабельний домен легкого та важкого ланцюгів (відповідно, VL і VH) чотирьохланцюгового імуноглобуліну містить три CDR, позначених VL-CDR1 (або LCDR1), VL-CDR2 (або LCDR2), VL-CDR3 (або LCDR3) і VH-CDR1 (або HCDR1), VH-CDR2 (або HCDR2), VH-CDR3 (або HCDR3), відповідно.

Фахівець в даній області техніки може визначити положення різних областей/ доменів антитіл згідно зі стандартними визначеннями, встановленими для цього, включаючи посилальну систему нумерації, див., наприклад систему нумерації Кабат (KABAT), або шляхом застосування алгоритму IMGT "перлинне намисто". У зв'язку з цим слід зазначити, що для визначення послідовностей згідно з даним винаходом, визначення границь областей/доменів може варіюватися між різними еталонними системами. Відповідно, області/домени, визначені у даному винаході, включають послідовності, які демонструють варіабельність довжини або положення розглянутих послідовностей у повномірній послідовності варіабельних доменів антитіл на приблизно $\pm 10\%$.

На підставі структури чотирьохланцюгових імуноглобулінів антигензв'язуючі фрагменти, відповідно, можна визначити шляхом порівняння з послідовностями антитіл у доступних базах даних і відомих у попередньому рівні техніки, і, зокрема, шляхом порівняння положення функціональних доменів у таких послідовностях, при цьому слід звернути увагу, що положення каркасних і константних доменів добре визначені для різних класів антитіл, особливо для IgG. зокрема, для IgG ссавців. Таке порівняння також включає дані, які стосуються тривимірних структур антитіл.

Для ілюстрації конкретних варіантів реалізації даного винаходу антигензв'язуючі фрагменти антитіла, які містять варіабельні домени, що містять CDR зазначеного антитіла, включають Fv, dsFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂. Фрагменти Fv складаються з доменів VL і VH антитіла, утримуваних разом гідрофобними взаємодіями; у фрагментах dsFv гетеродимер VH:VL стабілізований за допомогою дисульфідного зв'язку; у фрагментах scFv домени VL і VH з'єднані

між собою за допомогою гнучкого пептидного лінкера, утворюючи одноланцюговий білок. Фрагменти Fab являють собою мономірні фрагменти, які можуть бути отримані шляхом розщеплення антитіла папаїном; вони містять повний L-ланцюг і фрагмент VH-CH1 H-ланцюга, зв'язані між собою за допомогою дисульфідного зв'язку. Фрагмент F(ab')₂ може бути отриманий шляхом розщеплення антитіла пепсином нижче дисульфідного зв'язку в шарнірній області; він містить два фрагменти Fab' і додатково частину шарнірної області молекули імуноглобуліну. Фрагменти Fab' можуть бути отримані з фрагментів F(ab')₂ шляхом розрізування дисульфідного зв'язку в шарнірній області. Фрагменти F(ab')₂ є двовалентними, тобто вони містять два антигензв'язуючих сайти, подібно до нативної молекули імуноглобуліну; з іншого боку, фрагменти Fv (димер VHVL, який становить варіабельну частину Fab), dsFv, scFv, Fab і Fab' є одновалентними, тобто вони містять один антигензв'язуючий сайт. Зазначені основні антигензв'язуючі фрагменти згідно з даним винаходом можна комбінувати для отримання полівалентних антигензв'язуючих фрагментів, таких як діатіла, триатіла або тетратіла. Зазначені полівалентні антигензв'язуючі фрагменти також є частиною даного винаходу.

У даному документі термін "біспецифічні" антитіла відноситься до антитіл, які розпізнають два різні антигени, завдяки наявності щонайменше однієї області (наприклад такої, яка походить з варіабельної області першого антитіла), яка є специфічною відносно першого антигена, і щонайменше другої області (наприклад, яка походить з варіабельної області другого антитіла), яка є специфічною відносно другого антигена. Біспецифічне антитіло специфічно зв'язується з двома антигенами-мішенями і, відповідно, є одним типом поліспецифічного антитіла. Поліспецифічні антитіла, які розпізнають два або більше різних антигенів, можуть бути отримані методами рекомбінантної ДНК або включають, але не обмежуються ними, антитіла, отримані хімічним шляхом за допомогою будь-якого зручного способу. Біспецифічні антитіла включають всі антитіла або кон'югати антитіл, або полімерні форми антитіл, які здатні розпізнавати два різні антигени. Біспецифічні антитіла включають антитіла, які були відновлені та піддані зміні структури із збереженням їх двовалентних характеристик, й антитіл, які були хімічно з'єднані так, що вони можуть мати декілька сайтів розпізнавання антигенів для кожного антигена, так як BiME (біспецифічні антитіла, що підсилюють функцію макрофагів), BITE (біспецифічні антитіла, які активують Т-клітини), DART (антитіло, яке перенацілене, з подвійною афінністю); DNL (док-і-замок), DVD-Ig варіабельним доменом), HAS (сироватковий альбумін людини), kih (виступи-в-западнини).

Відповідно, біспецифічні антитіла згідно з даним винаходом спрямовані проти SIRPa та другого антигена.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначеного вище, який є біспецифічним.

Кілька досліджень, спрямованих на розробку терапевтичних антитіл, призвели до конструювання областей Fc для оптимізації властивостей антитіл, які дозволяють створювати молекули, які краще пристосовані для фармакологічної активності, потрібної від них. Область Fc антитіла опосередковує його період напіввиведення із сироватки крові й ефекторні функції, такі як комплементзалежна цитотоксичність (K3Ц), антитілозалежна клітинна цитотоксичність (A3КЦ) й антитілозалежний фагоцитоз клітин (A3Ф). Було показано, що декілька мутацій, розташованих на межі між доменами CH2 і CH3, такі як T250Q/M428L і M252Y/S254T/T256E+H433K/N434F, збільшують афінність зв'язування з FcRn і період напіввиведення IgG1 в умовах in vivo. Однак не завжди існує прямий взаємозв'язок між збільшенням зв'язування FcRn і поліпшеним періодом напіввиведення. Один із підходів до поліпшення ефективності терапевтичного антитіла полягає в збільшенні його стійкості в сироватці крові, що забезпечує більше високий рівень циркуляції, менш часте введення та зменшення доз. Модифіковані області Fc можуть бути бажаними для зниження або збільшення ефекторної функції антитіла. Для антитіл, які націлені на молекули на поверхні клітини, особливо молекули на імунних клітинах, потрібне усунення ефекторних функцій. І навпаки, для антитіл, призначених для застосування в онкології, збільшення ефекторних функцій може поліпшити терапевтичну активність. Чотири ізотипи IgG людини зв'язують активуючі рецептори Fcγ (FcγR1, FcγR1a, FcγR1b), інгібуючий рецептор FcγR2b і перший компонент системи комплементу (C1q) з різною афінністю, що призводить до дуже різних ефекторних функцій. Зв'язування IgG із FcγR або C1q залежить від залишків, розташованих в шарнірній області та домені CH2. Дві області домену CH2 є критичними для зв'язування з FcγR і C1q, і мають унікальні послідовності в IgG2 і IgG4.

У даному документі термін "модифіковане антитіло" відповідає молекулі, яка містить антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, причому зазначене моноклональне антитіло

або його функціональний фрагмент пов'язані з функціонально відмінною молекулою. Модифіковане антитіло згідно з даним винаходом може являти собою гібридний химерний білок або кон'югат, отриманий в результаті будь-якої підходящої форми приєднання, включаючи ковалентне приєднання, щеплення, хімічне зв'язування з хімічною або біологічною групою, або з молекулою, такою як полімер ПЕГ або інша захисна група, або молекула, що підходить для захисту від розщеплення протеазами в умовах *in vivo*, для поліпшення стабільності та/або періоду напіввиведення антитіла або функціонального фрагмента. При застосуванні подібних методик, особливо за допомогою хімічного зв'язку або щеплення, може бути отримане модифіковане антитіло, з'єднане з біологічно активною молекулою, причому зазначена активна молекула, наприклад, вибрана з токсинів, зокрема, екзотоксину *A Pseudomonas*, А-ланцюга рослинного токсину рицину або сапоринового токсину, особливо терапевтично активного інгредієнта, вектора (включаючи, зокрема, білковий вектор), яке підходить для націлювання антитіла або функціонального фрагмента на конкретні клітини або тканини в організмі людини, або воно може бути пов'язане з міткою або лінкером, особливо при застосуванні фрагментів антитіла. Пегілювання антитіла або його функціональних фрагментів являє собою особливо цікавий варіант реалізації, оскільки воно поліпшує умови доставки активної речовини хазяїнові, особливо для терапевтичного застосування. Пегілювання може бути сайтспецифічним, щоб запобігти небажаній взаємодії із сайтами розпізнавання антитіл або функціональних фрагментів, і може бути виконане з використанням високомолекулярного ПЕГ. Пегілювання може бути досягнуте за допомогою вільних залишків цистеїну, наявних у послідовності антитіла або функціонального фрагмента, або шляхом додавання вільних залишків цистеїну в амінокислотній послідовності антитіла або функціонального фрагмента.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначеного вище, який є модифікованим.

Макромолекули згідно з даним винаходом включають антитіла та їх фрагменти, а також включають штучні білки, пептиди та будь-які хімічні сполуки, що мають здатність зв'язувати антигени, яка імітує таку антитіл, які також називаються у даному документі антигензв'язуючі міметики антитіла. Підходящі білки включають афітини й антикаліни. Афітини являють собою штучні білки, які мають здатність селективно зв'язуватися з антигенами. Вони структурно походять з ДНК-сполучного білка Sac7d, виявленого в *Sulfolobus acidocaldarius*, мікроорганізмі, який належить до домену Архей. Бібліотека афітинів може бути створена шляхом рандомізації амінокислот на поверхні зв'язування Sac7d, наприклад, шляхом створення варіантів, які відповідають випадковим замінам 11 залишків сполучної контактної поверхні Sac7d, й отримана бібліотека білків може бути піддана раундам рибосомного дисплею, при цьому афінність може бути спрямована на різні мішені, такі як пептиди, білки, віруси та бактерії. Афітини являють собою міметики антитіл і розробляються в якості інструментів у біотехнології. Їх також застосовували в якості специфічних інгібіторів різних ферментів (Krehenbrink et al, J. mol. Biol., 383:5, 2008). Фахівець в даній області техніки може легко розробити антикаліни з необхідними сполучними властивостями з використанням способів, відомих в даній області техніки, зокрема, як описано в заявці на патент WO2008068637 і вищезгаданій публікації, зокрема, шляхом створення бібліотек фагового дисплея та/або рибосомного дисплея, і їх скринінгу з використанням антигена, розкритого у даному документі. Антикаліни є штучними білками, які здатні зв'язуватися з антигенами, як з білками, так і з невеликими молекулами. Вони являють собою міметики антитіл, які походять з ліпокалінів людини, які являють собою сімейство природних сполучних білків. Антикаліни приблизно у вісім разів менші за розміром, містять приблизно 180 амінокислот і мають масу приблизно 20 кДа (Skerra, Febs J., 275:11, 2008). Були створені бібліотеки фагового дисплея антикалінів, які дозволяють проводити скринінг і відбір, зокрема, антикалінів зі специфічними властивостями зв'язування. Фахівець в даній області техніки може легко розробити афітини з потрібними властивостями зв'язування з використанням способів, відомих в даній області техніки, зокрема, як описано у патенті EP 1270725 B1, патенті US8536307 B2 (Schlehuber and Skerra, Biophys. Chem., 96:2-3, 2002) і вищезгаданій публікації, зокрема, шляхом створення бібліотек фагового дисплея та/або рибосомного дисплея, і їх скринінгу з використанням антигена, розкритого у даному документі. Як антикаліни, так й афітини можуть бути отримані в ряді систем для експресії, включаючи бактеріальні системи експресії. Відповідно, даний винахід відноситься до афітинів, антикалінів й інших подібних міметиків антитіл, що мають ознаки антитіл, описаних у даному документі, зокрема, відносно зв'язування з SIRPa, інгібування взаємодії SIRPa з CD47, відсутності здатності зв'язуватися з SIRPg, відсутності здатності зв'язуватися з Т-клітинами, відсутності здатності інгібувати проліферацію Т-клітин, відсутності здатності інгібувати взаємодію SIRPg з

CD47, усі з яких включені в обсяг даного винаходу в якості макромолекул згідно з даним винаходом.

Усі варіанти реалізації, розкриті у даному документі відносно антитіл або їх фрагментів, перенесені, з відповідними змінами, на макромолекули згідно з даним винаходом, зокрема, на антигензв'язуючі міметики антитіл.

У даному документі термін "епітоп" означає частину антигена, з якою зв'язується антитіло. Епітопи білкових антигенів можна розділити на дві категорії: конформаційний епітоп і лінійний епітоп. Конформаційний епітоп відповідає переривчастим ділянкам амінокислотної послідовності антигена. Лінійний епітоп відповідає безперервній послідовності амінокислот з антигена.

Згідно з даним винаходом пептиди, які наявні в SIRPa, і ті, які зв'язані антитілами до SIRPa, є частиною епітопу, який специфічно розпізнається такими антитілами.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який специфічно зв'язується з щонайменше двома, трьома, чотирма або п'ятьма пептидами, що містять або складаються з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDLTKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) і SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE), в межах SIRPa.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який специфічно зв'язується з пептидом, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), в межах SIRPa, і з щонайменше одним пептидом, який містить або складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDLTKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) і SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE), в межах SIRPa.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який специфічно зв'язується з пептидами, що містять або складаються з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDLTKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) і SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE)), в межах SIRPa.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який специфічно зв'язується з щонайменше одним пептидом, що містить або складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 7 (GRELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 8 (KFRKGSPDDVE), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDLTKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) і SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE), в межах SIRPa.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який специфічно зв'язується з пептидами, що містять послідовність, представлену в SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 7 (GRELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 8 (KFRKGSPDDVE), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDLTKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) і SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE), в межах SIRPa.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який специфічно зв'язується з щонайменше одним пептидом, що містить або складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 9 (ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 10 (KFRKGSPDTE), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDLTKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) і SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE).

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який специфічно зв'язується з пептидами, що містять послідовність, представлену в SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 9 (ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 10 (KFRKGSPDTE), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDLTKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) і SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE), в межах SIRPa.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який специфічно зв'язується з щонайменше одним пептидом, що містить або складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 11 (GRELIYN), DVE, SEQ ID NO: 12 (HTVSFTCESHGFSPRDITLKW), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) і SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE), в межах SIRPa.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який специфічно зв'язується з пептидами, що містять послідовність, представлену в SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 11 (GRELIYN), DVE, SEQ ID NO: 12 (HTVSFTCESHGFSPRDITLKW), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) і SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE), в межах SIRPa.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який специфічно зв'язується з щонайменше одним пептидом, що містить або складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 13 (ARELIYN), SEQ ID NO: 12 (HTVSFTCESHGFSPRDITLKW), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) і SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE), в межах SIRPa.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який специфічно зв'язується з пептидами, що містять послідовність, представлену в SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 13 (ARELIYN), SEQ ID NO: 12 (HTVSFTCESHGFSPRDITLKW), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) і SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE), в межах SIRPa.

Пептиди, які містять послідовність, представлену в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 і SEQ ID NO: 13, відповідають лінійним епітопам.

Зазначені лінійні епітопи були ідентифіковані авторами даного винаходу за допомогою олігопептидного сканування на основі масивів (іноді названого скануванням пептидів, які перекриваються, або пепскан-аналізом). У цій методиці застосовують бібліотеку олігопептидних послідовностей, сегментів білка-мішені, що перекриваються та не перекриваються, і тестують її здатність зв'язувати антитіло, що викликає інтерес. Переривчасті епітопи можуть бути картовані з дуже високою надійністю та точністю (Gaseitsiwe et al., 2010-Clin Vaccine Immunol. Jan; 17(1): 168-175) шляхом комбінування послідовностей несуміжних пептидів із різних частин білка-мішені та забезпечення конформаційної твердості такого комбінованого пептиду (наприклад, з використанням каркасів CLIPS) (Timmennan et al., 2007, J Mol Recognit., Sep-Oct;20(5):283-99). Усі з випробовуваних антитіл згідно з даним винаходом, включаючи HEFLB, специфічно зв'язуються із зазначеними епітопами.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який специфічно зв'язується з конформаційним епітопом, що містить щонайменше один пептид, вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR), SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN) і SEQ ID NO: 72 (SPRDITLKW), в межах SIRPa.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який специфічно зв'язується з конформаційним епітопом, що містить або складається з пептидів, які містять послідовність, представлену в SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR), SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN) і SEQ ID NO: 72 (SPRDITLKW), в межах SIRPa.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який специфічно зв'язується з конформаційним епітопом, що містить щонайменше один пептид, вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR) і SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN).

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який специфічно зв'язується з конформаційним епітопом, що містить або складається з пептидів, які містять послідовність, представлену в SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR) і SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN), в межах SIRPa.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який специфічно зв'язується з конформаційним епітопом, що містить щонайменше один пептид, вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NO: 73 (YNQK) і "SIR", в межах SIRPa.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який специфічно зв'язується з конформаційним епітопом, що містить або складається з пептиду, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 73 (YNQK), і пептиду, що має амінокислотну послідовність SIR, в межах SIRPa.

Пептиди, які містять послідовність, представлену в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, і SIRP, відповідають конформаційним епітопам. Зазначені конформаційні епітопи були визначені авторами даного винаходу з використанням процедур захисту від протеолізу (ферментативне розщеплення: розщеплення хімотрипсином, трипсином комплексу антитіло-антиген, іммобілізованого на носії для афінної хроматографії) з подальшим дослідженням методом мас-спектрометрії (MALDI-TOF/TOF) для детектування та визначення послідовності таких пептидів, що представляють інтерес, як добре відомо фахівцю в даній області техніки (Van de Water et al., Clinical Immunology and Immunopathology, 1997, vol. 85). В якості антигена застосовували SIRPa людини (номера доступу MP_542970), й одне з використовуваних антитіл згідно з даним винаходом являло собою варіант HEFLB.

Антитіло до SIRPa або його антигензв'язуючий фрагмент, або антигензв'язуючий міметик антитіла згідно з даним винаходом специфічно зв'язується із зазначеними конформаційними епітопами, які містять або складаються із зазначених пептидів в їх конформаційному угрупованні в межах нативного SIRPa.

Пептид, який містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 73 (YNQK), відповідає пептиду, який складається з амінокислот у положенні 80-83 в амінокислотній послідовності SIRPa людини, що характеризується своїм номером доступу NP_542970.

Пептид, що має амінокислотну послідовність SIR, пептид SIR, відповідає пептиду, який складається з амінокислот у положенні 105-107 в амінокислотній послідовності SIRPa людини, яка зазначена під номером доступу NP_542970.

У даному документі термін "SIRPa" відноситься до білка SIRPa з виду ссавців, переважно до SIRPa людини (наприклад, номера доступу NP_542970 (P78324) і CAA71403).

У даному документі термін "антитіло до SIRPa" відноситься до антитіла, яке специфічно зв'язується з SIRPa, зокрема, з SIRP людини.

Специфічне зв'язування антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента згідно з даним винаходом й епітопу (або області, що містить епітоп) має на увазі, що антитіла проявляють детектовану афінність по відношенню до епітопу (області, що містить епітоп) на конкретному білку або антигені (у даному документі SIRPa). "Детектована афінність" включає зв'язування з афінністю приблизно 10^{-9} M (Kd) або сильніше. Переважно зв'язування вважається специфічним, якщо афінність зв'язування становить від 10^{-9} M до 10^{-12} M, необов'язково від 10^{-9} M до 10^{-10} M, зокрема, 10^{-10} M. Специфічність взаємодії або зв'язування сполучного домену з мішенню може бути легко досліджена, крім усього іншого, шляхом порівняння взаємодії зазначеного сполучного домену з білком-мішенню або антигеном із взаємодією зазначеного сполучного домену з білками або антигенами, відмінними від білків-мішеней.

Афінність може бути визначена різними способами, добре відомими фахівцю в даній області техніки. Підходящі способи включають, але не обмежуються ним, дослідження за допомогою системи Biotec, за допомогою системи Blitz™ і графік Скетчарда.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, що має значення Kd нижче 10^{-9} M, переважно нижче 10^{-10} M у відношенні SIRPa, більше переважно нижче 10^{-10} M, зокрема, згідно з даними дослідження за допомогою системи Biotec.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який зменшує взаємодію SIRPa з CD47.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який частково або повністю, зокрема, повністю, інгібує зв'язування CD47 з SIRPa, зокрема, зв'язування CD47 людини з SIRPa людини.

Таке антитіло згідно з даним винаходом специфічно зв'язується з SIRPa й є антагоністом взаємодії SIRPa з CD47.

Зокрема, антагоністичне антитіло до SIRPa згідно з даним винаходом здатне знижувати або інгібувати зв'язування CD47 з SIRPa щонайменше на 50 %, 60 %, 70 %, переважно на 80 %, більше переважно на 90 % або найбільше переважно на 100 %, у порівнянні з молекулою для негативного контролю, в кількісному дослідженні зв'язування.

Зокрема, антагоністичне антитіло до SIRPa згідно з даним винаходом здатне знижувати або інгібувати зв'язування CD47 з SIRPa на 50-100 %, переважно на 60-90 %, більше переважно на 70-80 %, у порівнянні з молекулою для негативного контролю, в кількісному дослідженні зв'язування.

Способи визначення специфічності й афінності антитіл шляхом конкурентного інгібування відомі в даній області техніки (див., наприклад, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1998); Colligan et al., *Current Protocols in Immunology*, Green Publishing Assoc, NY (1992; 1993); Muller, *Meth. Enzym.*, 92:589-601 (1983)) й описані у прикладах нижче.

Підходящі способи включають, але не обмежуються ними, дослідження за допомогою системи Biacore, за допомогою системи BLItz™, проточну цитометрію та твердофазний імуоферментний аналіз (ІФА).

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa, визначеного вище, що має значення IK_{50} нижче 500 нг/мл, зокрема, нижче 400 нг/мл, 300 нг/мл, більше конкретно нижче 200 нг/мл, визначене в кількісному дослідженні конкурентного зв'язування CD47 й антитіла до SIRPa з SIRPa методом ІФА.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa, визначеного вище, що має значення IK_{50} нижче 500 нг/мл, зокрема, нижче 400 нг/мл, 300 нг/мл, більше конкретно нижче 200 нг/мл, нижче 150 нг/мл і навіть більше конкретно нижче 100 нг/мл, визначене на моноцитах людини в кількісному дослідженні конкурентного зв'язування CD47 й антитіла до SIRPa методом цитометрії.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який не зв'язується специфічно з SIRPg, переважно з SIRPg людини.

Таке антитіло згідно з даним винаходом не впливає на або не запобігає взаємодії SIRPg з CD47.

У даному документі термін "SIRPg" відноситься до сигнального регуляторного білка гамма (також називаного SIRP гамма, CD172g або SIRP-бета 2) з виду ссавців, переважно до SIRPg людини.

Еталонна послідовність білка SIRPg людини, використана у прикладах даної заявки, відповідає послідовності, асоційованій з номером доступу Q9P1W8.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, що має значення KD переважно 10^{-9} M, що переважно перевершує 10^{-8} M, що більше переважно перевершує 10^{-7} M у відношенні SIRPg, зокрема, визначене за допомогою системи BLItz™.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який не виявляє значної інгібіторної або антагоністичної дії на зв'язування CD47 з SIRP-g, який не конкурує в значній мірі з CD47 за зв'язування з SIRPg.

Такий антагоністичний ефект може бути визначений з використанням способів, зазначених у прикладах даної заявки.

Згідно з даним винаходом мається на увазі, що антитіло (або його антигензв'язуючий фрагмент, або антигензв'язуючий міметик антитіла) не виявляє антагоністичної дії на зв'язування CD47 з SIRPg, якщо зазначене антитіло (або його антигензв'язуючий фрагмент, або антигензв'язуючий міметик антитіла) не індукує збільшення, або індукує збільшення менше 1 log, значення K_D CD47 в кількісному дослідженні конкурентного зв'язування SIRPg за допомогою системи BLItz™.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, зокрема, з $CD3^+$ Т-клітинами.

Зокрема, антитіло до SIRPa або його антигензв'язуючий фрагмент, або антигензв'язуючий міметик антитіла згідно з даним винаходом не зв'язується з Т-клітинами з виду ссавців, зокрема, з Т-клітинами людини.

Зокрема, вважається, що антитіло до SIRPa (або його антигензв'язуючий фрагмент, або антигензв'язуючий міметик антитіла) не зв'язується специфічно з Т-клітинами людини, якщо у популяції Т-клітин людини, виділених з моноклеарних клітин периферичної крові (МКПК) від здорового донора, менше ніж 10 %, переважно менше ніж 5 %, більше переважно менше ніж 2 %, найбільше переважно менше ніж 1 % популяції Т-клітин людини розпізнаються зазначеним антитілом до SIRPa (або його антигензв'язуючим фрагментом, або антигензв'язуючим міметиком антитіла).

Цей ефект може бути виміряний за допомогою способів, описаних у прикладах даної заявки.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який не інгібує в значній мірі проліферацію Т-клітин, зокрема, CD3⁺ Т-клітин, переважно клітин з видів ссавців і більше переважно Т-клітин людини.

Зокрема, вважається, що антитіло до SIRPa не інгібує в значній мірі проліферацію Т-клітин, якщо проліферація Т-клітин знижена менше ніж на 30 %, переважно менше ніж на 20 %, більше переважно менше ніж на 10 %, найбільше переважно менше ніж на 5 % у порівнянні з негативним контролем.

Проліферація Т-клітин може бути визначена різними способами. Наприклад, проліферація Т-клітин може бути виміряна шляхом вбудовування Н³-тимідину, як описано у прикладах даної заявки.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який не виявляє значної інгібіторної, антагоністичної дії на зв'язування білків сурфактанта з SIRPa, й який не конкурує значною мірою з білками сурфактанта за зв'язування з SIRPa.

У даному документі "білки сурфактанта" являють собою колагенвмісні лектини С-типу (залежні від кальцію), які вносять значний внесок у підтримку гомеостазу сурфактанта й імунітету легенів (для огляду див. Kishore et al., Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors, Mol Immunol, 43(9), 1293-315, 2006).

У даному документі термін "білок сурфактанта" відноситься до білка сурфактанта з виду ссавців, переважно до білка сурфактанта людини.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який не інгібує зв'язування білка сурфактанта людини D (SP-D) з SIRPa.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який не інгібує зв'язування білка сурфактанта людини A (SP-A) з SIRPa.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який не виявляє антагоністичної дії на взаємодію білків сурфактанта з SIRPa.

Конкуренція між SIRPa та білками сурфактанта може бути визначена за допомогою кількісного дослідження конкурентного зв'язування з використанням способів, добре відомих фахівцям в даній області техніки. Підходящі способи включають, але не обмежуються ними, дослідження за допомогою системи Bioscore, за допомогою системи BLItz™ і кількісне дослідження методом ІФА.

Згідно з даним винаходом вважається, що антитіло (або його антигензв'язуючий фрагмент, або антигензв'язуючий міметик антитіла) не виявляє антагоністичної дії на зв'язування білка сурфактанта з SIRPa, якщо зазначене антитіло (або його антигензв'язуючий фрагмент, або антигензв'язуючий міметик антитіла) не індукує збільшення, або індукує збільшення менше 1 log, значення K₀ білка сурфактанта в кількісному дослідженні конкурентного зв'язування SIRPa за допомогою системи BLItz™.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який слабо зв'язується або не зв'язується специфічно з SIRPb.

У даному документі термін "SIRPb" відноситься до білка SIRPb (також називаного SIRPβ, сигнальний регуляторний білок бета-1, SIRP-бета-і, член подібного з CD 172-антигеном сімейства B або CD172b) з виду ссавців, переважно SIRPb людини.

Еталонна послідовність білка SIRPb людини, використана у прикладах даної заявки, відповідає послідовності, асоційованої з номером доступу Q5TFQ8-1.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного

вище, що має значення KD переважно 10^{-9} М, що переважно перевершує 10^{-8} М у відношенні SIRPb, зокрема, визначене за допомогою системи BLItz™.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигезв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який містить:

а) важкий ланцюг, що містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3, і/або

б) легкий ланцюг, що містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3, причому зазначені CDR визначені наступним чином:

- HCDR1, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ

ID NO: 14(SYWVH),

- HCDR2, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 15 (NIDPSDSDTHYNQKFKD) або SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG),

- HCDR3, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 17 (GGTGTMAWFAY), SEQ ID NO: 18 (GGTGTMAWFAY), SEQ ID NO: 19 (GGTGTMAWFAY) або SEQ ID NO: 20 (GGTGTMAWFAY),

- LCDR1, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

- LCDR2, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), і

- LCDR3, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 23 (FQGTHTVPT).

18D5/Варіант А/Варіант В

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигезв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який містить:

а) важкий ланцюг, що містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3, і/або

б) легкий ланцюг, що містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3, причому зазначені CDR визначені наступним чином:

- HCDR1, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ

ID NO: 14(SYWVH),

- HCDR2, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 15 (NIDPSDSDTHYNQKFKD),

- HCDR3, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 17 (GGTGTMAWFAY),

- LCDR1, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

- LCDR2, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), і

- LCDR3, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 23 (FQGTHTVPT).

Варіант С

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигезв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який містить:

а) важкий ланцюг, що містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3, і/або

б) легкий ланцюг, що містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3. причому зазначені CDR визначені наступним чином:

- HCDR1, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 14(SYWVH),

- HCDR2, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG),

- HCDR3, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 17 (GGTGTMAWFAY),

- LCDR1, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

- LCDR2, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), і

- LCDR3, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 23 (FQGTHTVPT).

Варіант Е

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигезв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який містить:

- а) важкий ланцюг, що містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3, і/або
 5 б) легкий ланцюг, що містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3, причому зазначені CDR визначені наступним чином:

- HCDR1, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої bSEQ1DNO:14(SYWVH),

10 - HCDR2, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG),

- HCDR3, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 18 (GGTGTALWFAY),

- LCDR1, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

15 - LCDR2, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), і

- LCDR3, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 23 (FQGTHTVPYT).

Варіант F

- 20 Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигезв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який містить:

а) важкий ланцюг, що містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3, і/або

- 25 б) легкий ланцюг, що містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3, причому зазначені CDR визначені наступним чином:

- HCDR1, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 14(SYWVH).

- HCDR2, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG),

30 - HCDR3, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 19 (GGTGTALWFAY),

- LCDR1, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

35 - LCDR2, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), і

- LCDR3, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 23 (FQGTHTVPYT).

Варіант EF

- 40 Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигезв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який містить:

а) важкий ланцюг, що містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3, і/або

- 45 б) легкий ланцюг, що містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3, причому зазначені CDR визначені наступним чином:

- HCDR1, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 14 (SYWVH),

- HCDR2, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG),

50 - HCDR3, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 20 (GGTGTALWFAY),

- LCDR1, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

- LCDR2, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), і

55 - LCDR3, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 23 (FQGTHTVPYT).

Антитіла до SIRPa згідно з даним винаходом можуть містити варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність HCDR1 і/або HCDR2, і/або HCDR3 з антитілом людини згідно з даним винаходом; і/або варіабельну область легкого ланцюга, що містить

амінокислотну послідовність LCDR1 і/або LCDR2, і/або LCDR3 з антитілом людини згідно з даним винаходом.

Відповідно до одного варіанта реалізації даного винаходу, антитіло містить варіант амінокислотної послідовності одного або більше CDR із запропонованих антитіл людини, причому зазначений варіант містить одну або більше вставок амінокислот в або поруч із залишком CDR і/або делецій в або поруч із залишком CDR, і/або заміну залишку (ів) CDR (при цьому заміна (заміни) є бажаним типом зміни амінокислоти для отримання зазначених варіантів).

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який містить:

- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, вибраної з послідовностей, представлених в SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 і SEQ ID NO: 30, і/або

- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 і SEQ ID NO: 33.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який містить:

- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 і SEQ ID NO: 30, і

- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 і SEQ ID NO: 33.

Послідовності конкретних варіабельних доменів наведені в таблиці 1 нижче.

Таблиця 1

Приклади варіабельних доменів важкого ланцюга та варіабельних доменів легкого ланцюга антитіла відповідно до даного винаходу

Варіабельний домен важкого ланцюга антитіла дикого типу (химерне антитіло та мишаче антитіло 18D5)	QVQLQQPGAEIVRPGSSVKLSCKASGYTFTS YWVHWYKQRPIQGLEWIGNIDPSDSSTHYN QKFKDKASLTVDKSSSTAYMQLSSLTFEDSA VYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTVSA	SEQ ID NO: 24
Варіабельний домен важкого ланцюга гуманізованого варіанта (HA)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYTFTS YWVHWVRQMPGKGLEWIGNIDPSDSSTHY NPKFKDHVTLSDKSIATYQLSSLKASDT AMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTVS S	SEQ ID NO: 25
Варіабельний домен важкого ланцюга гуманізованого варіанта (HB)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTFTS YWVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPSDSSTH YNPKFKDHVTLSDKSIATYQLSSLKASD TAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTV SS	SEQ ID NO: 26

Таблиця 1 (продовження)

Варіабельний домен важкого ланцюга гуманізованого варіанта (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTF YVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPDSSTH YSPSFQGHVTLSDVKSISTAYLQLSSLKASDT AMYVCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 27
Варіабельний домен важкого ланцюга гуманізованого варіанта (HE)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTF YVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPDSSTH YSPSFQGHVTLSDVKSISTAYLQLSSLKASDT AMYVCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 28
Варіабельний домен важкого ланцюга гуманізованого варіанта (HF)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTF YVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPDSSTH YSPSFQGHVTLSDVKSISTAYLQLSSLKASDT AMYVCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 29
Варіабельний домен важкого ланцюга гуманізованого варіанта (HEF)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTF YVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPDSSTH YSPSFQGHVTLSDVKSISTAYLQLSSLKASDT AMYVCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 30
Легкий ланцюг антитіла дикого типу (химерне антитіло та мишаче антитіло 18D5)	DVVMVTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQSLVH SYGNTYLYWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFS GVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYF CFQGTHVPYTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO: 31
Варіабельний домен легкого ланцюга гуманізованого варіанта A (LA)	DVVMVTQSPSLPVT LGQPASISCRSSQSLVHS YGNTYLYWYQQRPGQSPRLIYRVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC FQGTHVPYTFGGGKVEIK	SEQ ID NO: 32
Варіабельний домен легкого ланцюга гуманізованого варіанта (LB)	DVVMVTQSPSLPVT LGQPASISCRSSQSLVHS YGNTYLYWFQQRPGQSPRLIYRVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC FQGTHVPYTFGGGKVEIK	SEQ ID NO: 33

Послідовності варіабельних доменів антитіл, наведених як приклад у даному винаході, можуть бути встановлені з комбінацій послідовностей, представлених в таблиці 2.

Таблиця 2

Варіабельний домен важкого ланцюга та варіабельний домен легкого ланцюга специфічних антитіл згідно з даним винаходом

Антитіло	Варіабельний домен важкого ланцюга	Варіабельний домен легкого ланцюга
18D5 (химерне антитіло та мишаче антитіло)	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 31
HALA	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 32
HALB	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 33
HBLA	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 32
HBLB	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 33
HCLA	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 32
HCLB	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 33
HELA	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 32
HELB	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 33
HFLA	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 32
HFLB	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 33
HEFLA	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 32
HEFLB	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 33

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигезв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який містить варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 33.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигезв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який містить:

- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 33, і

- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 і SEQ ID NO: 30,

переважно

- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NO: 29 і SEQ ID NO: 30,

більше переважно

- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NO: 30.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигезв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який містить:

- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 24, і

- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 31,

або

- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 25, і

- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 32,

або

- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 25, і

- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 33,

або

- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 26, і
- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 32,
- 5 або
- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 26, і
- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 33,
- 10 або
- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 27, і
- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 32,
- 15 або
- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 27, і
- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 33,
- 20 або
- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 28, і
- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 32,
- 25 або
- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 28, і
- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 33,
- 30 або
- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 29, і
- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 32,
- 35 або
- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 29, і
- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 33,
- 40 або
- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 30, і
- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 32,
- 45 або
- варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 30, і
- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 33.
- 50 Відповідно до одного варіанта реалізації даного винаходу, антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, або антигензв'язуючий міметик антитіла не містить заміну амінокислоти W у положенні 33 (W33) у варіабельному домені важкого ланцюга, причому зазначене положення ідентифіковане по відношенню до послідовностей, представлених в SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 або
- 55 SEQ ID NO: 30, і/або не містить заміну амінокислоти Y у положенні 39 (Y39), R у положенні 55 (R55) і/або F у положенні 60 (F60) у варіабельному домені легкого ланцюга, причому зазначені положення ідентифіковані стосовно послідовностей, представлених в SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 або SEQ ID: 33, зокрема, не містить заміну у положенні W33 у варіабельному домені важкого ланцюга та не містить заміну у положенні Y39, R55 і F60 у варіабельному домені
- 60 легкого ланцюга.

Згідно з даним винаходом, антитіла можуть бути отримані з будь-якими константними доменами важкого ланцюга та легкого ланцюга.

Відповідно до одного варіанта реалізації даного винаходу, антитіло до SIRPa людини відповідно до даного винаходу являє собою гуманізоване моноклональне антитіло, зокрема, в якому константний домен легкого ланцюга антитіла походить з константного домену легкого каппа-ланцюга людини, більше конкретно, в якому константний домен легкого ланцюга складається з послідовності, представленої в SEQ ID NO: 35, і в якому константний домен важкого ланцюга антитіла походить з константного домену важкого ланцюга IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 (дикого типу або мutowаного варіанта), зокрема, з константного домену важкого ланцюга IgG4 людини, більше конкретно, в якому константний домен важкого ланцюга антитіла складається з послідовності, представленої в SEQ ID NO:34.

Як відомо фахівцю в даній області техніки, вибір ізотипів IgG константної області важкого ланцюга зосереджений на тому, чи є необхідними конкретні функції, і чи потребується підходящий період напіввиведення в умовах *in vivo*. Наприклад, антитіла, сконструйовані для селективної ерадикації ракових клітин, як правило, потребують активного ізо типу, який дозволяє активувати систему комплементу й опосередковувати ефекторними клітинами знищення клітин за допомогою антитілозалежної клітинної цитотоксичності. Обидва ізо типи IgG1 і IgG3 людини (що мають більше короткий період напіввиведення) відповідають цим критеріям, зокрема, ізо тип IgG1 людини (дикий тип і варіанти). Зокрема, залежно від ізо типу IgG константного домену важкого ланцюга (зокрема, дикого типу та варіантів ізо типу IgG1 людини), антитіло до SIRPa людини згідно з даним винаходом може бути цитотоксичним стосовно клітин, експресуючих SIRPa, за допомогою механізму K3Ц, A3KЦ й/або A3Ф (Salfeld, nature biotechnology, vol. 25, № 12, 2007; Irani et al. Molecular Immunology, vol. 67, issue 2, part A, 2015). Фактично фрагмент імуноглобуліну (Fc), що кристалізується, взаємодіє з рядом допоміжних молекул, щоб опосередковувати непрямі ефекторні функції, такі як антитілозалежна клітинна цитотоксичність (A3KЦ), антитілозалежний фагоцитоз клітин (A3Ф) і комплементзалежна цитотоксичність (K3Ц).

Таблица 3

Приклади константного домену важкого ланцюга та константного домену легкого ланцюга, які підходять для антитіл відповідно до даного винаходу

Константний домен важкого ланцюга (IgG4m-S228P) SEQ ID NO:34	ASTKQPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPFVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK
Константний домен легкого ланцюга (CL каппа) SEQ ID NO:35	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa, зазначеного вище, яке містить:

- важкий ланцюг, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 56, і
- легкий ланцюг, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 57,
- або
- важкий ланцюг, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 36, і
- легкий ланцюг, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 43,

[illegible]

Таблиця 4

Послідовності важкого ланцюга та легкого ланцюга конкретних антитіл відповідно до даного винаходу

Важкий ланцюг антитіла дикого типу (мишаче антитіло 18D5)	QVQLQQPGAELVRPGSSSVKLSCKASGYTFTS YVYVHWVKQRPIQGLEWIGNIDPSDSDTHYN QKFKDKASLTVDKSSSTAYMQLSSLTFEDSA VYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSA AKTTPPSVYPLAPGCGDTTQSSVTLGCLVKG YFPESVTVTWNSGSLSSSVHTFPALLQSGLY TMSSSVTVPSSTWPSQTVTCVAHPASSTTV DKKLEPSGPISTINPCPPCKECKCPA PNLEGOPSVFIFPPNIKDVLMSLTTPKVTCCV VDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHR EDYNSTIRVVSTLPIQHQQDWMSGKEFKCKV NNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILPPP AEQLSRKDVSLTCLVVGFNPDISVEWTSNGHT EENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKW EKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK	SEQ ID NO: 56
Важкий ланцюг антитіла дикого типу (химерне антитіло 18D5)	QVQLQQPGAELVRPGSSSVKLSCKASGYTFTS YVYVHWVKQRPIQGLEWIGNIDPSDSDTHYN QKFKDKASLTVDKSSSTAYMQLSSLTFEDSA VYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSA ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG K	SEQ ID NO: 36

Таблиця 4 (продовження)

Важкий ланцюг гуманізованого варіанта (HA)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYTFTS YWVHWVRQMPGKGLEWIGNIDPSDSDTHY NQKFKDHVTLSDVKSISTAYLQLSSLKASDT AMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKFREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	SEQ ID NO: 37
Важкий ланцюг гуманізованого варіанта (HB)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTS YWVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPSDSDTH YNQKFKDHVTLSDVKSISTAYLQLSSLKASD TAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKY TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKFREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK	SEQ ID NO: 38

Таблица 4 (продовження)

Важкий ланцюг гуманізованого варіанта (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTF YVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPSDSSTH YSPSFQGHVTLSDVKSISTAYLQLSSLKASDT AMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	SEQ ID NO: 39
Важкий ланцюг гуманізованого варіанта (HE)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTF YVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPSDSSTH YSPSFQGHVTLSDVKSISTAYLQLSSLKASDT AMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYT NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	SEQ ID NO: 40

Таблица 4 (продовження)

Важкий ланцюг гуманізованого варіанта (HF)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTF YVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPSDSSTH YSPSFQGHVTLSDVKSISTAYLQLSSLKASDT AMYYCVRGGTGTMAFYAYWGQGTLLTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	SEQ ID NO: 41
Важкий ланцюг гуманізованого варіанта (HEF)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTF YVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPSDSSTH YSPSFQGHVTLSDVKSISTAYLQLSSLKASDT AMYYCVRGGTGTLAYFYAYWGQGTLLTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	SEQ ID NO: 42

Таблица 4 (продовження)

Легкий ланцюг антитіла дикого типу (мишаче антитіло 18D5)	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVH SYGNTYLYWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYF CFQGTHVPYTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFP PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDSYSTMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNR NEC	SEQ ID NO: 57
Легкий ланцюг антитіла дикого типу (химерне антитіло 18D5)	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVH SYGNTYLYWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYF CFQGTHVPYTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 43
Варіабельний домен легкого ланцюга гуманізованого варіанта A (LA)	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHS YGNTYLYWYQQRPGQSPRLIYRVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC FQGTHVPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 44
Варіабельний домен легкого ланцюга гуманізованого варіанта (LB)	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHS YGNTYLYWFQQRPGQSPRLIYRVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC FQGTHVPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 45

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який здатний індукувати диференціювання моноцитарних супресорних клітин мієлоїдного походження (Mo-MDSC) в несупресорні клітини.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який характеризується тим, що зазначені несупресорні клітини секретують прозапальні цитокіни, такі як IL-6, IL-12 і ФНП, і не секретують або секретують з низькими рівнями

5

протизапальні цитокіни, такі як IL-10 і ФРО-β.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який характеризується тим, що зазначені несупресорні клітини експресують iNOS.

10

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який характеризується тим, що зазначені несупресорні клітини не експресують маркери ГКГС класу II й експресують маркери CD80-CD86.

15

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, який характеризується тим, що зазначені несупресорні клітини експресують щонайменше один маркер природних клітин-кілерів (NK-клітин).

20

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, причому зазначене антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент здатний інгібувати поляризацію макрофагів за фенотипом M2 і/або сприяє поляризації протизапальних макрофагів за фенотипом M1.

25

Антитіла згідно з даним винаходом можуть модифікувати поляризацію макрофагів, щоб індукувати протизапальне середовище, тобто вони можуть інгібувати протизапальний сигнал, забезпечуваний макрофагами M2-типу, і/або можуть сприяти протизапальному сигналу, забезпечуваному макрофагами M1-типу. Цей підхід дозволяє відновити запальне середовище, сприятливе для дії ефektorних Т-клітин, зокрема, для усунення ракових клітин.

АНТИТІЛА ДО SIRPa

Варіанти реалізації, згадані для антитіл, зазначених вище, повторюються, з необхідними змінами, для антитіл, згаданих в інших аспектах даного винаходу.

30

Згідно з іншим аспектом даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який специфічно зв'язується з конформаційним епітопом, що містить щонайменше один пептид, вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR), SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN) і SEQ ID NO: 72 (SPRDITLKW), в межах SIRPa.

35

Згідно з іншим аспектом даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який специфічно зв'язується з конформаційним епітопом, що містить або складається з пептидів, які містять послідовність, представлену в SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR), SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN) і SEQ ID NO: 72 (SPRDITLKW), в межах SIRPa.

40

Згідно з іншим аспектом даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який специфічно зв'язується з конформаційним епітопом, що містить щонайменше один пептид, вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR) і SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN).

45

Згідно з іншим аспектом даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який специфічно зв'язується з конформаційним епітопом, що містить або складається з пептидів, які містять послідовність, представлену в SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR) і SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN), в межах SIRPa.

50

Згідно з іншим аспектом даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який специфічно зв'язується з конформаційним епітопом, що містить щонайменше один пептид, вибраний з групи, яка складається з послідовностей SEQ ID NO: 73 (YNQK) і SIR.

55

Згідно з іншим аспектом даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який специфічно зв'язується з конформаційним епітопом, що містить або складається з пептидів, які містять послідовність SEQ ID NO: 73 (YNQK) і SIR, в межах SIRPa.

Згідно з іншим аспектом даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який містить:

а) важкий ланцюг, що містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3, і/або

б) легкий ланцюг, що містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3, причому зазначені CDR визначені наступним чином:

- HCDR1, який містить або складається з пептиду, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 14 (SYWVH),

5 - HCDR2, який містить або складається з пептиду, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15 (NIDPSDSDTHYNQKFKD) або SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG),

- HCDR3, який містить або складається з пептиду, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 17 (GGTGTMAWFAY), SEQ ID NO: 18 (GGTGTLAWFAY), SEQ ID NO: 19 (GGTGTMAWFAY) або SEQ ID NO: 20 (GGTGTLAYFAY),

10 - LCDR1, який містить або складається з пептиду, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

- LCDR2, який містить або складається з пептиду, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), і

15 - LCDR3, який містить або складається з пептиду, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 23 (FQGTHVPYT).

Даний винахід також відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й/або який не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg, зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa, й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg.

Згідно з іншим аспектом даний винахід відноситься до:

25 - антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначеного вище, або

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, і/або не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

для застосування в якості лікарського засобу.

35 Даний винахід також відноситься до способу лікування суб'єкта, що потребує цього, який включає введення зазначеному суб'єкту ефективної кількості:

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначених вище, або

40 - антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й/або який не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg.

45 Даний винахід також відноситься до застосування:

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначених вище, або

50 - антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й/або який не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg, зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

55 у виготовленні лікарського засобу.

Згідно з іншим аспектом даний винахід відноситься до:

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначеного вище, або

60 - антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з

SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й/або який не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

для застосування в лікуванні будь-якого стану, який може бути поліпшений або попереджений за допомогою диференціювання моноцитарних супресорних клітин мієлоїдного походження (Mo-MDSC) в несупресорні клітини.

У даному документі "стан, який може бути поліпшений або попереджений за допомогою диференціювання моноцитарних супресорних клітин мієлоїдного походження (Mo-MDSC) в несупресорні клітини" відповідає раку, включаючи різновиди запального раку та різновиди раку з інфільтрованими мієлоїдними клітинами (зокрема, з інфільтрованими MDSC і/або TAM), інфекційне захворювання, травму, аутоімунне захворювання (таке як ревматоїдний артрит, цукровий діабет 1 типу, вовчанка, псоріаз), вакцинацію, хронічні запальні захворювання (такі як запальні захворювання кишечника, включаючи хворобу Крона та виразковий коліт), септичний шок, хронічне інфекційне захворювання (таке як захворювання, викликане *Pseudomonas* або ЦМВ), фіброз, атеросклероз або дисфункції трансплантата.

Даний винахід також відноситься до способу лікування будь-якого стану, який може бути поліпшений або попереджений за допомогою диференціювання моноцитарних супресорних клітин мієлоїдного походження (Mo-mdsc) в несупресорні клітини в суб'єкта, що потребує цього, який включає введення зазначеному суб'єкту ефективної кількості:

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначених вище, або

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й/або який не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg.

Даний винахід також відноситься до застосування:

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначених вище, або

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й/або який не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

у виготовленні лікарського засобу для лікування будь-якого стану, який може бути поліпшений або попереджений шляхом диференціювання моноцитарних супресорних клітин мієлоїдного походження (Mo-MDSC) в несупресорні клітини.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до:

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначеного вище, або

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й/або який не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

для застосування в лікуванні будь-якого стану, який може бути поліпшений або попереджений шляхом модифікації поляризації макрофагів у протизапальні макрофаги.

Фактично, SIRPa діє як інгібітор контрольної точки та бере участь у поляризації макрофагів. Зокрема, блокування SIRPa індукуює прозапальну функцію макрофагів, пов'язану з макрофагами типу 1 (прозапальними макрофагами типу M1 = M (IFN- γ)), й інгібує супресорну активність макрофагів у пухлині, оскільки прозапальний профіль макрофагів отриманий за рахунок макрофагів типу 2 (висока фагоцитарна активність макрофагів типу M2 = M (IL-4)). Відповідно,

антагоніст SIRPa здатний інгібувати поляризацію макрофагів за фенотипом M2 і/або сприяє прозапальній функції макрофагів типу M1, і може застосовуватися в терапії.

Як визначено у даному документі, "стан, який може бути поліпшений або попереджений шляхом модифікації поляризації макрофагів із переважним утворенням прозапальних макрофагів", відповідає, наприклад, солідному раку, гемобластозу, інфекційному захворюванню, травмі, аутоімунному захворюванню, вакцинації, ушкодженню головного мозку, ушкодженню нервів, поліцитемії, гемохроматозу або хронічному запальному захворюванню.

Даний винахід також відноситься до способу лікування будь-якого стану, який може бути поліпшений або попереджений шляхом модифікації поляризації макрофагів у протизапальні макрофаги в суб'єкта, що потребує цього, який включає введення зазначеному суб'єкту ефективною кількістю:

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначених вище, або

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й/або який не інгібує проліферацію Т-клітин. і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

- зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід також відноситься до застосування:

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначених вище, або

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й/або який не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg, зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

- у виготовленні лікарського засобу для лікування будь-якого стану, який може бути поліпшений або попереджений шляхом модифікації поляризації макрофагів у прозапальні макрофаги.

Модифікація поляризації макрофагів із переважним утворенням прозапальних клітин може бути корисною при ряді патологій або ситуацій. Як описано вище, така модифікація особливо корисна у застосуванні до різних видів раку, для відновлення протипухлинної активності макрофагів і/або для запобігання пропухлинної активності макрофагів типу M2. Нефізіологічні імунні відповіді внаслідок надлишкової поляризації макрофагів типу M2 також виникають при інфекційних захворюваннях, фіброзі, вакцинації, травмі та хронічних запальних захворюваннях.

Відповідно, згідно з конкретним варіантом реалізації, антитіло до SIRPa можна застосовувати для лікування індивідуума, що має рак, вибраний з групи, яка складається з різновидів раку легені, мезотеліом, різновидів раку яєчників, різновидів раку печінки, різновидів раку сечового міхура, різновидів раку головного мозку, різновидів раку молочної залози, різновидів раку товстої кишки, сарком, різновидів раку підшлункової залози, різновидів раку голови і ший, різновидів раку нирок, тимом, гліом, меланом і гематологічних видів раку, таких як лімфоми (ходжкінська лімфома та неходжкінська лімфома), лейкозів, таких як Т- і В-клітинний гострий або хронічний лімфобластний лейкоз (ГЛЛ або ХЛЛ) або гострий або хронічний мієлобластний лейкоз (ГМЛ або ХМЛ) і мієлом.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до:

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначеного вище, або

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й/або який не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

- зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

- для застосування в лікуванні патології, вибраної з групи, яка складається з раку (зокрема, різновидів запального раку та різновидів раку з інфільтрованими мієлоїдними клітинами, зокрема, з інфільтрованими MDSC і/або TAM), інфекційного захворювання, хронічного

запального захворювання, аутоімунного захворювання, неврологічного захворювання, ушкодження мозку, ушкодження нервів, поліцитемії, гемохроматозу, травми, септичного шоку, хронічного інфекційного захворювання (наприклад, захворювання, викликаного *Pseudomonas* або ЦМВ), фіброзу, атеросклерозу, ожиріння, цукрового діабету типу II і дисфункції трансплантата.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до способу лікування патології, вибраної з групи, яка складається з раку (зокрема, різновидів запального раку та різновидів раку з інфільтрованими мієлоїдними клітинами, зокрема, з інфільтрованими MDSC і/або TAM), інфекційного захворювання, хронічного запального захворювання, аутоімунного захворювання, неврологічного захворювання, ушкодження головного мозку, ушкодження нервів, поліцитемії, гемохроматозу, травми, септичного шоку, хронічного інфекційного захворювання (наприклад, захворювання, викликаного *Pseudomonas* або ЦМВ), фіброзу, атеросклерозу, ожиріння, цукрового діабету типу II і дисфункції трансплантата в суб'єкта, що потребує цього, який включає введення зазначеному суб'єкту ефективної кількості:

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначених вище, або

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й/або який не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до застосування:

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначених вище, або

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й/або який не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg, у виготовленні лікарського засобу для лікування патології, вибраної з групи, яка включає рак (зокрема, різновиди запального раку та різновиди раку з інфільтрованими мієлоїдними клітинами, зокрема, з інфільтрованими MDSC і/або TAM), інфекційне захворювання, хронічне запальне захворювання, аутоімунне захворювання, неврологічне захворювання, ушкодження головного мозку, ушкодження нервів, поліцитемію, гемохроматоз, травму, септичний шок, хронічне інфекційне захворювання (наприклад, захворювання, викликане *Pseudomonas* або ЦМВ), фіброз, атеросклероз, ожиріння, цукровий діабет II типу та дисфункцію трансплантата.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa людини або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, визначеного вище, для варіантів застосування, зазначених вище, причому зазначене антитіло до SIRP людини або його антигензв'язуючий фрагмент, або антигензв'язуючий міметик антитіла згідно з даним винаходом вводять пацієнту із симптомами SIRPa-позитивної пухлини.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до:

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначеного вище, або

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, і/або не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

для застосування у вакцинації.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до способу вакцинації суб'єкта, який включає введення зазначеному суб'єкту ефективної кількості:

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначених вище, або

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, і/або не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

5 зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до застосування:

10 - антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначених вище, або

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, і/або не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

15 зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

для виготовлення вакцини.

20 Супресорні мієлоїдні клітини обмежують ефективність вакцинації, особливо в маленьких дітей. Отже, агенти, спрямовані проти SIRPa/g, будуть обмежувати сприятливий результат, який забезпечується агентами, спрямованими проти SIRPa, при розвитку відповіді на вакцину, запобігаючи відповіді Т-лімфоцитів на вакцинацію.

Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент згідно з даним винаходом можна вводити суб'єкту різними шляхами, наприклад, внутрішньовенно (в/в), підшкірно (п/ш) або
25 внутрішньом'язово (в/м).

Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент можна вводити окремо або в комбінації з іншим терапевтичним агентом, наприклад, іншим моноклональним антитілом людини або його антигензв'язуючим фрагментом. В іншому прикладі антитіло вводять разом з іншим агентом, наприклад, імуносупресорним агентом, агентом, який стимулює еритропоєз (ESA), у комбінації з
30 терапевтичними клітинними композиціями та т.п.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, для застосування, визначеного вище, причому зазначене антитіло до SIRPa або антигензв'язуючий фрагмент комбінують з іншим терапевтичним агентом.

35 Зокрема, антитіла до SIRPa згідно з даним винаходом можна комбінувати з деякими іншими потенційними стратегіями для подолання механізмів відхилення пухлини від імунного нагляду, використовуючи агенти, які перебувають на етапі клінічних досліджень або вже випущені на ринок (див. таблицю 1 з Antonia et al. Immuno-oncology combinations:

40 a review of clinical experience and future prospects. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 20, 6258-6268, 2014):

1. Обернення інгібування адаптивного імунітету (блокування шляхів контрольної точки Т-клітин), наприклад, з використанням молекули, спрямованої проти CTLA4, проти PD1 або проти PD-L1;

45 2. Перемикання адаптивного імунітету (посилення передачі сигналів за участю коstimулюючого рецептора Т-клітин з використанням молекул агоністів, зокрема, антитіл), наприклад, шляхом націлювання на CD 137 (4-1BB) з використанням молекул агоністів, включаючи агоністичні антитіла до CD 137 (анти-4-1BB) або ліганди CD 137 (4-1BB);

3. Поліпшення функції вроджених імунних клітин;

50 4. Активація імунної системи (посилення ефекторної функції імунних клітин), наприклад, за допомогою стратегій на основі вакцин.

Введення другого терапевтичного агента може бути одночасним із введенням антитіла до SIRPa або може бути неодноразовим. Залежно від природи другого агента спільне введення може бути досягнуте за допомогою комбінованого лікарського препарату (продукту), також відомого як "комбо". "Комбо" являє собою комбінацію з фіксованою дозою, яка включає два або
55 більше активних фармацевтичних інгредієнта, комбінованих в єдину стандартну лікарську форму, яка проводиться та розподіляється у фіксованих дозах. Проте, схема дозування та/або шлях введення також можуть відрізнятися.

Згідно з переважним варіантом реалізації даного винаходу, зазначений другий терапевтичний агент вибраний з групи, яка складається з хіміотерапевтичних агентів,

радіотерапевтичних агентів, імунотерапевтичних агентів, агентів для клітинної терапії (таких, як CAR-T-клітини), антибіотиків і пробіотиків.

Зокрема, імунотерапевтичні агенти, які можна застосовувати відповідно до даного винаходу, вибрані з групи, яка складається з терапевтичних вакцин (ДНК-, РНК- або пептидних вакцин), блокаторів або активаторів контрольної точки імунітету, зокрема, адаптивних імунних клітин (Т-лімфоцитів або В-лімфоцитів) або імунокон'югатів, таких як кон'югати антитіло-лікарський препарат.

У даному документі термін "імунотерапевтичні агенти" відноситься, зокрема, до агентів, які можуть забезпечити перетворення протипухлинних вакцин, що проявляють цікаві біологічні феномени, в ефективні терапевтичні агенти, включаючи: фактори росту Т-клітин для збільшення кількості та репертуару наївних Т-клітин, фактори росту для збільшення кількості дендритних клітин (ДК), агоністи для активації ДК й інших антигенпрезентуючих клітин (АПК), ад'юванти, які забезпечують та доповнюють протиракові вакцини, агоністи для активації та стимуляції Т-клітин, інгібітори блокади контрольних точок Т-клітин, фактори росту Т-клітин для посилення розмноження та виживання імунних Т-клітин, агенти для інгібування, блокування або нейтралізації ракових клітин й імуносупресорних цитокінів, що походять з імунних клітин.

В даній області техніки відома множина блокаторів або активаторів контрольної точки імунітету. Стосовно даного винаходу приклади блокаторів контрольної точки імунітету або активаторів адаптивних імунних клітин (В- або Т-лімфоцитів), які придатні для застосування, включають агоністи, спрямовані проти PDL1, PD1, CTLA4, CD 137, CD2, CD28, CD40, HVEM, BTLA, CD160, TIGIT, TIM-1/3, LAG-3, 2B4, OX40 і CD40, CD40-L, агоністи TLR, агоністи, спрямовані проти ICOS, ICOS-L й агоністи, спрямовані проти рецепторів В-клітин, зокрема, агоністи, спрямовані проти PDL1, проти PD1 і проти CD137.

Зазначений імунотерапевтичний агент також може являти собою антитіло, націлене на пухлинний антиген, зокрема, вибране з групи, яка складається з антитіла до Her2, антитіла до EGFR, антитіла до CD20, антитіла до CD 19 й антитіла до CD52.

Антитіло може бути забезпечене в ефективній дозі від приблизно 1 нг/кг маси тіла до приблизно 30 мг/кг маси тіла або більше. У конкретному варіанті реалізації даного винаходу доза може перебувати в діапазоні від 1 мг/кг до приблизно 20 мг/кг, необов'язково від 10 мг/кг до 10 мг/кг або від 100 мг/кг до 5 мг/кг.

Термін "ефективна доза" або "ефективне дозування", або "ефективна кількість" визначається як кількість, достатня для досягнення або щонайменше часткового досягнення бажаної дії. Мається на увазі, що термін "ефективна доза" включає кількість, достатню для лікування або щонайменше часткового купірування захворювання та його ускладнень у пацієнта, який вже страждає цим захворюванням. Кількості або дози, ефективні для зазначеного варіанта застосування, будуть залежати від стану, який підлягає лікуванню, доставленої конструкції антитіла, терапевтичної ситуації та завдань, ступені важкості захворювання, що передує терапії, історії хвороби пацієнта та відповіді на терапевтичний агент, шляхи введення, розміру (маси тіла, площі тіла або розміру органа) та/або стану (віку та загального стану здоров'я) пацієнта, а також загального стану власної імунної системи пацієнта. Належну дозу можна корегувати так, щоб її можна було ввести пацієнту один раз або за допомогою декількох введень, а також для того, щоб отримати оптимальну терапевтичну дію.

Дозування для зазначених цілей можна повторювати в міру необхідності, наприклад, щодня, два рази на тиждень, щотижня, два рази на місяць, щомісяця або в міру необхідності під час рецидивів.

Згідно з одним аспектом, даний винахід також відноситься до:

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначеного вище, або

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента.* або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, і/або не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

для застосування в діагностичному тесті, зокрема, у персоналізованій медицині, більше конкретно в допоміжному діагностичному тесті.

Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до способу діагностики, зокрема, у персоналізованій медицині, більше конкретно в допоміжному діагностичному тесті, із застосуванням:

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначених вище, або

5 - антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, і/або не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg.

10 Відповідно до одного варіанта реалізації, даний винахід відноситься до застосування:

- антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, зазначених вище, або

15 - антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, і/або не інгібує проліферацію Т-клітин, і/або не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

зокрема, який інгібує зв'язування CD47 з SIRPa й який не зв'язується специфічно з SIRPg, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами, й який не інгібує проліферацію Т-клітин, й який не інгібує зв'язування CD47 з SIRPg,

20 у виготовленні лікарського засобу для діагностичного тесту, зокрема, у персоналізованій медицині, більше конкретно в допоміжному діагностичному тесті.

Згідно з одним аспектом даний винахід також відноситься до способу діагностики в умовах in vitro або в умовах ex vivo, зокрема, до способу діагностики, придатного для застосування у персоналізованій медицині, більше конкретно в допоміжній діагностиці, причому зазначене антитіло до SIRPa або його антигензв'язуючий фрагмент, або його антигензв'язуючий міметик згідно з даним винаходом застосовують для детектування SIRPa⁺ клітин у зразку, раніше взятому в суб'єкта, і необов'язково для кількісного визначення експресії SIRPa.

30 Згідно з одним аспектом даний винахід також відноситься до застосування антитіла до SIRPa або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика згідно з даним винаходом у виготовленні лікарського засобу, придатного для застосування в діагностичному тесті, зокрема, для застосування у персоналізованій медицині, або в допоміжному діагностичному тесті.

35 Згідно з одним аспектом даний винахід також відноситься до щонайменше одного антитіла до SIRPa людини або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла згідно з даним винаходом в якості засобу для визначення експресії та/або рівня експресії SIRPa у біологічному зразку, раніше взятому в індивідуума.

Згідно з одним аспектом даний винахід також відноситься до способу в умовах in vitro або в умовах ex vivo для визначення в суб'єкта SIRPa-позитивних клітин у біологічному зразку, раніше взятому в зазначеного суб'єкта, який включає:

40 i) визначення в умовах in vitro експресії та/або рівня експресії SIRPa у біологічному зразку, раніше взятому в зазначеного суб'єкта, із застосуванням антитіла до SIRPa людини або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла згідно з даним винаходом.

45 Згідно з одним аспектом даний винахід також відноситься до застосування, зокрема, в умовах in vitro або в умовах ex vivo, щонайменше одного антитіла до SIRPa людини або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла згідно з даним винаходом в способі, в якому SIRPa використовують в якості біомаркера, який є прогностичним для відповіді на лікування в суб'єкта, зокрема, в суб'єкта, який страждає на рак.

50 Згідно з одним аспектом даний винахід також відноситься до способу, в умовах in vitro або в умовах ex vivo, передбачення відповіді в суб'єкта, який страждає на рак, на лікування, зокрема, із застосуванням антитіла до SIRPa людини або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла згідно з даним винаходом, який включає:

55 - визначення рівня експресії SIRPa у зразку пухлини, отриманому раніше в суб'єкта, зокрема, при лікуванні із застосуванням антитіла до SIRPa людини або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла згідно з даним винаходом, і

- порівняння рівня експресії SIRPa зі значенням, що представляє рівень експресії SIRPa у популяції суб'єктів без відповіді на лікування,

причому більше високий рівень експресії SIRPa у зразку пухлини суб'єкта є характерним для суб'єкта, який буде відповідати на лікування.

Згідно з одним аспектом даний винахід також відноситься до способу визначення в умовах *in vitro* або в умовах *ex vivo* присутності SIRPa⁺ клітин у зразку, раніше взятому в суб'єкта, який включає визначення присутності SIRPa в якості біомаркера, який є прогностичним для відповіді суб'єкта на лікування, зокрема, відповіді суб'єкта, в якого діагностовано рак, причому

- 5 зазначений спосіб включає:
 - визначення рівня експресії SIRPa у зразку пухлини, взятому раніше в суб'єкта, зокрема, при лікуванні із застосуванням антитіла до SIRPa людини або його антигензв'язуючого фрагмента, або антигензв'язуючого міметика антитіла, як визначено у будь-якому з пп. 1-13, і
 - 10 - порівняння рівня експресії SIRPa зі значенням, що представляє рівень експресії SIRPa у популяції суб'єктів без відповіді на лікування, причому більше високий рівень експресії SIRPa у зразку пухлини суб'єкта вказує на пацієнта, який буде відповідати на лікування.

КОМПОЗИЦІЇ

- 15 Згідно з іншим аспектом даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, яка містить антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, зазначені вище, і фармацевтично прийнятний носій.

У даному документі термін "фармацевтична композиція" включає композицію, яка підходить для введення суб'єкту або пацієнту, такому як ссавець, особливо людині. У цілому, "фармацевтична композиція" є стерильною та зазвичай не містить забруднюючих речовин, які

- 20 здатні викликати небажану реакцію у суб'єкта (наприклад, сполуки (одна чи більше) у фармацевтичній композиції мають фармацевтичний ступінь чистоти).
- 25 Фармацевтичні композиції можуть бути призначені для введення суб'єктам або пацієнтам, які потребують цього, за допомогою ряду різних шляхів введення, включаючи пероральний, букальний, ректальний, парентеральний, внутрішньочеревинний, внутрішньошкірний, внутрішньотрахеальний та т.п.

У даному документі термін "фармацевтично прийнятний носій" включає допоміжну речовину, розріджувач, носій і ад'ювант, які можна застосовувати для отримання фармацевтичної композиції, які зазвичай є безпечними, нетоксичними і не є ні біологічно, ні іншим способом небажаними, і включають допоміжну речовину, розріджувач, носій і ад'ювант,

- 30 які прийнятні для застосування у ветеринарії, а також для фармацевтичного застосування в людини. У даному документі "фармацевтично прийнятний носій" включає як одну, так і більше однієї такої допоміжної речовини, розріджувача, носія й ад'юванта.
- 35 Зокрема, даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, яка містить в якості активного інгредієнта антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, зазначені вище, і фармацевтично прийнятний носій.

КОМБІНОВАНИЙ ПРОДУКТ

- 40 Згідно з іншим аспектом даний винахід відноситься до терапевтичного засобу, зокрема, до комбінованого продукту, який містить як активні інгредієнти: антитіло до SIRPa або його антигензв'язуючий фрагмент, або антигензв'язуючий міметик антитіла, зазначені вище, і другий терапевтичний агент, причому зазначені активні інгредієнти приготовані для монотерапії, послідовної або комбінованої терапії, зокрема, для комбінованого або послідовного застосування.

Зокрема, даний винахід відноситься до комбінованого продукту, що містить антитіло до SIRPa або його антигензв'язуючий фрагмент, або антигензв'язуючий міметик антитіла, зазначені вище, і другий терапевтичний агент для одночасного, роздільного або послідовного застосування лікарського засобу.

- 45 Відповідно до одного варіанта реалізації даний винахід відноситься до комбінованого продукту, зазначеного вище, в якому другий терапевтичний агент вибраний з групи, яка складається з хіміотерапевтичних агентів, радіотерапевтичних агентів, агентів для клітинної терапії, імунотерапевтичних агентів, антибіотиків і пробіотиків.
- 50 Відповідно до одного варіанта реалізації даний винахід відноситься до комбінованого продукту, зазначеного вище, в якому зазначений імунотерапевтичний агент вибраний з групи, яка складається з терапевтичних вакцин, блокаторів або активаторів контрольної точки імунітету, зокрема, адаптивних імунних клітин (Т- і В-лімфоцитів) і кон'югатів антитіло-лікарський препарат.

Відповідно до одного варіанта реалізації даний винахід відноситься до комбінованого продукту, зазначеного вище, в якому зазначений блокатор або активатор контрольної точки імунітету адаптивних імунних клітин (Т- і В-лімфоцитів) вибраний з групи, яка складається з агоністів, спрямованих проти PDL1, PD1, CTLA4, CD 137, CD2, CD28, CD40, HVEM, BTLA, CD160, TIGIT, TIM-1/3, LAG-3, 2B4, OX40 і CD40, CD40-L, агоністів TLR, агоністів, спрямованих

проти ICOS, ICOS-L й агоністів, спрямованих проти рецепторів В-клітин, зокрема, вибраних із групи, яка складається з агоністів, спрямованих проти PDL1, проти PD1 і проти CD 137.

Відповідно до одного варіанта реалізації даного винаходу зазначений імунотерапевтичний агент являє собою антитіло, націлене на пухлинний антиген, зокрема, вибране з групи, яка складається з антитіла до Her2, антитіла до EGFR, антитіла до CD20, антитіла до CD 19, антитіла до CD52.

Згідно з одним аспектом даний винахід відноситься до комбінованого продукту, зазначеного вище, для одночасного, роздільного або послідовного застосування в лікуванні будь-якого стану, який може бути поліпшений або попереджений шляхом диференціювання моноцитарних супресорних клітин мієлоїдного походження (Mo-MDSC) у несупресорні клітини.

Відповідно до одного варіанта реалізації даний винахід відноситься до способу лікування будь-якого стану, який може бути поліпшений або попереджений шляхом диференціювання моноцитарних супресорних клітин мієлоїдного походження (Mo-MDSC) у несупресорні клітини в суб'єкта, що потребує цього, який включає одночасне, роздільне або послідовне введення зазначеному суб'єкту ефективної кількості комбінованого продукту, зазначеного вище.

Відповідно до одного варіанта реалізації винахід відноситься до застосування комбінованого продукту, зазначеного вище, у виготовленні лікарського засобу для лікування будь-якого стану, який може бути поліпшений або попереджений шляхом диференціювання моноцитарних супресорних клітин мієлоїдного походження (Mo-MDSC) у несупресорні клітини.

Згідно з одним аспектом даний винахід відноситься до комбінованого продукту, зазначеного вище, для одночасного, роздільного або послідовного застосування в лікуванні будь-якого стану, який може бути поліпшений або попереджений шляхом модифікації поляризації макрофагів у протизапальні макрофаги.

Відповідно до одного варіанта реалізації даний винахід відноситься до способу лікування будь-якого стану, який може бути поліпшений або попереджений шляхом модифікації поляризації макрофагів у протизапальні макрофаги в суб'єкта, що потребує цього, який включає одночасне, роздільне або послідовне введення зазначеному суб'єкту ефективної кількості комбінованого продукту, зазначеного вище.

Відповідно до одного варіанта реалізації даний винахід відноситься до застосування комбінованого продукту, зазначеного вище, у виготовленні лікарського засобу для лікування будь-якого стану, який може бути поліпшений або попереджений шляхом модифікації поляризації макрофагів у протизапальні макрофаги.

Згідно з одним аспектом даний винахід відноситься до комбінованого продукту, зазначеного вище, для одночасного, роздільного або послідовного застосування в лікуванні патології, вибраної з групи, яка складається з раку, інфекційного захворювання, хронічного запального захворювання, аутоімунного захворювання, неврологічного захворювання, ушкодження головного мозку, ушкодження нервів, поліцитемії, гемохроматозу, травми, септичного шоку, хронічного інфекційного захворювання (наприклад, захворювання, викликаного *Pseudomonas* або ЦМВ), фіброзу, атеросклерозу, ожиріння, цукрового діабету типу II і дисфункції трансплантата, або для застосування у вакцинації.

Відповідно до одного варіанта реалізації даний винахід відноситься до способу лікування патології, вибраної з групи, яка складається з раку, інфекційного захворювання, хронічного запального захворювання, аутоімунного захворювання, неврологічного захворювання, ушкодження мозку, ушкодження нервів, поліцитемії, гемохроматозу, травми, септичного шоку, хронічного інфекційного захворювання (наприклад, захворювання, викликаного *Pseudomonas* або ЦМВ), фіброзу, атеросклерозу, ожиріння, цукрового діабету типу II і дисфункції трансплантата в суб'єкта, що потребує цього, який включає одночасне, роздільне або послідовне введення зазначеному суб'єкту ефективної кількості комбінованого продукту, зазначеного вище.

Відповідно до одного варіанта реалізації даний винахід відноситься до застосування комбінованого продукту, зазначеного вище, у виготовленні лікарського засобу для лікування патології, вибраної з групи, яка складається з раку, інфекційного захворювання, хронічного запального захворювання, аутоімунного захворювання, неврологічного захворювання, ушкодження головного мозку, ушкодження нервів, поліцитемії, гемохроматозу, травми, септичного шоку, хронічного інфекційного захворювання (наприклад, захворювання, викликаного *Pseudomonas* або ЦМВ), фіброзу, атеросклерозу, ожиріння, цукрового діабету тип II і дисфункції трансплантата, або до застосування у вакцинації.

НУКЛЕІНОВІ КИСЛОТИ

Згідно з іншим аспектом даний винахід відноситься до виділеної молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, зазначений вище.

У даному документі молекула нуклеїнової кислоти може бути дволанцюговою й одноланцюговою, лінійною та кільцевою. Молекула нуклеїнової кислоти переважно входить до складу вектора, який переважно міститься в клітині-хазяїні.

Відповідно до одного варіанта реалізації даний винахід відноситься до виділеної молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, зазначені вище, причому зазначена молекула нуклеїнової кислоти містить або складається з щонайменше однієї послідовності, вибраної з SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 і SEQ ID NO: 69.

Відповідно до одного варіанта реалізації даний винахід відноситься до виділеної молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, зазначені вище, причому зазначена молекула нуклеїнової кислоти містить:

- послідовність, яка кодує варіабельний домен важкого ланцюга зазначеного антитіла, що переважно містить:

- SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 або SEQ ID NO: 60,

- SEQ ID NO: 61 або SEQ ID NO: 62, і

- SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 або SEQ ID NO: 66, і/або

- послідовність, яка кодує варіабельний домен легкого ланцюга зазначеного антитіла, що переважно містить:

- SEQ ID NO: 67, -SEQ ID NO: 68, і -SEQ ID NO: 69.

Таблиця 5

Послідовності, які кодують CDR варіабельних доменів важкого ланцюга та CDR варіабельних доменів легкого ланцюга антитіл відповідно до даного винаходу

Послідовності нуклеїнових кислот, які кодують HCDR1 (що відповідають амінокислотній послідовності SEQ IDNO: 14)	AGCTATTGGGTGCAC TCTTATTGGGTGCAC TCCTATTGGGTGCAC	SEQIDNO: 58 SEQIDNO: 59 SEQIDNO: 60
Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує HCDR2 (відповідно до амінокислотної послідовності SEQ IDNO: 15)	AACATCGACCCCCAGCGACTC TGATACCCATTACAATCAGA AGTTTAAGGAC	SEQ IDNO: 61
Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує HCDR2 (відповідно до амінокислотної послідовності SEQ IDNO: 16)	AACATCGACCCCCAGCGACTC TGATACACACTACTCCCCCTA GCTTTCAGGGC	SEQ ID NO: 62
Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує HCDR.3 (відповідно до амінокислотної послідовності SEQ IDNO: 17)	GGAGGAACCGGAACAATGG CTTGGTTTGCTTAC	SEQ ID NO: 63
Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує HCDR3 (відповідно до амінокислотної послідовності SEQ IDNO: 18)	GGAGGAACCGGCACACTGG CTTGGTTTCGCTTAC	SEQ ID NO: 64
Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує HCDR3 (відповідно до амінокислотної послідовності SEQ IDNO: 19)	GGAGGAACCGGAACAATGG CTTACTTCGCTTAT	SEQ ID NO: 65

Таблиця 5 (продовження)

Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує HCDR3 (відповідно до амінокислотної послідовності SEQ ID NO:20)	GGAGGAACCGGCACACTGG CTTACTTCGCTTAT	SEQ ID NO: 66
Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує LCDR1 (відповідно до амінокислотної послідовності SEQ ID NO:21)	AGGTCCAGCCAGTCCCTGGT GCACAGCTATGGCAACACAT ACCTGTAT	SEQ ID NO: 67
Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує LCDR2 (відповідно до амінокислотної послідовності SEQ ID NO:22)	AGGGTGTCTAATCGGTTCTC C	SEQ ID NO: 68
Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує LCDR3 (відповідно до амінокислотної послідовності SEQ ID NO:23)	TTTCAGGGCACCCATGTGCC ATACACA	SEQ ID NO: 69

Зокрема, даний винахід відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, яка містить або складається з послідовності, вибраної з SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 і SEQ ID NO: 55.

Таблиця 6

Послідовності, які кодують варіабельні домени важкого ланцюга та варіабельні домени легкого ланцюга антитіла відповідно до даного винаходу

Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен важкого ланцюга антитіла дикого типу (хімерне антитіло та мишаче антитіло 18D5)	CAGGTGCAGCTGCAGCAAGCCAGGAGCTGA GCTGGTGAGGCCTGGCTCCAGCGTGAAGC TGTCCTGCAAGGCTAGCGGCTACACCTTCA CAAGCTATTGGGTGCACTGGGTGAAGCAG CGGCCAATCCAGGGCCTGGAGTGGATCGG CAACATCGACCCAGCGACTCTGATACCC ATTACAATCAGAAGTTTAAGGACAAGGCC TCTCTGACCGTGGATAAGTCTTCCAGCACA GCTTATATGCAGCTGTCTTCCCTGACATTC GAGGATTCCGCGGTGTACTATTGCGTGAG GGGAGGAACCGGAACAATGGCTTGGTTTG CTTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGOTGACA GTGTCTGCT	SEQIDNO: 46
---	---	----------------

Таблица 6 (продовження)

Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен важкого ланцюга гуманізованого варіанта (HA)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCTGA GGTGAAGAAGCCAGGCGAGTCTCTGAGGA TCTCCTGCAAGGCTAGCGGCTACACCTTCA CATCTTATTGGGTGCACTGGGTGCGGCAG ATGCCAGGCAAGGGCCCTGGAGTGGATCGG CAACATCGACCCTAGCGACTCTGATACCC ACTACAATCAGAAGTTTAAGGACCATGTG ACCCTGTCTGTGGATAAGTCCATCAGCAC AGCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGG CCTCCGATACAGCTATGTACTATTGCGTGA GGGGAGGAACCGGAACAATGGCTTGGTTC GCTTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC AGTGTCTTCC	SEQIDNO: 47
Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен важкого ланцюга гуманізованого варіанта (HB)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCTGA GGTGAAGAAGCCAGGCGAGTCTCTGAGGA TCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACTCCTTCA CCAGCTATTGGGTGCACTGGGTGCGGCAG ATGCCAGGCAAGGGCCCTGGAGTGGATGGG CAACATCGACCCTAGCGACTCTGATACAC ACTACAATCAGAAGTTTAAGGACCATGTG ACCCTGAGCGTGGATAAGTCCATCAGCAC AGCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGG CCTCTGATACCGCTATGTACTATTGCGTGA GGGGAGGAACCGGAACAATGGCTTGGTTC GCTTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC AGTGTCTTCC	SEQIDNO: 48

Таблица 6 (продовження)

Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен важкого ланцюга гуманізованого варіанта (HC)	GAGGTGCAGCTGOTGCAGTCTGGCGCCGA GGTGAAGAAGCCAGGCGAGAGCCTGAGG ATCTCTTGCAAGGCTAGCGGCTACTCTTTC ACCTCCTATTGGGTGCACTGGGTGCGGCA GATGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGG GCAACATCGACCCCAGCGACTCTGATACA CACTACTCCCCTAGCTTTCAGGGCCATGTG ACCCTGTCCGTGGACAAGTCTATCTCCACA GCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGGC CAGCGATACCGCTATGTACTATTGCGTGA GGGGAGGAACCGGAACAATGGCTTGGTTC GCTTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC AGTGTCTTCC	SEQIDNO: 49
Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен	GAGGTGCAGCTGOTGCAGTCTGGCGCCGA GGTGAAGAAGCCAGGCGAGAGCCTGAGG ATCTCTTGCAAGGCTAGCGGCTACTCTTTC ACCTCCTATTGGGTGCACTGGGTGCGGCA GATGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGG GCAACATCGACCCCAGCGACTCTGATACA CACTACTCCCCTAGCTTTCAGGGCCATGTG ACCCTGTCCGTGGACAAGTCTATCTCCACA GCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGGC CAGCGATACCGCTATGTACTATTGCGTGA GGGGAGGAACCGGCACACTGGCTTGGTTC GCTTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC AGTGTCTTCC	SEQIDNO: 50
важкого ланцюга гуманізованого варіанта (HE)	GAGGTGCAGCTGOTGCAGTCTGGCGCCGA GGTGAAGAAGCCAGGCGAGAGCCTGAGG ATCTCTTGCAAGGCTAGCGGCTACTCTTTC ACCTCCTATTGGGTGCACTGGGTGCGGCA GATGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGG GCAACATCGACCCCAGCGACTCTGATACA CACTACTCCCCTAGCTTTCAGGGCCATGTG ACCCTGTCCGTGGACAAGTCTATCTCCACA GCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGGC CAGCGATACCGCTATGTACTATTGCGTGA GGGGAGGAACCGGCACACTGGCTTGGTTC GCTTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC AGTGTCTTCC	

Таблица 6 (продовження)

Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен важкого ланцюга гуманізованого варіанта (HF)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA GGTGAAGAAGCCAGGCGAGAGCCTGAGG ATCTCTTGCAAGGCTAGCGGCTACTCTTTC ACCTCCTATTGGGTGCACTGGGTGCGGCA GATGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGG GCAACATCGACCCCAGCGACTCTGATACA CACTACTCCCCTAGCTTTCAGGGGCCATGTG ACCCTGTCCGTGGACAAGTCTATCTCCACA GCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGGC CAGCGATACCGCTATGTACTATTGCGTGA GGGGAGGAACCGGAACAATGGCTTACTTC GCTTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC AGTGTCTTCC	SEQIDNO: 51
Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен важкого ланцюга гуманізованого варіанта (HEF)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA GGTGAAGAAGCCAGGCGAGAGCCTGAGG ATCTCTTGCAAGGCTAGCGGCTACTCTTTC ACCTCCTATTGGGTGCACTGGGTGCGGCA GATGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGG GCAACATCGACCCCAGCGACTCTGATACA CACTACTCCCCTAGCTTTCAGGGGCCATGTG ACCCTGTCCGTGGACAAGTCTATCTCCACA GCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGGC CAGCGATACCGCTATGTACTATTGCGTGA GGGGAGGAACCGGCACACTGGCTTACTTC GCTTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC AGTGTCTTCC	SEQIDNO: 52

Таблиця 6 (продовження)

Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен легкого ланцюга антитіла дикого типу (химерне антитіло та мишаче антитіло 18D5)	GACGTGGTTCATGACCCAGACACCACTGAG CCTGCCCCGTGTCCCTGGGCGATCAGGCCTC TATCTCCTGCAGGTCCAGCCAGTCCCTGGT GCACAGCTATGGCAACACATACCTGTATT GGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCC AAGCTGCTGATCTACAGGGTGTCTAATCG GTTCTCCGGCGTGCCTGACAGGTTCTCCGG CTCTGGCTCCGGCACCCGATTTACACTGAA GATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGACCTGG GCGTGTATTTCTGTTTTTCAGGGCACCCATG TGCCATACACATTTGGCTCTGGEACCAAGC TGGAGATCAAG	SEQIDNO: 53
Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен легкого ланцюга гуманізованого варіанта А (LA)	GACGTGGTTCATGACACAGAGCCCACTGTC TCTGCCTGTGACCCTGGGACAGCCAGCCTC TATCTCCTGCAGGTCCAGCCAGTCCCTGGT GCACAGCTATGGCAACACATACCTGTATT GGTACCAGCAGAGGCCCGGACAGAGCCCA AGGCTGCTGATCTACAGGGTGTCTAATCG GTTCTCCGGCGTGCCTGACAGGTTTAGCGG CTCTGGCTCCGGCACCCGATTTACACTGAA GATCTCTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGG GCGTGTATTTCTGTTTTTCAGGGCACCCATG TGCCATACACATTTGGCGGCGGCACCAAG GTGGAGATCAAG	SEQIDNO: 54
Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен легкого ланцюга гуманізованого варіанта (LB)	GACGTGGTTCATGACACAGAGCCCACTGTC TCTGCCTGTGACCCTGGGACAGCCAGCCTC TATCTCCTGCAGGTCCAGCCAGTCCCTGGT GCACAGCTACGGCAACACATACCTGTATT GGTTCAGCAGAGGCCCGGACAGAGCCCA AGGCTGCTGATCTATAGGGTGTCTAATCG GTTCTCCGGCGTGCCTGACAGGTTTAGCGG ATCTGGATCCGGAAACCGACTTCACCCCTOA AGATCTCTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTG GGCGTGTACTATTGTTCCAGGGCACCCAT GTGCCATACACATTTGGCGGCGGCACCAA GOTGGAGATCAAG	SEQIDNO: 55

ВЕКТОРИ

Згідно з іншим аспектом даний винахід відноситься до вектора, який містить молекулу нуклеїнової кислоти, зазначену вище.

У даному документі термін "вектор" являє собою молекулу нуклеїнової кислоти, застосовану в якості носія для перенесення генетичного матеріалу в клітину. Термін "вектор" включає плазміди, віруси, косміди та штучні хромосоми. Зазвичай сконструйовані вектори містять точку початку реплікації, сайт множинного клонування та селективний маркер. Вектор, як такий, зазвичай являє собою нуклеотидну послідовність, зазвичай послідовність ДНК, яка містить вставку (трансген) та більшу послідовність, яка служить в якості "кістяка" вектора. Сучасні вектори можуть включати додаткові конструктивні особливості, крім трансгенної вставки та кістяка: промотор, генетичний маркер, ген резистентності до антибіотиків, репортерний ген, послідовність націлювання, мітку для очищення білка. Вектори, які називають векторами експресії (конструкції для експресії), спеціально призначені для експресії трансгена в клітині-мішені та зазвичай мають керуючі послідовності.

КЛІТИНИ-ХАЗЯЇНИ

Згідно з іншим аспектом даний винахід відноситься до виділеної клітини-хазяїна, яка містить вектор, зазначений вище.

У даному документі мається на увазі, що термін "клітина-хазяїн" включає будь-яку окрему клітину або клітинну культуру, яка може бути або була реципієнтом векторів, молекул екзогенних нуклеїнових кислот і полінуклеотидів, які кодують конструкцію антитіла згідно з даним винаходом; і/або реципієнтом конструкції антитіла як такого. Введення відповідного матеріалу в клітину можна здійснювати за допомогою трансформації, трансфекції та тому подібного. Термін "клітина-хазяїн" також призначений для включення потомства або потенційного потомства однієї клітини. Підходящі клітини-хазяїни включають прокаріотичні або еукаріотичні клітини, а також включають, але не обмежуються ними, бактерії, дріжджові клітини, клітини грибків, рослинні клітини та клітини тварин, такі як клітини комах і клітини ссавців, наприклад, миші, пацюка, кролика, макаки або людини.

НАБОРИ

Згідно з іншим аспектом даний винахід відноситься до набору, який містить:

- антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, зазначений вище,
- молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує зазначене антитіло або антигензв'язуючий фрагмент,
- вектор, який містить зазначену молекулу нуклеїнової кислоти, і/або
- клітину, яка містить зазначений вектор.

З метою зручності антитіло згідно з даним винаходом може бути забезпечене в наборі, тобто в упакованій комбінації реагентів.

Стосовно даного винаходу термін "набір" означає два або більше компонентів (один із яких відповідає антитілу або його антигензв'язуючому фрагменту, молекулі нуклеїнової кислоти, вектору або клітині згідно з даним винаходом), спільно упакованих у контейнер, введених реципієнту або представлених в іншій формі. Відповідно, набір можна описати як набір продуктів й/або інструментів, які достатні для досягнення певної мети, який може бути випущений на ринок як єдине ціле.

Набір може містити один або більше реципієнтів (таких як флакони, ампули, контейнери, шприци, пляшки, мішки) будь-якої підходящої форми, розміру та матеріалу антитіла, що містять конструкцію, згідно з даним винаходом у відповідній дозі для введення. Набір може додатково містити вказівки для застосування (наприклад, у вигляді інформаційного листка або посібника із застосування), засоби для введення конструкції антитіла згідно з даним винаходом, такі як шприц, насос, інфузор або т.ін., засоби для відновлення конструкції антитіла згідно з даним винаходом і/або засоби для розведення конструкції антитіла згідно з даним винаходом.

Відповідно до одного варіанта реалізації даний винахід відноситься до набору, зазначеного вище, для одиничної стандартної лікарської форми. Набір згідно з даним винаходом також може містити перший реципієнт, який містить висушену/ліофілізовану конструкцію антитіла, і другий реципієнт, який містить водний склад. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу запропоновані набори, які містять однокамерні та багатокамерні попередньо заповнені шприци (наприклад, шприци з рідким вмістом і шприци з ліофілізатом).

АНТИГЕНИ

Згідно з одним аспектом даний винахід відноситься до поліпептиду, зокрема, до антигена, який містить або складається з послідовності епітопу SIRPa людини, що складається з SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E).

Відповідно до одного варіанта реалізації даний винахід відноситься до поліпептиду, зокрема, до антигена, який містить або складається з послідовності епітопу SIRPa людини, що складається з SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), причому зазначений поліпептид містить до 300 амінокислот.

5 Відповідно до одного варіанта реалізації даного винаходу поліпептид згідно з даним винаходом містить від 50 до 300, переважно від 100 до 250 амінокислот.

Відповідно до одного варіанта реалізації даного винаходу поліпептид згідно з даним винаходом містить до 50, 100, 150, 200, 250 або 300 амінокислот.

10 Відповідно до одного варіанта реалізації даний винахід відноситься до поліпептиду, зокрема, до антигена, який містить або складається з послідовності епітопу SIRPa людини, що складається з SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), і щонайменше однієї послідовності епітопу SIRPa людини, що складається з SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) або SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE).

15 Відповідно до одного варіанта реалізації даний винахід відноситься до поліпептиду, зокрема, до антигена, який містить або складається з послідовностей епітопу SIRPa людини, що складається з SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) і SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE).

20 Відповідно до одного варіанта реалізації даний винахід відноситься до поліпептиду, зокрема, до антигена, який містить або складається з щонайменше одного пептиду, вибраного з групи, що складається з SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 і SEQ ID NO: 72, причому зазначений поліпептид складається з послідовності, яка містить до 300 амінокислот.

25 Відповідно до одного варіанта реалізації даний винахід відноситься до поліпептиду, зокрема, до антигена, який містить або складається з пептиду, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 73 (YNQK), і/або пептиду, що має амінокислотну послідовність SIR в межах SIRPa. причому зазначений поліпептид складається з послідовності, яка містить до 300 амінокислот.

СПОСІБ ВИРОБНИЦТВА АНТИТІЛА

30 Згідно з одним аспектом даний винахід також відноситься до способу отримання антитіла, зокрема, антитіла згідно з даним винаходом, який включає імунізацію тварини, відмінної від людини, зокрема, ссавця, що не відноситься до людини, проти щонайменше одного антигена, зазначеного вище, і, зокрема, збір отриманої сироватки від зазначеної імунізованої тварини, відмінної від людини, для отримання антитіл, спрямованих проти зазначеного антигена.

35 Зокрема, даний винахід також відноситься до способу отримання антитіла, який включає імунізацію тварини, відмінної від людини, проти антигена, який містить або складається з послідовності епітопу SIRPa людини, що складається з SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), і, зокрема, збір отриманої сироватки в зазначеній імунізованій тварини, відмінної від людини, для отримання антитіл, спрямованих проти зазначеного антигена.

40 Зокрема, даний винахід також відноситься до способу отримання антитіла, який включає імунізацію тварини, відмінної від людини, проти антигена, який містить або складається з послідовності епітопу SIRPa людини, що складається з SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), і щонайменше однієї послідовності епітопу SIRPa людини, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) або SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE), і, зокрема, збір отриманої сироватки в зазначеній імунізованій тварини, відмінної від людини, щоб отримати антитіла, спрямовані проти зазначеного антигена.

45 Зокрема, даний винахід також відноситься до способу отримання антитіла, який включає імунізацію тварини, відмінної від людини, проти антигена, який містить або складається з послідовностей епітопу SIRPa людини, що складаються з SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) і SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE), і, зокрема, збір отриманої сироватки в зазначеній імунізованій тварини, відмінної від людини, щоб отримати антитіла, спрямовані проти зазначеного антигена.

55 СПОСІБ ВІДБОРУ АНТИТІЛА

Згідно з одним аспектом даний винахід відноситься до способу відбору антитіла згідно з даним винаходом, антигензв'язуючого фрагмента або міметика зазначеного антитіла, який включає або складається з щонайменше одного з наступних етапів:

а) випробування (наприклад, згідно зі способом, описаним у прикладах 1, 2 і 3) здатності антитіла, антигензв'язуючого фрагмента або міметика зазначеного антитіла зв'язуватися з SIRPa, зокрема, з антигеном, зазначеним вище;

5 б) випробування (наприклад, згідно зі способом, описаним у прикладах 7 і 8), здатності антитіла, антигензв'язуючого фрагмента або міметика зазначеного антитіла зв'язуватися з SIRPb;

с) випробування (наприклад, згідно зі способом, описаним у прикладах 9 і 10) здатності антитіла, антигензв'язуючого фрагмента або міметика зазначеного антитіла зв'язуватися з SIRPg;

10 д) випробування (наприклад, згідно зі способом, описаним у прикладах 4 і 5), здатності антитіла, антигензв'язуючого фрагмента або міметика зазначеного антитіла інгібувати зв'язування CD47 людини з SIRPa людини;

е) випробування (наприклад, згідно зі способом, описаним у прикладі 12) здатності антитіла, антигензв'язуючого фрагмента або міметика зазначеного антитіла зв'язуватися з Т-клітинами;

15 ф) випробування (наприклад, згідно зі способом, описаним у прикладі 13) здатності антитіла, антигензв'язуючого фрагмента або міметика зазначеного антитіла інгібувати проліферацію Т-клітин;

г) випробування (наприклад, згідно зі способом, описаним у прикладі 11) здатності антитіла, антигензв'язуючого фрагмента або міметика зазначеного антитіла інгібувати зв'язування CD47 людини з SIRPg людини;

наступний етап, який необов'язково включає:

25 - відбір антитіла, антигензв'язуючого фрагмента або міметика зазначеного антитіла, який специфічно зв'язується з SIRPa, зокрема, з антигеном, зазначеним вище, й який значно інгібує зв'язування CD47 з SIRPa, й який не зв'язується специфічно з SIRPg людини, й/або який не зв'язується специфічно з Т-клітинами людини, й/або який не інгібує в значній мірі проліферацію Т-клітин людини, й/або який не інгібує в значній мірі зв'язування CD47 людини з SIRPg людини; більше конкретно, який специфічно зв'язується з SIRPa, зокрема, з антигеном, зазначеним вище, й який значно інгібує зв'язування CD47 з SIRPa, й який не зв'язується специфічно з SIRPg людини, й який не зв'язується специфічно з Т-клітинами людини, й який не інгібує в значній мірі проліферацію Т-клітин людини, і не інгібує в значній мірі зв'язування CD47 людини з SIRPg людини.

Спосіб відбору антитіла згідно з даним винаходом переважно може бути виконаний як доповнення до способу отримання антитіла згідно з даним винаходом.

35 Наступні фігури та приклади наведені для того, щоб надати фахівцям в даній області техніки повне розкриття й опис способів реалізації, і застосування даного винаходу та не призначені для обмеження обсягу винаходу, заявленого авторами даного винаходу, також передбачено, що наведені нижче експерименти не являють собою всі експерименти або єдині виконані експерименти. Незважаючи на те, що даний винахід був описаний з посиланням на конкретні варіанти реалізації, фахівці в даній області техніки зрозуміють, що можуть бути виконані різні зміни, й еквіваленти можуть бути замінені, не відступаючи від точної сутності й обсягу даного винаходу. Крім цього, багато модифікацій може бути зроблено для адаптації конкретної ситуації, матеріалу, розглянутої композиції, способу, етапу або етапів способу для досягнення завдань, сутності й обсягу даного винаходу. Мається на увазі, що всі такі модифікації включені в обсяг прикладеної формули винаходу.

45 УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ ДО ФІГУР

Фігура 1. Результати досліджень зв'язування антитіл до SIRPa методом ІФА (в якості покриття застосовували SIRPa-His людини та детектували каппа-ланцюг людини).

50 Оцінка методом ІФА на іммобілізованому SIRPa-His химерного антитіла (♦), HALA (□), HFLA (*), HFLB (+), HEFLA (▲), HEFLB (■), SIRP29 (Δ), Kwar23 (o) на Фігурі А; HCLA (●), HCLB (x), HELA (◇). HELB (-) на Фігурі В; HALB (-), HBLA (□), HBLB (■) на Фігурі С. Виявлення виконували за допомогою антитіла віслюка до білка людини, і сигнал реєстрували колориметричним методом при довжині хвилі 450 нм з використанням субстрату ТМВ. ЕД₅₀ являє собою концентрацію зазначеного антитіла, необхідну для досягнення 50 % сигналу в даному дослідженні. Зв'язування клону m18D5 (■) (n=4), комерційного клону SE5A5 (▲) (n=7), клону 6G10 (▽) (n=3) і клону 12D7 (□) (n=4) на Фігурі D.

Фігура 2. Дослідження афінності антитіл до SIRP на рекомбінантному білку SIRP людини за допомогою системи Biacore.

Рекомбінантний білок SIRPa-His іммобілізували на чипі CM5 в концентрації 5 мкг/мл (500 од.відхил.) і додавали зазначені антитіла в різних концентраціях. Значення вимірювали після

періоду асоціації (ka) протягом 3 хв з наступним періодом дисоціації (kd) протягом 10 хв для визначення константи афінності (KD).

Фігура 3. Дослідження зв'язування антитіл до SIRPa на моноцитах людини (гомозиготних за варіантом SIRPa I (v1/v1)).

5 (A, B) Оцінка на моноцитах людини v1/v1 (раніше пофарбованих інгібіторним антитілом, що зв'язуються з рецептором Fc людини) химерного антитіла (◆), HALA (□), HFLA (*), HFLB (+), HEFLA (▲), HEFLB (■), SIRP29 (Δ), Kwar23 (o) за допомогою цитофлуориметрії. Виявлення проводили за допомогою міченого фікоеритрином (ФЕ) мишачого антитіла до Fc людини на цитометрі Cantoll, значення відповідають відсотку пофарбованих моноцитів. ЕД₅₀ являє собою
10 концентрацію зазначеного антитіла, необхідну для досягнення 50 % сигналу в даному дослідженні. На Фігурі А наведені значення процентного вмісту пофарбованих моноцитів v1/v1. На Фігурі В наведені середні значення інтенсивності флуоресценції (MFI) моноцитів v1/v1.

(C, D) Дослідження зв'язування антитіл до SIRPa на моноцитах людини методом проточної цитометрії (FACS): випробовували різні антитіла до SIRPa: m18D5 (■) (n=1), SE7C2 (▲) (n=2),
15 12D7 (□) (n=2), 6G10 (◆) (n=4): На Фігурі С представлені середні значення інтенсивності флуоресценції (MFI) різних антитіл залежно від дози. На Фігурі D представлені значення процентного вмісту пофарбованих моноцитів залежно від дози антитіла. Статистичний аналіз проводили в міру можливості.

(E, F, G) Зв'язування варіантів SIRPa антитілами до SIRPa людини у популяції. Здатність
20 різних антитіл до SIRPa людини зв'язувати варіанти SIRPa вимірювали в 32 добровольців методом FACS за допомогою ФЕ-кон'югованого антитіла до IgG миші. Всі клони випробовували в концентрації 10 мкг/мл: m18D5 (■), 12D7 (▼), 6G10 (◆) і комерційні антитіла SE5A5 (□), SE7C2 (Δ). На Фігурі Е представлені результати для добровольців, гомозиготних за варіантом 1 (n=16). На Фігурі F представлені результати для добровольців, гомозиготних за варіантом 2 (n=8). На
25 Фігурі G представлені результати для добровольців, гетерозиготних за варіантом VI/V2 (n=8).

Фігура 4. Конкуренція антитіл до SIRPa з CD47 на SIRPa.

(A) Оцінка методом ІФА химерного антитіла (◆), HFLA (*), HFLB (+), HEFLA (▲), HEFLB (■), SIRP29 (Δ), Kwar23 (o) в різних концентраціях, інкубованих з фіксованою концентрацією біотинільованого CD47-Fc (6 мкг/мл), на іммобілізованому SIRPa-His. Виявлення виконували за
30 допомогою пероксидази-стрептавідину для детектування молекули CD47. і сигнал реєстрували колориметричним методом при довжині хвилі 450 нм з використанням субстрату ТМВ. Результати другого експерименту наведені зі значеннями ІK₅₀. ІK₅₀ являє собою концентрацію зазначеного антитіла, необхідну для інгібування 50 % сигналу в даному дослідженні.

(B) Дослідження антагоністичної дії антитіл до SIRPa на взаємодію SIRPa-CD47 методом ІФА: випробовували залежність відповіді різних антитіл до SIRPa від дози: клон m18D5 (■) (n=1),
35 комерційне антитіло SE5A5 (▲) (n=2) і m12D7 (□) (n=2). На Фігурі представлений відсоток СЭ47-позитивних взаємодій SIRPa-CD47, виміряний методом ІФА при дослідженні дозозалежної відповіді антитіл до SIRPa людини.

Фігура 5. Конкуренція антитіл до SIRPa з CD47 на моноцитах людини.

40 (A, B) Оцінка химерного антитіла (◆), HFLA (*), HFLB (+), HEFLA (▲), HEFLB (■) в різних концентраціях, інкубованих з фіксованою концентрацією біотинільованого CD47-Fc (10 мкг/мл), на моноцитах людини (v1/v1) за допомогою цитометрії. Молекулу CD47 детектували з використанням фікоеритрину-стрептавідину, і сигнал реєстрували за допомогою цитометра Cantoll. ІK₅₀ являє собою концентрацію зазначеного антитіла, необхідну для інгібування 50 %
45 сигналу в даному дослідженні. На Фігурі А наведений відсоток позитивних клітин. На Фігурі В представлені середні значення інтенсивності флуоресценції.

(C) Дослідження антагоністичної дії антитіл до SIRPa на взаємодію SIRPa-CD47 методом FACS: випробовували залежність відповіді різних антитіл до SIRPa від дози: клон m18D5 (■) (n=1), комерційне антитіло SE7C2 (▲) (n=2) і m12D7 (□) (n=2). На Фігурі С представлений
50 відсоток CD 47-позитивних клітин, виміряний методом FACS, після конкуренції з антитілами до SIRPa людини.

Фігура 6. (A) Дослідження за допомогою системи BLItz™ афінності антитіла SIRP у відношенні рекомбінантного білка SIRPa після попередньої інкубації у присутності ліганду SP-D або за його відсутності. Рекомбінантний білок SIRPa-His іммобілізували на біосенсорі NINTA в
55 концентрації 10 мкг/мл, після цього вносили ліганд SP-D в концентрації 100 мкг/мл (насичуюча концентрація). Потім додавали антитіло до SIRPa в концентрації 20 мкг/мл, і значення афінності були встановлені після періоду асоціації протягом 120 с (ka) з наступним періодом дисоціації протягом 120 с (kd) для визначення константи афінності (KD). (B) Дослідження афінності антитіла SIRP у відношенні рекомбінантного білка SIRPa людини, попередньо інкубованого з
60 мишачим антитілом 18D5. за допомогою системи BLItz™. Рекомбінантний білок SIRPa-His

імобілізували на біосенсорі NINTA в концентрації 10 мкг/мл і додавали антитіло до SIRPa в концентрації 20 мкг/мл (насичуюча концентрація). Потім додавали ліганд SP-D в концентрації 100 мкг/мл, і значення афінності були встановлені після періоду асоціації протягом 120 с (ka) з наступним періодом дисоціації протягом 120 с (kd) для визначення константи афінності (KD).

5 Фігура 7. (А) Дослідження афінності антитіл до SIRP у відношенні рекомбінантного білка SIRPb людини за допомогою системи BLItz™.

Рекомбінантний білок SIRPb-His іммобілізували на біосенсорі NINTA, і зазначені антитіла додавали в концентрації 20 мкг/мл. Значення були встановлені після періоду асоціації протягом 120 с (ka) з наступним періодом дисоціації протягом 120 с (kd) для визначення константи афінності (KD). (В) Аналіз зв'язування антитіл до SIRP (в якості покриття використовували SIRPb-His людини та детектували каппа-ланцюг людини). Зв'язування HEFLB (■), SIRP29 (Δ), Kwar23 (○), B4B6 (◆) і контрольного IgG4 (■) з іммобілізованим SIRPb-His оцінювали методом ІФА. Виявлення виконували з використанням антитіла віслюка до білка людини, за винятком B4B6, який виявляли за допомогою мишачого антитіла, і сигнал детектували колориметричним

15 методом при довжині хвилі 450 нм з використанням субстрату TMB.

Фігура 8. (А) Дослідження афінності антитіл до SIRP у відношенні рекомбінантного білка SIRPg людини за допомогою системи BLItz™.

Рекомбінантний білок SIRPg-His іммобілізували на біосенсорі N1NTA та зазначені антитіла додавали в концентрації 10 мкг/мл. Значення були встановлені після періоду асоціації протягом 120 с (ka) з наступним періодом дисоціації протягом 120 с (kd) для визначення константи афінності (KD). (В) Зв'язування антитіл до SIRP на SIRPg (в якості покриття використовували SIRPg-His людини та детектували каппа-ланцюг людини) кількісно досліджували методом ІФА. Зв'язування HEFLB (■), SIRP29 (Δ), Kwar23 (○), LSB2-20 (●) і контрольного IgG4 (■) на іммобілізованому SIRPg-His оцінювали методом ІФА. Виявлення виконували з використанням антитіла віслюка до білка людини, і сигнал детектували колориметричним методом при довжині хвилі 450 нм з використанням субстрату TMB.

Фігура 9. Дослідження афінності CD47 у відношенні рекомбінантного білка SIRPg людини, попередньо інкубованого з антитілами до SIRP, за допомогою системи BLItz™. Рекомбінантний білок SIRPg-His іммобілізували на біосенсорі 1MINTA в концентрації 10 мкг/мл, і зазначені антитіла додавали в концентрації 20 мкг/мл (насичуюча концентрація). Потім додавали CD47Fc в концентрації 100 мкг/мл, і значення афінності були встановлені після періоду асоціації протягом 120 с (ka) з наступним періодом дисоціації протягом 120 с (kd) для визначення константи афінності (KD).

Фігура 10. Геометричні середні значення інтенсивності флуоресценції, виміряні методом проточної цитометрії на (А) периферичних CD3⁺ Т-клітинах людини, (В) еритроцитах або (З) тромбоцитах після фарбування різними моноклональними антитілами та виявлення з використанням вторинного флуоресцентного антитіла до IgG.

Фігура 11. Відсоток позитивних периферичних CD3⁺ Т-клітин людини після фарбування різними моноклональними антитілами. У таблиці зазначене значення відсотка позитивних клітин в експериментах із двома повторами.

Фігура 12. Т-клітини людини, виділені з моноклеарних клітин периферичної крові здорових добровольців, стимулювали з використанням (А) (С) гранул, специфічних у відношенні CD3⁺ і CD28, у співвідношенні 1:1 протягом 3 днів або (В) (D) з використанням алогенних дендритних клітин (ДК) у співвідношенні 5 Т-клітин: 1 ДК протягом 5 днів, або (Е) з використанням різних концентрацій неочищеного білкового похідного туберкуліну (PPD) протягом 5 днів. Антитіла додавали на 0 день культивування. Проліферацію вимірювали шляхом вбудовування H³-тимідину протягом останніх 12 годин культивування.

Фігура 13. Мишачі CD8⁺ Т-клітини виділяли зі спленоцитів наївних мишей. CD8 Т-клітини стимулювали з використанням гранул, специфічних у відношенні CD3⁺ і CD28, взятих у співвідношенні 1:1 протягом 3 днів. Антитіла додавали на 0 день культивування. Проліферацію вимірювали шляхом вбудовування H³ - тимідину протягом останніх 12 годин культивування.

Фігура 14. Т-клітини людини, виділені з моноклеарних клітин периферичної крові здорових добровольців, стимулювали з використанням алогенних дендритних клітин (ДК) у співвідношенні 5 Т-клітин:1 ДК протягом 5 днів. Антитіла додавали на 0 день культивування. Проліферацію вимірювали шляхом вбудовування HP-тимідину протягом останніх 12 годин культивування.

Фігура 15. (А) Протипухлинна дія антитіл до SIRPa (клон P84) при в/ч введенні три рази на тиждень протягом 4 тижнів (300 мкг/ін'єкцію) в комбінації з двома ін'єкціями (4 і 8 день) МАТ до 4-1-BB (клон 3H3, 100 мкг/ін'єкцію) або без зазначеного антитіла, або ін'єкціями (два рази на тиждень) антитіла до PDL-1 (клон 10F.9G2, 200 мкг/ін'єкцію, лікування протягом 4 тижнів) або

без зазначеного антитіла в ортотопічній моделі гепатоми миші ($2,5 \times 10^6$ клітин Нера 1.6, які вводили шляхом ін'єкції у портальну вену на 0 день). Мишей вважали вилікованими, якщо період їхнього виживання в три рази перевищував час, протягом якого вмирали всі контрольні миші. (В) Інфільтруючі пухлини клітини досліджували на 13 день після інокуляції пухлини. (С) Інфільтруючі пухлини клітини та клітини селезінки досліджували на 13 день після інокуляції пухлини. (D) Мишей, раніше вилікованих в моделі гепатоми за допомогою ін'єкції комбінації антитіла до SIRPa й антитіла до 4-1BB, або мишей, мутантних за SIRPa, які отримували антитіло до 4-1BB, повторно заражали шляхом ін'єкції клітин Нера 1.6 в селезінку ($2,5 \times 10^6$ клітин/миша). Одночасно з цим, наївні миші також отримували ін'єкції, які вводяться аналогічним шляхом, щоб зрівняти розвиток пухлини з мишами після повторного зараження. Після цього миші не отримували лікування. (Е) Мишей, раніше вилікованих в моделі гепатоми за допомогою введення комбінації антитіла до SIRPa й антитіла до 4-1BB, повторно заражали шляхом ін'єкції клітин Нера 1.6 в селезінку ($2,5 \times 10^6$ клітин/миша), й їхні селезінки збирали через 30 днів після повторного зараження. Виділяли спленоцити та Т-клітинні спленоцити. Наївні миші отримували внутрішньовенні ін'єкції носія, цілих спленоцитів (10×10^6 /миша) або Т-клітин, очищених від спленоцитів ($2,5 \times 10^6$ /миша), і всі миші отримували ін'єкції клітин Нера 1.6 в селезінку ($2,5 \times 10^6$ клітин/миша). Після цього миші не отримували лікування та вважалися вилікованими, якщо період їхнього виживання перевищував у три рази час, протягом якого вмирали всі контрольні миші.

Фігура 16. Мишей, раніше вилікованих в моделі гепатоми шляхом ін'єкції комбінації антитіла до SIRPa й антитіла до PDL1, повторно заражали шляхом ін'єкції клітин Нера 1.6 в селезінку ($2,5 \times 10^6$ клітин/миша). Одночасно з цим, наївні миші також отримували ін'єкції, які вводяться аналогічним шляхом, щоб зрівняти розвиток пухлини з мишами після повторного зараження. Після цього миші не отримували лікування.

Фігура 17. Протипухлинна дія антитіла до SIRPa (клон P84) при в/ч введенні три рази на тиждень протягом 4 тижнів (200 мкг/ін'єкцію) в ортотопічній моделі мишачої карциноми молочної залози ($0,25 \times 10^6$ 4T1 клітин, ін'єктованих в молочну залозу). Розвиток пухлини оцінювали шляхом вимірювання діаметра пухлини та розраховували за формулою: $= (0,52 \cdot (d^2))^{1,5}$. Мишей піддавали евтаназії, коли розмір розвиненої пухлини становив приблизно 1000 мм^3 , відповідно до етичних міркувань.

Фігура 18. Дослідження фенотипу імунних клітин в селезінці, пухлині та лімфатичних вузлах мишей, які отримували антитіло до SIRPa (клон P84) або контрольне МАТ внутрішньочеревинно три рази на тиждень протягом двох тижнів (200 мкг/ін'єкцію) в ортотопічній моделі карциноми молочної залози миші ($0,25 \times 10^6$ клітин 4T1, ін'єктованих в молочну залозу). Дослідження імунних клітин проводили через два тижні після інокуляції пухлини.

Фігура 19. Антитіло до SIRPa (клон P84), антитіло до CD47 (клон M1AP410) і нецільове антитіло для контролю ізо типу вводили в концентрації 12 мг/кг внутрішньочеревинно на 0 день і 2 день мишам лінії C57B1/6. Зразки крові збирали на 0 і 3 день у пробірки, які містять ЕДТА, і загальний аналіз крові виконували за допомогою гематологічного аналізатора XS-800i (Sysmex). Рівень гемоглобіну (зліва) та відсоток гематокриту (справа) оцінювали на 3 день. Пунктирні лінії представляють значення нормального діапазону в мишей лінії C57B1/6 для кожного параметра.

Фігура 20. (Верхня панель) Дослідження методом проточної цитометрії МАТ до SIRPa (HEFLB, сірий) і МАТ до CD47 (B6H12, чорний) у порівнянні з контрольним МАТ (пунктирна лінія) на тромбоцитах людини, свіжовиділених з крові здорових донорів. (Нижня панель) Вимірювання агрегації тромбоцитів людини у присутності 50 мкг/мл контрольного МАТ. антитіла до SIRPa (HEFLB), антитіла до CD47 (B6H12) або антитіла до інтегрину- αIIb в якості позитивного контролю інгібітора агрегації за допомогою оптичного агрегометра. Антитіла оцінювали на неактивованих й АДФ-активованих тромбоцитах.

Фігура 21. Алогенні CD4⁺ Т-клітини культивували у співвідношенні 1:1 з CD14⁺ мієлоїдними клітинами, екстрагованими з (А) свіжих або (В) заморожених асцитів раку яєчників, у присутності 10 мкг/мл контрольного антитіла (білий), антитіла до SIRPa, HEFLB (чорний), або МАТ до CD47 (сірий). Проліферацію вимірювали на 5 день шляхом вбудовування H^3 -тимідину. (С) В іншому варіанті алогенні Т-клітини культивували у співвідношенні 5:1 з алогенними дендритними клітинами та різним співвідношенням CD14⁺ мієлоїдних клітин, екстрагованих з асцитів раку яєчників, у присутності 10 мкг/мл антитіла, зазначеного в (А).

ПРИКЛАДИ

У наступних прикладах антитіло "18D5" (або "m18D5") відповідає мишачому антитілу 18D5, "химерне" антитіло відповідає химерному антитілу миші/людини 18D5 й антитіла "HALA, HALB, HBLA, HBLB, HCLA, HCLB, HELA, HELB, HFLA, HFLB, HEFLA і HEFLB" відповідають конкретним гуманізованим варіантам 18D5. Антитіла 6G10 і 12D7 належать Заявнику; ці антитіла були

отримані тим самим способом, як і m18D5, і використовуються в якості контролю. Зазначені контрольні антитіла являють собою мишачі моноклональні антитіла IgG2a до SIRPa людини.

Крім цього, для порівняння використовували комерційні антитіла. Перше антитіло являє собою антитіло до SIRPa, назване SE7C2 (Santa Cruz sc-23863); друге антитіло являє собою антитіло, здатне розпізнавати обидва SIRP α/β і назване SE5A5 (Biolegend BLE323802); і третє антитіло являє собою антитіло до SIRPa людини, назване Kwar23 (Creative Biolabs). Антитіло до SIRPa людини, назване SIRP29, з Університету Торонто, описане у PCT публікації WO2013056352, використовували для порівняння.

Приклад 1. Дослідження зв'язування антитіл до SIRPa на SIRPa методом ІФА

Спосіб: активність зв'язування антитіл до SIRPa оцінювали методом ІФА. Для проведення кількісного дослідження методом ІФА з використанням химерного антитіла, гуманізовані антитіла, SIRP29 і Kwar23, рекомбінантний SIRPa людини (Sino Biologicals, Пекін, Китай; каталожний номер 11612-H08H) іммобілізували на пластику в концентрації 0,5 мкг/мл у карбонатному буфері (pH=9,2) й очищене антитіло додавали, щоб виміряти зв'язування. Після інкубації та промивання додавали мічене пероксидазою антитіло віслюка до IgG людини (Jackson Immunoresearch, США, каталожний номер 709-035-149) і виявляли звичайними способами.

Для проведення кількісного дослідження методом ІФА з використанням антитіл миші, рекомбінантний SIRPa людини (Sino Biologicals, Пекін, Китай; каталожний номер 10975-H08H) іммобілізували на пластику в концентрації 0,5 мкг/мл у карбонатному буфері (pH=9,2) та додавали очищене антитіло, щоб виміряти зв'язування. Після інкубації та промивання додавали мічене пероксидазою козяче антитіло до ланцюга Fc миші (Jackson Immunoresearch, каталожний номер 115-036-071) і виявляли звичайними способами.

Результати: як показано на Фігурі 1A, 1B і 1C, активність зв'язування різних антитіл до SIRPa на SIRPa, вимірювана методом ІФА, характеризувалася ефективними концентраціями (EC_{50}), що склали 2,9 нг/мл для химерного антитіла, 3,9 нг/мл для HALA, 5,1 нг/мл для HFLA, 4,0 нг/мл для HFLB, 7,1 нг/мл для HEFLA, 4,4 нг/мл HEFLB у першому експерименті, 4,06 нг/мл для химерного антитіла, 5,60 нг/мл для HCLA, 5,59 нг/мл для HCLB, 4,61 нг/мл для HELA, 4,13 нг/мл для HELB в другому експерименті та 2,74 нг/мл для химерного антитіла, 2,53 нг/мл для HALB, 2,68 нг/мл для HBLA, 2,95 нг/мл для HBLB в третьому експерименті. Отримані результати вказують на те, що антитіла згідно з даним винаходом ефективно зв'язували SIRPa, згідно з результатами ІФА, у порівнянні з іншими відомими антитілами до SIRPa, SIRP29 (3,7 нг/мл) і Kwar23 (3,3 нг/мл). Отримані результати вказують на те, що епітоп, розпізнаваний всіма антитілами згідно з даним винаходом, є доступним, коли SIRPa нанесений на пластикову ямку.

Як показано на Фігурі 1D, активність зв'язування різних антитіл до SIRPa на SIRPa, вимірювана методом ІФА, характеризувалася ефективною дозою (ED_{50}), яка склала 0,16 нМ (24 нг/мл) для SE5A5 і 0,06 нМ (9 нг/мл) для клону m18D5. Клон 6G10 і 12D7, очевидно, не зв'язувалися з SIRPa, згідно з результатами ІФА. Отримані результати вказують на те, що клон m18D5 ефективно зв'язував SIRPa, згідно з даними ІФА, у порівнянні з комерційним антитілом, і вказують на те, що епітоп, розпізнаваний цим клоном, є доступним, коли SIRPa нанесений на пластикову ямку, у порівнянні з клонами 6G10 і 12D7.

Приклад 2. Вимірювання афінності антитіл до SIRPa у відношенні SIRPa за допомогою біосенсора

Спосіб: рекомбінантний SIRPa людини (Sino Biologicals, Пекін, Китай, каталожний номер 11612-H08H) іммобілізували на сенсорному чипі CM5 (Gehealthcare, Франція) в концентрації 5 мкг/мл (500 од.відкл.), і різні концентрації антитіл вносили при швидкості потоку 40 мкл/хв. Дослідження проводили з використанням системи Biacore 3000 (Biacore, Gehealthcare). Значення вимірювали після 3 хв періоду асоціації (ka) з наступним 10 хв періодом дисоціації (kd) для визначення константи афінності (KD).

Результати: як показано на Фігурі 2, антитіла згідно з даним винаходом мають більше високу афінність (KD) у відношенні SIRPa (від $1,93 \times 10^{-10}$ М до $3,67 \times 10^{-10}$ М), яка еквівалентна афінності відомих антитіл до SIRPa, SIRP29 і Kwar23, і перевищує афінність комерційних антитіл до SIRPa, SE7C2 і SE5A5.

Приклад 3. Дослідження зв'язування SIRPa на моноцитах людини методом цитофлуориметрії

Спосіб: для вимірювання зв'язування антитіл до SIRPa на моноцитах людини, спочатку додавали інгібітор зв'язування з рецептором Fc людини (BD Pharmingen, США; каталожний номер 564220) й інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі, щоб блокувати рецептори Fc людини на моноцитах людини для зниження неспецифічного зв'язування. Потім антитіла інкубували протягом 30 хв при 4 °C і промивали перед фарбуванням протягом 30 хв

при 4 °C з використанням ФЕ-міченого антитіла до Fc IgG людини (Biolegend; США; каталожний номер 409303). У випадку антитіл миші використовували ФЕ-мічене антитіло до IgG миші (Jackson ImmunoResearch; каталожний номер 715-116-151). Зразки досліджували на цитофлуориметрі BD LSRII або Canto II.

Результати: як показано на Фігурі 3, результати вказують на сильне зв'язування антитіл до SIRPa згідно з даним винаходом на моноцитах людини та більш ефективно зв'язування (виміряне на підставі MFI (медіана інтенсивності флуоресценції)), ніж зв'язування відомих антитіл до SIRPa, Kvar23, SE7C2 і SE5A5.

Приклад 4. Кількісне дослідження конкурентного зв'язування CD47 й антитіл до SIRPa методом ІФА для оцінки антагоністичної активності

Спосіб: для проведення кількісного дослідження конкурентного зв'язування методом ІФА рекомбінантний SIRPa людини (Sino Biologicals, Пекін, Китай, каталожний номер 11612-H08H) іммобілізували на пластику в концентрації 0,5 мкг/мл у карбонатному буфері (pH=9,2). У випадку химерного антитіла гуманізовані антитіла, SIRP29 і Kvar23, очищене антитіло (в різних концентраціях) змішували з біотинільованим CD47Fc людини (Acrobiosystems interchim, Франція, каталожний номер CD7-H82F6) в кінцевій концентрації 6 мкг/мл (фіксована концентрація), щоб виміряти конкурентне зв'язування протягом 2 годин при 37 °C. Після інкубації та промивання мічений пероксидазою стрептавідин (Vector laboratoring, США; каталожний номер SA-5004) додавали для детектування зв'язування з biotth-CD47Fc і виявляли звичайними способами.

При застосуванні мишачих антитіл очищене антитіло (в різних концентраціях) змішували з 0,04 мкг/мл CD47Fc (Sino Biologicals, Пекін, Китай, каталожний номер 12283-H02H) для вимірювання конкурентного зв'язування протягом 2 годин при 37 °C. Після інкубації та промивання мічене пероксидазою антитіло віслюка до ланцюга Fc людини (Jackson ImmunoResearch, каталожний номер 709-035-149) додавали для детектування зв'язування CD47Fc і виявляли звичайними способами.

Результати: як показано на Фігурі 4, антитіла згідно з даним винаходом мали антагоністичну активність відносно взаємодії SIRPa-CD47. Зокрема, спостерігали, що химерне антитіло, HFLA, HFLB, HEFLA і HEFLB мали кращу антагоністичну активність у порівнянні з антагоністичною активністю SIRP29 і комерційного антитіла до SIRPa, SE5A5.

Приклад 5. Кількісне дослідження конкурентного зв'язування CD47 і гуманізованих антитіл до SIRPa на моноцитах людини методом цитофлуориметрії для оцінки антагоністичної активності

Спосіб: для вимірювання конкуренції між CD47 і гуманізованими антитілами до SIRPa на моноцитах людини, очищене антитіло додавали на моноцити й інкубували протягом 15 хв при 4 °C, потім змішували з біотинільованим CD47Fc людини (Acrobiosystems Interchim, Франція; каталожний номер CD7-H82F6) в кінцевій концентрації 5 мкг/мл й інкубували протягом 30 хв при 4 °C, щоб виміряти конкуруюче антитіло, яке зв'язується. Після інкубації та промивання ФЕ-мічений стрептавідин (BD Biosciences, США, каталожний номер 554061) додавали й інкубували протягом 15 хв при 4 °C для детектування зв'язування біотин-CD47Fc і досліджували на цитофлуориметрі BD LSRII або Canto II.

Щоб виміряти конкуренцію між CD47 і мишачими антитілами до SIRPa людини на моноцитах людини, очищене антитіло додавали на моноцити протягом 15 хв при 4 °C, потім змішували з CD47Fc (Sino Biologicals, Пекін, Китай, каталожний номер 12283-H02H) в кінцевій концентрації 5 мкг/мл й інкубували протягом 15 хв при 4 °C, щоб виміряти конкуруюче антитіло, яке зв'язується. Після інкубації та промивання Ftc-мічене антитіло до Fc людини (Beckman Coulter, каталожний номер IM 1627) додавали й інкубували протягом 15 хв при 4 °C для детектування зв'язування CD47Fc і досліджували на цитофлуориметрі BD LSRII або Canto II.

Результати: як показано на Фігурі 5, антитіла згідно з даним винаходом мають антагоністичну активність відносно взаємодії SIRPa-CD47 на моноцитах людини.

Приклад 6. Дослідження конкурентного зв'язування у присутності SP-D за допомогою системи BLItz™

Спосіб: даний спосіб виконували за допомогою системи BLItz™ (Forté Bio, США, каталожний номер C22-2 № 61010-1).

Умова А: SIRPa + антитіло до SIRPa + білок сурфактанта D (SP-D). На першому етапі рекомбінантний білок SIRPa (His) (Sino Biologicals, Пекін, Китай, каталожний номер 11612-H08H) іммобілізували в концентрації 10 мкг/мл за допомогою гістидинового хвоста на біосенсорі Ni-NTA (Forté Bio, США, каталожний номер 18-0029) протягом 30 секунд. На другому етапі антитіла до SIRPa додавали в концентрації 20 мкг/мл (насичуюча концентрація) протягом 120 секунд. Потім SP-D людини (R&D Systems, США, каталожний номер 1920-SP-050) асоціювали в

концентрації 100 мкг/мл, в умовах конкуренції з антитілами до SIRPa, протягом 120 секунд. Дисоціацію SP-D проводили у кінетичному буфері протягом 120 секунд. Аналіз даних виконували з використанням програмного забезпечення BLItz™ pro 1.2, за допомогою якого розраховували константу асоціації (k_a) та константу дисоціації (k_d), а також визначили константу афінності KD (k_a/k_d).

Умова В: SIRPa + білок сурфактанта D (SP-D) + антитіло до SIRPa. На першому етапі рекомбінантний білок SIRPa (His) (Sino Biologicals, Пекін, Китай, каталожний номер 11612-H08H) іммобілізували за допомогою гістидинового хвоста в концентрації 10 мкг/мл на біосенсорі Ni-NTA (Forté Bio, США, каталожний номер 18-0029) протягом 30 секунд. На другому етапі SP-D людини (R&D Systems, США, каталожний номер 1920-SP-050) додавали в концентрації 100 мкг/мл протягом 120 секунд. Потім антитіла до SIRPa асоціювали в концентрації 20 мкг/мл (насичуюча концентрація) протягом 120 секунд. Дисоціацію антитіла до SIRPa проводили у кінетичному буфері протягом 120 секунд. Аналіз даних виконували з використанням програмного забезпечення BLItz™ pro 1.2, за допомогою якого розраховували константу асоціації (k_a) та константу дисоціації (k_d), а також визначили константу афінності KD (k_a/k_d).

Результати: як показано на Фігурі 6, зв'язування антитіла до SIRPa, 18D5, не блокувало зв'язування SP-D з SIRPa, і зв'язування SP-D не блокувало зв'язування 18D5 з SIRPa. Отже, антитіло згідно з даним винаходом не інгібує взаємодію SIRPa і SP-D.

Приклад 7. Дослідження афінності антитіл до SIRPa у відношенні SIRPb за допомогою системи BLItz™

Спосіб: даний спосіб виконували за допомогою системи BLItz™ (Forté Bio, США, каталожний номер C22-2 № 61010-1). Рекомбінантний hSIRPb-His (Antibodies-online, США, каталожний номер ABIN3077231) іммобілізували за допомогою гістидинового хвоста в концентрації 10 мкг/мл на біосенсорі Ni-NTA (Forté Bio, США, каталожний номер 18-0029) протягом 30 секунд. Потім антитіло до SIRPa асоціювали в концентрації 20 мкг/мл протягом 120 секунд. Дисоціацію антитіла до SIRPa проводили у кінетичному буфері протягом 120 секунд. Аналіз даних виконували з використанням програмного забезпечення BLItz™ pro 1.2, за допомогою якого розраховували константу асоціації (k_a) та константу дисоціації (k_d), а також визначили константу афінності KD (k_a/k_d).

Результати: як показано на Фігурі 7A, антитіла згідно з даним винаходом мали більше низьку афінність у відношенні SIRPb у порівнянні з SIRPa. Зокрема, відзначено, що химерне антитіло, HFLA, HFLB, HEFLA, HEFLB мали знижену афінність у відношенні SIRPb у порівнянні з SIRP29 і Kwar23.

Приклад 8. Дослідження зв'язування антитіл до SIRP на SIRPb методом ІФА

Спосіб: для кількісного дослідження активності методом ІФА, рекомбінантний hSIRPb-His (Antibodies-online; США; каталожний номер ABIN1466557) іммобілізували на пластику в концентрації 1 мкг/мл у карбонатному буфері (pH=9,2) й очищене антитіло додавали, щоб виміряти зв'язування. Після інкубації та промивання мічене пероксидазою антитіло віслюка до IgG людини (Jackson ImmunoResearch, США, каталожний номер 709-035-149) додавали та виявляли звичайними способами.

Результати: як показано на Фігурі 7B, антитіла до SIRPa мали низьку афінність у відношенні SIRPb. Слід вказати, що виявлення виконували з використанням антитіла віслюка до антитіла людини для всіх антитіл за винятком B4B6 (виявляли з використанням мишачого антитіла), це може пояснити той факт, що сигнал, отриманий для антитіла до SIRPb, B4B6, нижче сигналу, отриманого для антитіл до SIRPa.

Приклад 9. Дослідження афінності антитіл до SIRPa у відношенні SIRPg за допомогою системи BLItz™

Спосіб: даний спосіб виконували за допомогою системи BLItz™ (Forté Bio, США, каталожний номер C22-2 № 61010-1). Рекомбінантний hSIRPg-His (Sino Biologicals, Пекін, Китай, каталожний номер 11828-H08H) іммобілізували за допомогою гістидинового хвоста в концентрації 10 мкг/мл на біосенсорі Ni-NTA (Forté Bio, США, каталожний номер 18-0029) протягом 30 секунд. Потім антитіло до SIRPa асоціювали в концентрації 20 мкг/мл протягом 120 секунд. Дисоціацію антитіла до SIRPa проводили у кінетичному буфері протягом 120 секунд. Аналіз даних виконували з використанням програмного забезпечення BLItz™ pro 1.2, за допомогою якого розраховували константу асоціації (k_a) та константу дисоціації (k_d), а також визначили константу афінності KD (k_a/k_d).

Результати: як показано на Фігурі 8A, антитіла до SIRPa згідно з даним винаходом мали низьку афінність у відношенні SIRPg. Така афінність незначно слабкіше, ніж афінність відомих антитіл до SIRPa, SIRP29 і Kwar23. Однак кінетичні властивості різнилися в антитіл до SIRPa, SIRP29 і Kwar23, при цьому для антитіл до SIRPa була характерна висока константа швидкості

дисоціації (Kd) у порівнянні з SIRP29 і Kwar23. Зокрема, антитіло HFLB мало найнижчу афінність у відношенні SIRPg зі значенням K.D, що склали $1,036 \times 10^{-7}$ М, що дорівнює різниці в 2 log у порівнянні зі значеннями KD для SIRP29 і Kwar23.

Приклад 10. Дослідження зв'язування антитіл до SIRPa на SIRPg методом ІФА

Спосіб: для кількісного дослідження активності методом ІФА, hSIRPg-His (Sino Biologicals, Пекін, Китай, каталожний номер 11828-H08H) іммобілізували на пластику в концентрації 1 мкг/мл у карбонатному буфері (pH=9,2) та додавали очищене антитіло, щоб виміряти зв'язування. Після інкубації та промивання мічене пероксидазою антитіло віслюка до IgG людини (Jackson ImmunoResearch, США, каталожний номер 709-035-149) додавали і виявляли звичайними способами.

Результати: як показано на Фігурі 8B, антитіло до SIRPa, HEFLB, не зв'язувалося з SIRPg, тоді як відомі антитіла до SIRPa, SIRP29 і Kwar23, проявляли значне зв'язування з SIRPg.

Приклад 11. Дослідження конкуренції з CD47 за зв'язування з SIRPg за допомогою системи BLItz™: SIRPg + антитіло до SIRPa+CD47

Спосіб: даний спосіб виконували за допомогою системи BLItz™ (Forté Bio, США, каталожний номер C22-2 № 61010-1). На першому етапі hSIRPg-His (Sino Biologicals, Пекін, Китай, каталожний номер 11828-H08H) іммобілізували в концентрації 10 мкг/мл за допомогою гістидинового хвоста на біосенсорі Ni-NTA (Forté Bio, США, каталожний номер 18-0029) протягом 30 секунд. На другому етапі антитіло до SIRPa додавали в концентрації 20 мкг/мл (насичуюча концентрація) протягом 120 секунд. Потім CD47Fc людини (Sino Biologicals, Пекін, Китай, каталожний номер 12283-H02H) асоціювали в концентрації 100 мкг/мл, в умовах конкуренції з антитілами до SIRPa, протягом 120 секунд. Дисоціацію CD47Fc проводили у кінетичному буфері протягом 120 секунд. Аналіз даних виконували з використанням програмного забезпечення BLItz™ pro 1.2, за допомогою якого розраховували константу асоціації (ka) та константу дисоціації (kd), а також визначили константу афінності KD (ka/kd).

Результати: як показано на Фігурі 9, антитіло до SIRPa, HEFLB, згідно з даним винаходом не конкурувало з CD47 за зв'язування з SIRPg. Напроти, інші відомі антитіла SIRP29 і, зокрема, kwar23, конкурували з CD47 за зв'язування з SIRPg.

Приклад 12. Дослідження зв'язування з еритроцитами методом проточної цитометрії

Спосіб: експеримент проводили для дослідження зв'язування антитіл до SIRPa на клітинах крові людини. CD3-позитивні Т-лімфоцити, еритроцити та тромбоцити екстрагували з очищеної крові від здорових добровольців. Потім клітини фарбували протягом 30 хв при 4 °C з використанням 10 мкг/мл кожного випробовуваного антитіла, промивали та потім фарбували вторинним флуоресцентноміченим антитілом до IgG протягом ще 30 хв при 4 °C. Після промивань клітини досліджували на проточному цитометрі CANTO II (BD Bioscience).

Результати: як показано на Фігурі 10, Т-клітини, еритроцити та тромбоцити були позитивними на наявність CD47, який повсюдно експресується, і клітини були пофарбовані антитілом B6H12. Антитіла SIRP29 і Kwar23, такі як LSB2.20 (специфічне антитіло до SIRPγ), зв'язуються з Т-клітинами, які, як відомо, експресують SIRPγ. Проте, гуманізоване антитіло до SIRPa, 18D5, не зв'язувалося з Т-клітинами (аналогічні результати були отримані з використанням чотирьох різних випробовуваних варіантів гуманізованого 18D5). Еритроцити та тромбоцити не експресують SIRPa і, отже, вони не були виявлені за допомогою гуманізованого антитіла 18D5 й інших антитіл до SIRPa.

Отриманий результат свідчить про специфічність гуманізованого антитіла 18D5 у відношенні SIRPa на живих клітинах у порівнянні з відомими антитілами до SIRPa.

Як показано на Фігурі 11, Т-клітини не пофарбувались гуманізованим антитілом 18D5 (аналогічні результати були отримані при використанні п'яти різних випробовуваних гуманізованих варіантів 18D5) і химерним 18D5 (дані не показані), тоді як більше 70 % Т-клітин пофарбувались SIRP29 і Kwar23.

Приклад 13. Проліферація CD3+Т-клітин людини

Спосіб: МКПК людину виділяли з лейкоцитарної плівки здорових добровольців. CD4 або CD8 Т-клітини відбирали шляхом позитивного відбору з використанням Automacs (Miltenyi) і висіювали в 96-ямковий планшет (50000 клітин/ямку). Проліферативні сигнали забезпечували за допомогою мікрогранул, покритих агентами проти CD3/CD28 (Lifetechnologies), у співвідношенні 1 гранула: 1 Т-клітина протягом трьох днів або алогенних зрілих дендритних клітин, отриманих в умовах in vitro, у співвідношенні 5 Т-клітин:1 зріла ДК протягом 5 днів або за допомогою різних концентрацій неочищеного білкового похідного туберкуліну (PPD) протягом 5 днів. Антитіла, націлені на шлях SIRPa/CD47, додавали на початку випробування проліферації в насичуючій концентрації (10 мкг/мл). Проліферацію вимірювали шляхом вбудовування H³-тимідину протягом останніх 12 годин культивування.

Результати: як показано на Фігурі 12, антитіло до SIRPa, HALA, і варіанти HEFLB не інгібували проліферацію Т-клітин при стимуляції Т-клітин гранулами, специфічними у відношенні CD3⁺/CD28 (A) (C), або алогенними дендритними клітинами (B) (D) або PPD (E), у той час як антитіло до SIRPa, Kwar23, інгібувало проліферацію Т-клітин при стимуляції Т-клітин алогенними дендритними клітинами. Як і очікувалося, антитіла до CD47 й антитіло до SIRPg були інгібіторами проліферації Т-клітин.

Приклад 14. Проліферація CD8⁺ Т-клітин миші

Спосіб: спленоцити виділяли в наївних мишей. CD8 Т-клітини відбирали за допомогою позитивного відбору з використанням Automacs (Miltenyi) і висіювали в 96-ямковий планшет (50000 клітин/ямку). Проліферативні сигнали забезпечували за допомогою мікрогранул, специфічних у відношенні CD3/CD28 (Lifetechnologies), у співвідношенні 1 гранула:1 Т-клітина протягом трьох днів. Мишаче антитіло до SIRPa (P84) й антитіло до CD47 (M1AP310), націлені на шлях SIRPa/CD47, додавали на початку випробування проліферації в насичуючій концентрації (10 мкг/мл). Проліферацію вимірювали шляхом вбудовування H³-тимідину протягом останніх 12 годин культивування.

Результати: як показано на Фігурі 13, антитіло до SIRPa або антитіло до CD47 не інгібували проліферацію Т-клітин миші. Цей результат пояснюється тим фактом, що миші не експресують ген SIRPg. Отже, мишей можна використовувати в якості моделі для передбачення ефектів специфічного антитіла до SIRPa, яке не зв'язується з SIRPg, в умовах *in vivo*. Напроти, доклінічна ефективність антитіла до CD47 або неселективних антитіл до SIRPa в умовах *in vivo*, зокрема, вплив на адаптивний імунітет і вироблення Т-лімфоцитів пам'яті, не має прогностичну цінність в людини.

Приклад 15. Проліферація Т-клітин людини

Спосіб: МКПК людини виділяли з лейкоцитарної плівки здорових добровольців. CD4 або CD8 Т-клітини відбирали за допомогою позитивного відбору з використанням Automacs (Miltenyi) і висіювали в 96-ямковий планшет (50000 клітин/ямку). Проліферативні сигнали забезпечували за допомогою мікрогранул, специфічних у відношенні CD3/CD28 (Lifetechnologies), у співвідношенні 1 гранула: 1 Т-клітина протягом трьох днів, або алогенних зрілих дендритних клітин, отриманих в умовах *in vitro*, у співвідношенні 5 Т-клітин: 1 зріла ДК протягом 5 днів. Антитіла додавали на початку випробування проліферації в насичуючій концентрації (5 мкг/мл для антитіл до CD47 й антитіл до SIRPa і 2,5 мкг/мл для антитіл до PD-1/PD-L1 і рекомбінантного 4-1BBL). Проліферацію вимірювали шляхом вбудовування H³-тимідину протягом останніх 12 годин культивування.

Результати: як показано на Фігурі 14, антитіла до PD-1/PD-L1 і рекомбінантний 4-1BBL мали стимулюючу дію на проліферацію Т-клітин людини, у той час як антитіло до CD47 впливало на проліферацію Т-клітин людини. Зокрема, антитіло до CD47 запобігало імуностимулюючу ефективність агоністичних агентів, спрямованих проти PD-1/PD-L1 або 4-1BB, у відношенні Т-клітин людини. Антитіло до SIRPa, HEFLB, не виявляло значного впливу на проліферацію Т-клітин.

Приклад 16. Протипухлинні ефекти в мишей

Спосіб: мишей анестезували з використанням коктейлю ксилазин/кетамін. Після лапаротомії пухлинні клітини Нера 1.6 вводили шляхом ін'єкції порталну вену ($2,5 \times 10^6$ клітин/100 мкл) у ФСБ. Лікування починали через 4 дні після ін'єкції пухлини. Агоністичне моноклональне антитіло до 4-1 BB (3H3) вводили шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції два рази на 4 і 8 день після ін'єкції клітин Нера 1.6 (клітини карциноми печінки. HCC) у ФСБ (100 мкг/ін'єкцію). Моноклональне антитіло до PDL1 вводили шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції два рази на тиждень протягом 4 тижнів у ФСБ (200 мкг/ін'єкцію). Антагоністичне антитіло до SIRPa (P84) вводили шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції три рази на тиждень протягом чотирьох тижнів у ФСБ (300 мкг/ін'єкцію).

Протипухлинну відповідь оцінювали в ортотопічній моделі HCC через тринадцять днів після інокуляції пухлини. У цей час пухлину та селезінку збирали, щоб фенотипувати імунні клітини, які інфільтрували у пухлину або попадали в системний кровотік. Спленоцити та непаренхіматозні клітини (НПК) печінки, які є інфільтруючими імунними клітинами, фарбували з використанням чотирьох різних сумішей для реєстрації методом проточної цитометрії.

Результати: як показано на Фігурі 15A, антитіло до SIRPa окремо значно збільшувало виживання у частки мишей (28 %). У комбінації з антитілом до 4-1BB або антитілом до PDL1 антитіло до SIRPa забезпечувало дуже високу частоту відповіді в мишей, які виживали навіть після відміни лікування.

Як показано на Фігурі 15B, комбінація антитіла до SIRPa з костимулюючим агентом (наприклад, антитілом до 4-1BB) або інгібітором контрольної точки Т-клітин (наприклад,

антитілом до PDL1) модифікувала мікрооточення пухлини шляхом зменшення кількості регуляторних й імуносупресорних імунних клітин (регуляторних Т-клітин, Мо-MDSC), збільшуючи при цьому накопичення ефекторних CD8⁺ Т-клітин пам'яті, у випадку комбінації з антитілом до 4-1 BB. Мо-MDSC характеризуються високим рівнем експресії Ly6C та відсутністю

5 Ly6G у популяції, позитивної на наявність CD11b і негативної на наявність ГКГС класу II.
Як показано на Фігурі 15C, комбінація антитіла до SIRPa з коstimулюючим агентом (наприклад, антитілом до 4-1 BB) або інгібітором контрольної точки Т-клітин (наприклад, антитілом до PDL1) модифікувала клітинний склад мікрооточення пухлини та на периферії в селезінці, зменшуючи частоту незрілих і наївних В-клітин, збільшуючи при цьому накопичення

10 клітин пам'яті та плазмобластів. Аналогічним чином, комбінація антитіла до SIRPa з антитілом до 41BB або антитілом до PDL1 індукувала накопичення цитолітичних (CD 27-негативних) NK-клітин у пухлині та на периферії.

У сукупності отримані результати вказують на те, що антитіло до SIRPa модифікувало пухлину та периферичний імунітет, зокрема, адаптивні (Т-клітини, регуляторні Т-клітини, В-

15 клітини) і вроджені (MDSC, макрофаги, NK-клітини) імунні клітини, що сприяють усуненню пухлини та довгостроковому захисту.

Приклад 17. Протипухлинні ефекти у раніше вилікуваних мишей

Спосіб: мишей, раніше вилікуваних в моделі гепатоми за допомогою ін'єкцій комбінації антитіла до SIRPa й антитіла до 4-1 BB, або мишей, мутантних за SIRPa, які отримували антитіло до 4-1BB, повторно заражали шляхом ін'єкції клітин Нера 1.6 в селезінку ($2,5 \times 10^6$ клітин/миша). Мишей анестезували з використанням 3 % ізофлурану в повітрі. Потім на боці мишей робили розріз, витягали селезінку, і пухлинні клітини Нера 1.6 у ФСБ вводили в селезінку шляхом ін'єкції ($2,5 \times 10^6$ клітин/50 мкл). Одночасно з цим, наївні миші також отримували ін'єкції, які вводяться аналогічним шляхом, щоб зрівняти розвиток пухлини з мишами після повторного

25 зараження.
Результати: як показано на Фігурі 15D, усі вилікувані миші вижили при повторному зараженні, і, навпаки, всі наївні миші загинули. Цей результат демонструє, що терапія антитілом до SIRPa або відсутність сигналів SIRPa (миші, мутантні за SIRPa) призводили до індукції Т-клітин пам'яті, які все ще зберігалися протягом тривалого строку у вилікуваних мишей.

30 Приклад 18. Протипухлинні ефекти Т-клітинних спленоцитів або цілих спленоцитів, зібраних у раніше вилікуваних мишей

Спосіб: мишей після повторного зараження, вилікуваних за допомогою комбінації антитіла до SIRPa й антитіла до 4-1BB, піддавали евтаназії та збирали селезінку. Після лізису еритроцитів екстрагували спленоцити, і CD3-позитивні Т-клітини виділяли з частини спленоцитів за допомогою Automacs. Після анестезії мишам вводили шляхом внутрішньовенної ін'єкції Т-клітинні спленоцити ($2,5 \times 10^6$ клітин/100 мкл) або цілі спленоцити (10×10^6 клітин/100 мкл), або тільки допоміжну речовину (ФСБ). Всі миші отримували клітини Нера 1.6 через порталну вену, як описано раніше ($2,5 \times 10^6$ клітин/100 мкл).

Результати: як показано на Фігурі 15E, спленоцити та виділені Т-лімфоцити, зібрані у вилікуваних мишей, виявляли сильний позитивний вплив на виживання мишей. Ці результати вказують на те, що Т-клітини пам'яті були присутні серед спленоцитів вилікуваних мишей після лікування гепатоми та були відповідальні за довгострокову адаптивну імунну пам'ять.

Приклад 19. Протипухлинні ефекти у раніше вилікуваних мишей

Спосіб: мишей, раніше вилікуваних в моделі гепатоми шляхом ін'єкції комбінації антитіла до SIRPa й антитіла до PDL-1, повторно заражали шляхом ін'єкції клітин Нера 1.6 в селезінку ($2,5 \times 10^6$ клітин/миша). Мишей анестезували з використанням 3 % ізофлурану в повітрі. Потім на боці мишей робили розріз, витягали селезінку, і пухлинні клітини Нера 1.6 у ФСБ вводили шляхом ін'єкції в селезінку ($2,5 \times 10^6$ клітин/50 мкл). Одночасно з цим, наївні миші також отримували ін'єкції, які вводяться аналогічним шляхом, щоб зрівняти розвиток пухлини з

50 мишами після повторного зараження.
Результати: як показано на Фігурі 16, усі вилікувані миші вижили при повторному зараженні та, навпаки, всі наївні миші загинули. Цей результат свідчив про те, що Т-клітини пам'яті все ще були присутні у вилікуваних мишей. Цей результат продемонстрував, що терапія із застосуванням антитіла до SIRPa індукувала Т-клітини пам'яті, які все ще зберігалися протягом

55 тривалого часу у вилікуваних мишей.

Приклад 20. Вплив на ріст пухлини в моделі карциноми молочної залози

Спосіб: мишей анестезували з використанням 3 % ізофлурану в повітрі. Мишей голили в області черевної порожнини, і клітини 4T1 в 50 мкл ФСБ вводили шляхом ін'єкції за допомогою інсулінового шприца (30 Gauges) в молочну залозу. Антагоністичне антитіло до SIRPa (P84) або

контрольне антитіло у ФСБ вводили шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції три рази на тиждень протягом чотирьох тижнів (200 мкг/ін'єкцію).

Результати: як показано на Фігурі 17, антитіло до SIRPa значно ($p < 0,01$) зменшувало ріст пухлини в моделі карциноми молочної залози у порівнянні з контрольним антитілом.

5 На Фігурі 18 представлені результати дослідження імунних клітин через два тижні після інокуляції. Антитіло до SIRPa виявляло позитивну дію на мієлоїдні та не мієлоїдні клітини (T і NK-клітини) як у пухлині, так і на периферії (селезінці) з сильним зниженням кількості регуляторних T-клітин і накопиченням T-клітин пам'яті.

Приклад 21. Вплив антитіл до SIRPa на концентрацію гемоглобіну та гематокрит

10 Спосіб: антитіло до SIRPa (клон P84), антитіло до CD47 (клон M1AP410) і нецільове антитіло для контролю ізо типу вводили внутрішньочеревинно на 0 і 2 день в концентрації 12 мг/кг мишам лінії C57B1/6. Зразки крові збирали на 0 і 3 день у пробірки, які містять EDTA, і загальний аналіз крові проводили за допомогою гематологічного аналізатора XS-800i (Sysmex). Рівень гемоглобіну (зліва) та відсоток гематокриту (справа) оцінювали на 3 день.

15 Результати: як показано на Фігурі 19, антитіло до SIRPa не виявляло токсичної дії на концентрацію гемоглобіну та гематокрит. Напроти, антитіло до CD47 індукувало зниження концентрації гемоглобіну та зменшення гематокриту, що узгоджувалося з анемією, яка спостерігалась під час фази 1 в людини.

Приклад 22. Агрегація тромбоцитів

20 Спосіб: кров збирали в здорових добровольців-донорів у пробірки для збору зразків Vacuette (Greiner Bio-One), які містять в якості буферу цитрат натрію. Збагачену тромбоцитами плазму крові (PRP) та збіднену тромбоцитами плазму крові (PPP) отримували шляхом центрифугування протягом 10 хвилин при 200 g і 15 хв при 3500 g, відповідно. Робочу PRP коригували до 3×10^8 тромбоцитів/л⁻¹. Кількісні дослідження інгібування: MAT попередньо інкубували з PRP для кінцевої концентрації випробовуваних антитіл 40 або 50 мкг/мл. Через 3 хвилини без перемішування агрегацію тромбоцитів ініціювали додаванням 5 мкМ АДФ. Агрегацію визначали шляхом вимірювання пропускання світла через зразок при 37 °C при безперервному перемішуванні з використанням стандартного оптичного агрегометра (TA-8V Thrombo-Aggregometer, SD Innovation SAS, Фруар, Франція). Пропускання PPP встановлювали як 100 %. Агрегацію реєстрували при перемішуванні в цілому протягом 5 хвилин. Кількісні дослідження індукції: агрегацію тромбоцитів безпосередньо ініціювали додаванням MAT (50 мкг/мл). Агрегацію реєстрували при перемішуванні в цілому протягом 10 хвилин.

30 Результати: як показано на Фігурі 20, на відміну від антитіл до CD47, антитіла до SIRPa не зв'язувалися з еритроцитами або тромбоцитами людини. Отже, антитіло до CD47 індукувало агрегацію тромбоцитів в умовах *in vitro*, тоді як антитіла до SIRPa не виявляли такої дії. Аналогічним чином, антитіла до SIRPa не порушували оборотну АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів людини, тоді як антитіло до інтегрину $\alpha 2b$ повністю нейтралізувало її.

Приклад 23. Проліферація алогенних T-клітин під дією SIRPa-блокувальних CD14⁺ клітин з асциту раку яєчників

40 Спосіб: алогенні CD4-T-клітини виділяли за допомогою позитивного відбору з використанням Automacs (Miltenyi) із МКПК людини з лейкоцитарної плівки здорового добровольця. CD4 висіювали в 96-ямковий планшет (50000 клітин/ямку). CD14⁺ клітини виділяли аналогічним способом з асциту пацієнтки з раком яєчників. Клітини CD14⁺ висіювали з алогенними CD4-T-клітинами у співвідношенні 1:1 протягом 5 днів. В деяких умовах алогенні дендритні клітини моноцитарного походження людини (moDC), дозрівання яких індукували ЛПС, додавали у співвідношенні 1:5 для стимуляції T-клітин, і досліджували імуносупресорну дію різного співвідношення CD14⁺MDSC, очищених з асциту. Антитіла, націлені на шлях SIRPa/CD47, додавали на початку випробування проліферації в насичуючій концентрації (10 мкг/мл). Проліферацію вимірювали шляхом вбудовування H³-тимідину протягом останніх 12 годин культивування.

Результати: як показано на Фігурах 21A и 21B, свіжі та заморожені мієлоїдні клітини людини (TAM), очищені з асцитів раку яєчників, являли собою гіпостимулюючі алогенні T-лімфоцити людини. На відміну від антитіл до CD47, антитіла до SIRPa модифікували властивості мієлоїдних клітин, забезпечуючи активацію та проліферацію T-клітин людини.

55 Як показано на Фігурі 21C, мієлоїдні клітини людини (MDSC), очищені з асцитів раку яєчників, могли пригнічувати проліферацію T-клітин людини, індуковану алогенними moDC при співвідношенні мієлоїдних клітин і T-клітин 1:1 і 2:1. На відміну від антитіл до CD47, антитіла до SIRPa не підсилювали імуносупресію, індуковану MDSC людини.

Перелік послідовностей

<110> OSE IMMUNOTHERAPEUTICS

<120> Нові антитіла до SIRPa та варіанти їх терапевтичного застосування

<130> F2173/8PCT

<150> US 62/322,707

<151> 2016-04-14

<150> EP 17305182.2

<151> 2017-02-17

<160> 73

<170> Patentin, версія 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Leu Ile Pro Val Gly Pro
1 5

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1).. (1)

<223> Xaa = G або A

<400> 2

Xaa Arg Glu Leu Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His
1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Xaa = DV або T

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)...(9)

<223> Xaa може являти собою будь-яку природню амінокислоту

<400> 3

Lys Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Xaa Glu
1 5 10

<210> 4
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 4
 Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly Phe Ser Pro Arg
 1 5 10 15
 Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe
 20
 10
 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 5
 Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly
 1 5 10
 20
 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 25
 Tyr Pro Glu Arg Leu Gln Leu Thr Trp Leu Glu
 1 5 10
 30
 <210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 35
 Gly Arg Glu Leu Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His
 1 5 10
 40
 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 45
 Lys Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu
 1 5 10
 50
 <210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

Ala Arg Glu Leu Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His
1 5 10

<210> 10
<211> 10
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Lys Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Thr Glu
1 5 10

10 <210> 11
<211> 7
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens

<400> 11

Gly Arg Glu Leu Ile Tyr Asn
1 5

20 <210> 12
<211> 22
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

<400> 12

His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly Phe Ser Pro Arg Asp
1 5 10 15

Ile Thr Leu Lys Trp Phe
20

30 <210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 13

Ala Arg Glu Leu Ile Tyr Asn
1 5

40 <210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
45 <223> CDR1 важкого ланцюга

<400> 14

Ser Tyr Trp Val His
1 5

50 <210> 15

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

5

<220>
 <223> CDR2 важкого ланцюга

<400> 15
 Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

10

Asp
 <210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

15

<220>
 <22 3> CDR2 важкого ланцюга

20

<400> 16
 Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr His Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Gly
 <210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

25

<220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга

30

<400> 17
 Gly Gly Thr Gly Thr Met Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

35

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

40

<220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга

<400> 18
 Gly Gly Thr Gly Thr Leu Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

45

<210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

50

<220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга

5 <400> 19

Gly Gly Thr Gly Thr Met Ala Tyr Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

15 <220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга

<400> 20

Gly Gly Thr Gly Thr Leu Ala Tyr Phe Ala Tyr
 1 5 10

20 <210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

25 <220>
 <223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 21

30 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

<210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

35 <220>
 <223> CDR2 легкого ланцюга

40 <400> 22

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

45 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

50 <220>
 <223> CDR3 легкого ланцюга

<400> 23

55 Phe Gln Gly Thr His Val Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 24
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

5

<220>
 <223> Варіабельний домен важкого ланцюга

<400> 24

10

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Gln Leu Val Arg Pro Gly Ser
1      5      10      15

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

Trp Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro His Gln Gly Leu Gln Trp His
35     40     45

Gly Asp Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50     55     60
Lys Asp Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65     70     75     80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Gln Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85     90     95

Val Arg Gly Gly Thr Gly Thr Met Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100    105    110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115    120
    
```

<210> 25
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

15

<220>
 <223> Варіабельний домен важкого ланцюга

20

<400> 25

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Val His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asp His Val Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Gly Gly Thr Gly Thr Met Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Glu
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26

5 <211> 120

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

10 <223> Варіабельний домен важкого ланцюга

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Val His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asp His Val Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Gly Gly Thr Gly Thr Met Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27

<211> 120

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельний домен важкого ланцюга

<400> 27

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Gln Val Lys Lys Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Val His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr His Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly His Val Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Gly Gly Thr Gly Thr Met Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельний домен важкого ланцюга

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Val His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr His Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly His Val Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Gly Gly Thr Gly Thr Leu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 29
<211> 120
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Val His Trp Val Arg His Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr His Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

15

Gln Gly His Val Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Gly Gly Thr Gly Thr Met Ala Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5
<210> 30
<211> 120
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

10
<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга
<400> 30

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Val His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr His Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly His Val Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Gly Gly Thr Gly Thr Leu Ala Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15
<210> 31
<211> 112
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

20
<220>
<223> Варіабельний домен легкого ланцюга

<400> 31

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Tyr Gly Asp Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys His
65 70 75 80

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

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys
100 105 110

5

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

10

<220>

<223> Варіабельний домен легкого ланцюга

<400> 32

15

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Tyr Gly Asp Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Gln Ala Gln Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys
100 105 110

<210> 33

<211> 112
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

5 <220>
<223> Варіабельний домен легкого ланцюга

<400> 33

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 3 10 19

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Gln Ala Gln Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys
100 105 110

<210> 34
<211> 327
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Константний домен важкого ланцюга-IgC4m-3228P

<400> 34

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gln Ser Thr Ala Ala Ser 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

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 Lys Thr
    65              70              75

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    85              90              95
Arg Val Gln Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
   100              105              110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Phe Lys Pro Lys
   115              120              125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Phe Glu Val Thr Cys Val Val Val
   130              135              140

Asp Val Ser Gln Gln Asp Pro Gln Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
   145              150              155
Gly Val Gln Val Gln Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Gln Gln Gln Phe
   160              165              170              175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
   180              185              190

Trp Leu Asn Gly Lys Gln Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
   195              200              205

Pro Ser Ser Ile Gln Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
   210              215              220
Gln Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Gln Gln Met Thr Lys
   225              230              235              240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
   245              250              255

Ile Ala Val Gln Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Gln Asn Asn Tyr Lys
   260              265              270

```

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Glu Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

5 <210> 35
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Константний домен легкого ланцюга-CL-каппа

<400> 35

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe His Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Gln Ala Lys Val Glu Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Glu Asp Ser Lys Asp Ser
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
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

15 <210> 36
<211> 447
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

20 <220>
<223> Послідовність важкого ланцюга 18D5

<400> 36

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Gln Leu Val Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

Trp Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro His Gln Gly Leu Gln Trp His
35 40 45

Gly Asn His Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Gln Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Gly Gly Thr Gly Thr Met Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Gln Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Gln Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Gln Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gln Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Gln
260 265 270

Val Gln Phe Asp Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Glu Pro Arg Glu Pro Glu Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Gln Gln Ser Thr Lys Asn Glu Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp His Ala Val Glu Trp Glu Ser Asp
370 375 380

Gly Glu Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met Glu Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Glu Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

5 <210> 37
<211> 447
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Послідовність важкого ланцюга НА

<400> 37

15 Gly Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Gln Val Lys Lys Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Val His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Thr
35 40 45

Gly Asn His Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp His Val Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Gly Gly Thr Gly Thr Met Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Gly Ser Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Gln Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Gln Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gln Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Gln Asp Pro Gln
260 265 270

```

Val Glu Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Phe Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Glu Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Glu Pro Arg Glu Pro Glu Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Glu Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Glu Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Glu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Trp Glu Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

```

5 <210> 38
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

10 <220>
 <223> Послідовність важкого ланцюга HB

<400> 38

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

```

15

Trp Val His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp His Val Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Gly Gly Thr Gly Thr Met Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Phe Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gln Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

```

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Glu Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
280                295                305

Val Leu Thr Val Leu His Glu Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305                315                318                320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325                330                335

Ser Lys Ala Lys Gly Glu Pro Arg Glu Phe Glu Val Tyr Thr Leu Pro
340                345                350

Pro Ser Glu Glu Glu Met Thr Lys Asn Glu Val Ser Leu Thr Cys Leu
355                360                365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Val Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370                375                380

Gly Glu Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385                390                395                400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405                410                415

Trp Glu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420                425                430

His Asn His Tyr Thr Glu Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435                440                445

```

5 <210> 39
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

10 <220>
 <223> Послідовність важкого ланцюга HC

<400> 39

```

Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1          5          10          15

Ser Leu Arg His Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20          25          30

Trp Val Glu Trp Val Arg Glu Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35          40          45

```

15

Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr His Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly His Val Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Gly Gly Thr Gly Thr Met Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Gln Ser Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Gln Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 160 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Gln Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gln Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Gln Asp Pro Gln
 260 265 270
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Gln Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Gln Gln Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Glu Glu Glu Met Thr Lys Asn Glu Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Glu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Glu Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

5 <210> 40
<211> 447
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Послідовність важкого ланцюга HE

<400> 40

Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg His Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Val His Trp Val Arg Glu Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asn His Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr His Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Glu Gly His Val Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Leu Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Gly Gly Thr Gly Thr Leu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Glu
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Gly Asp Pro Gly
260 265 270

Val Glu Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Glu Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Gln Gln Met Thr Lys Asn Glu Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Glu Pro Gln Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

5 <210> 41
<211> 447
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Послідовність важкого ланцюга HF

<400> 41

Glu Val Gly Leu Val Gln Ser Gly His Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys His Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Val His Trp Val Arg Glu Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr His Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly His Val Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

15

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Asp Gly Gly Thr Gly Thr Met Ala Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Glu Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Glu Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Gln Gln Met Thr Lys Asp Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Gln Trp Glu Ser Asp
370 375 380

Gly Gln Pro Gln Asp Asp Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asp Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Gln Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

5 <210> 42
<211> 447
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Послідовність важкого ланцюга HEF

<400> 42

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Gln Val Lys Lys Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys His Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Val His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Met
35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr His Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Glu Gly His Val Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

15

Val Arg Gly Gly Thr Gly Thr Leu Ala Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Gly Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Glu Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Glu Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Glu Pro Arg Glu Pro Glu Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Gln Gln Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Gln Trp Gln Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Gln Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

5 <210> 43
<211> 219
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Послідовність легкого ланцюга 18D5

<400> 43

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

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

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys
100 105 110

15

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Thr Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Gln Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

5 <210> 44
<211> 219
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Послідовність легкого ланцюга LA

<400> 44

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

Gln Phe Ala Ser His Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Thr Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Gln Ala Gln Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly
85 90 95

15

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Glu Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Gln Ser Val Thr Glu Glu Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

5 <210> 45
<211> 219
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Послідовність легкого ланцюга LB

<400> 45

Asp Val Val Met Thr Glu Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Glu Ser
35 40 45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

15 Ser Arg Val Gln Ala Gln Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Glu
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Glu Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

5 <210> 46
<211> 360
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен важкого ланцюга
18D5

<400> 46
caggctgagc tctagcagcc aggaactgag ctgctgagggc ctgggcgccag cgtggaagcgc 60
tcctgcgaagg ctgcagggctc cactcttaca agctatttggg tgcactgggtt gaagcagcgg 120
ccaatccagg gctctggagtc gactctgcaac atcgaccccca ggcactctga taccacattac 180
aatcaggaagc ttaaggacaa ggcctctcgc accctggaga agtcttccag caacgcttat 240
ctgcagcctgt ctctccctgac attcagggat tctgctgtgt actatctgtt gaggggagga 300
accggatcaa tgccttgatt tgccttactg ggcagggga cctctgtgac agtgtctgt 360

15 <210> 47
<211> 360
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

20 <220>
<223> Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен важкого ланцюга
HA

25 <400> 47

```

gaggtgcagc ttgtgcagag cggagctgag gtgaagaagc caggcgagtc tctgaggatc 60
tcttgcaagg ctacgggcta cacccttcac accctctggg tgcactgggt gcggcagatg 120
ccaggcgaag gcttggagtg gatgggtgac atcgaccctc gccactctga taccgactac 180
aatcaggagc ttaaggacca tgtgacccctg tctgtgggta agtccatcag cacagccatc 240
ctggaagctgt ccagccctga ggcctctgat cagacttatgt actatttggt ggggggagga 300
accggaccac tggcttgggt cgccttactg ggcgggggga cccctggtag agtgccttcc 360

```

5 <210> 48
 <211> 360
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

10 <220>
 <223> Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен важкого ланцюга
 HB

```

<400> 48
gaggtgcagc ttgtgcagtc cggagctgag gtgaagaagc caggcgagtc tctgaggatc 60
tcttgcaagg ctctctggta ccccttcacc agctattggg tgcactgggt gcggcagatg 120
ccaggcgaag gcttggagtg gatgggtgac atcgaccctc gccactctga taccgactac 180
aatcaggagc ttaaggacca tgtgacccctg agtctgggta agtccatcag cacagccatc 240
ctggaagctgt ccagccctga ggcctctgat cagacttatgt actatttggt ggggggagga 300
accggaccac tggcttgggt cgccttactg ggcgggggga cccctggtag agtgccttcc 360

```

15 <210> 49
 <211> 360
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

20 <220>
 <223> Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен важкого ланцюга
 HC

```

<400> 49
gaggtgcagc ttgtgcagtc tggcgccgag gtgaagaagc caggcgagag cctgaggatc 60
tcttgcaagg ctacgggcta cctcttcacc accctctggg tgcactgggt gcggcagatg 120
ccaggcgaag gcttggagtg gatgggtgac atcgaccctc gccactctga taccgactac 180
tacccttagc ttaaggacca tgtgacccctg tctgtgggta agtcttatct cacagccatc 240
ctggaagctgt ccagccctga ggcctctgat cagacttatgt actatttggt ggggggagga 300
accggaccac tggcttgggt cgccttactg ggcgggggga cccctggtag agtgccttcc 360

```

25 <210> 50
 <211> 360
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен важкого ланцюга HE

<400> 50

```
gaggtgcagc tgggtgcagtc tgggcgcagc gtaagcagc caggcgcagc cctgaggatc 60
tcctgcagag ctgagcggcta ctctttcacc tcttatggg tgcactgggt gcggcagatg 120
ccaggcagag gctctgagtg gatgggcagc atcgacccca ggcactctga tacacactac 180
tccctagctt ttcagggcca tgtgaccccg tccgtggaca agtctatctc caccagcctat 240
ctgcagctgt ccagcctgaa ggcacgcgat accgctatgt actatgggt gagggcagga 300
acgggcagac tgggttactt cgtttatgg ggcagggcca ccttggtgac agtgtcttcc 360
```

5

<210> 51

<211> 360

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

10

<220>

<223> Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен важкого ланцюга HF

HF

15

<400> 51

```
gaggtgcagc tgggtgcagtc tgggcgcagc gtaagcagc caggcgcagc cctgaggatc 60
tcctgcagag ctgagcggcta ctctttcacc tcttatggg tgcactgggt gcggcagatg 120
ccaggcagag gctctgagtg gatgggcagc atcgacccca ggcactctga tacacactac 180
tccctagctt ttcagggcca tgtgaccccg tccgtggaca agtctatctc caccagcctat 240
ctgcagctgt ccagcctgaa ggcacgcgat accgctatgt actatgggt gagggcagga 300
acgggcagac tgggttactt cgtttatgg ggcagggcca ccttggtgac agtgtcttcc 360
```

<210> 52

<211> 360

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

20

<220>

<223> Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен важкого ланцюга HEF

HEF

25

<400> 52

```
gaggtgcagc tgggtgcagtc tgggcgcagc gtaagcagc caggcgcagc cctgaggatc 60
tcctgcagag ctgagcggcta ctctttcacc tcttatggg tgcactgggt gcggcagatg 120
ccaggcagag gctctgagtg gatgggcagc atcgacccca ggcactctga tacacactac 180
tccctagctt ttcagggcca tgtgaccccg tccgtggaca agtctatctc caccagcctat 240
ctgcagctgt ccagcctgaa ggcacgcgat accgctatgt actatgggt gagggcagga 300
acgggcagac tgggttactt cgtttatgg ggcagggcca ccttggtgac agtgtcttcc 360
```

30

<210> 53

<211> 336

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен легкого ланцюга

5 18D5

<400> 53

```
gacgttggtca tgaacacagac cccactgagc ctgcctctgt ccttggggaga tcaggacctct 60
atctccctgca ggtccacgcca gtcccttggtg cacagctatg gcaaacacata cctgtacttgg 120
tacctggagaa gggccaggcca gtcccccag ctgcctgact acagggctgc taatcgggttc 180
tcggggcgtgc ctgacagggtt ctccggctct ggtcccgga ccgatttcac actgaagatc 240
agcaggggtgg aggtctaggga cctggggcgtg tacttctggt ttccagggaac ccattgtgcca 300
tacacacttg gttcttggaac caagctggag atcaag 336
```

10

<210> 54

<211> 336

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

15

<220>

<223> Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен легкого ланцюга LA

<400> 54

```
gacgttggtca tgaacacagac cccactgtct ctgcctctgt ccttggggaga tcaggacctct 60
atctccctgca ggtccacgcca gtcccttggtg cacagctatg gcaaacacata cctgtacttgg 120
tacctggagaa gggccaggcca gtcccccag ctgcctgact acagggctgc taatcgggttc 180
tcggggcgtgc ctgacagggtt ctccggctct ggtcccgga ccgatttcac actgaagatc 240
tcctagagtg aggtctaggga ctggggcgtg tacttctggt ttccagggaac ccattgtgcca 300
tacacacttg gttcttggaac caagctggag atcaag 336
```

20

<210> 55

<211> 336

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

25

<220>

<223> Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіабельний домен легкого ланцюга LB

<400> 55

```
gacgttggtca tgaacacagac cccactgtct ctgcctctgt ccttggggaga tcaggacctct 60
atctccctgca ggtccacgcca gtcccttggtg cacagctatg gcaaacacata cctgtacttgg 120
tcctagagtg aggtctaggga ctggggcgtg tacttattgt ttccagggaac ccattgtgcca 300
tacacacttg gttcttggaac caagctggag atcaag 336
```

30

<210> 56

<211> 456
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5 <400> 56

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Gln Leu Val Arg Pro Gly Ser
 1 5 10 15

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

Trp Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Ile Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45

Gly Asp Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Arg Gly Gly Thr Gly Thr Met Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
 115 120 125
 Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Gln Ser Val Thr Val Thr
 145 150 155 160

Trp Asp Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu
 165 170 175
 Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala
 195 200 205

Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Gln His Ser Gly Pro Ile Ser
 210 215 220

Thr Ile Asp Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala
 225 230 235 240

10

```

Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile
      245                      250                      255

Lys Asp Val Leu Met His Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val
      260                      265                      270

Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Glu Ile Ser Trp Phe Val
      275                      280                      285

Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Glu Thr Glu Thr His Arg Glu Asp
      290                      295                      300
Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Glu His Glu
      305                      310                      315                      320

Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
      325                      330                      335

Leu Pro Ser Pro Ile Glu Ala Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val
      340                      345                      350

Arg Ala Pro Glu Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Leu Ser
      355                      360                      365
Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly
      370                      375                      380

Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asp Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr
      385                      390                      395                      400

Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr
      405                      410                      415

Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe
      420                      425                      430
Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys
      435                      440                      445

Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
      450                      455

```

5

<210> 57

<211> 219

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<400> 57

```

Asp Val Val Met Thr Glu Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1      5      10      15

Asp His Ala Ser His Ser Tyr Arg Ser Ser Glu Ser Leu Val His Ser
20      25      30

Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Glu Lys Pro Gly Glu Ser
35      40      45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50      55      60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65      70      75      80

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

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Ser Glu His Lys
100     105     110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115     120     125
Glu Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
130     135     140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
145     150     155     160

Glu Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Glu Asp Ser Lys Asp Ser
165     170     175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
180     185     190
Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
195     200     205

Pro His Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210     215

```

5

<210> 58
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

10

<220>
 <223> Послідовність, яка кодує HCDR1

<400> 58

15

15

<210> 59
 <211> 15
 <212> ДНК

	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Послідовність, яка кодує HCDR1	
5	<400> 59 tcctatctgggg tgcgac	15
10	<210> 60 <211> 15 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
15	<220> <223> Послідовність, яка кодує HCDR1	
	<400> 60 tcctatctgggg tgcgac	15
20	<210> 61 <211> 51 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
25	<220> <223> Послідовність, яка кодує HCDR2	
30	<400> 61 aacctcgcac ccacgcgcactc tgcaccccat tcccatcaga agtttaaggc c	51
35	<210> 62 <211> 51 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
40	<220> <223> Послідовність, яка кодує HCDR2	
	<400> 62 agcctcgcac ccacgcgcactc tgcaccccat tcccatcaga agtttaaggc c	51
45	<210> 63 <211> 33 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
	<220> <223> Послідовність, яка кодує HCDR3	
50	<400> 63 ggagggagcgg gaccacatggc ttggtttgcg tac	33
55	<210> 64 <211> 33 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
60	<220> <223> Послідовність, яка кодує HCDR3	

	<400> 64 gggggaaacg gaaacactggc ttgggttcgct tac	33
5	<210> 65 <211> 33 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
10	<220> <223> Послідовність, яка кодує HCDR3	
	<400> 65 gggggaaacg gaaacactggc ttacttcgct tac	33
15	<210> 66 <211> 33 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
20	<220> <223> Послідовність, яка кодує HCDR3	
	<400> 66 gggggaaacg gaaacactggc ttacttcgct tac	33
25	<210> 67 <211> 48 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
30	<220> <223> Послідовність, яка кодує LCDR1	
35	<400> 67 gggttcacgc agtccctggc gaaacactat ggcacaccaa acctgtat	48
40	<210> 68 <211> 21 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
	<220> <223> Послідовність, яка кодує LCDR2	
45	<400> 68 gggttcacgc atcgtttctc c	21
50	<210> 69 <211> 27 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
55	<220> <223> Послідовність, яка кодує LCDR3	
	<400> 69 ttccagggtc cccatgtgac ataccac	27
60	<210> 70 <211> 13	

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

5

Gln Leu Ile Tyr Asp Gln Lys Gln Gly His Phe Pro Arg
1 5 10

<210> 71
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 71

Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn
1 5 10

15

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 72

Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp
1 5

25

<210> 73
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 73

Tyr Asp Gln Lys
1

35

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Антитіло до SIRPa людини або його антигензв'язуючий фрагмент, який містить:

- a) варіабельний домен важкого ланцюга, що містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3, і
b) варіабельний домен легкого ланцюга, що містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3, причому:

- 40 (i) - HCDR1 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 14,
- HCDR2 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 15,
45 - HCDR3 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 17,
або
(ii) - HCDR1 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 14,
- HCDR2 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 16,
50 - HCDR3 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 17,
або
(iii) - HCDR1 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 14,
55 - HCDR2 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 16,

- HCDR3 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 18,
або
- (iv) - HCDR1 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 14,
- HCDR2 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 16,
- HCDR3 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 19,
або
- (v) - HCDR1 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 14,
- HCDR2 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 16,
- HCDR3 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 20,
і
- LCDR1 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 21,
- LCDR2 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 22, і
- LCDR3 містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 23,
антитіло до SIRPa людини або його антигензв'язуючий фрагмент є антагоністичним антитілом до SIRPa, яке інгібує зв'язування CD47 людини з SIRPa людини.
- 2. Антитіло до SIRPa людини або його антигензв'язуючий фрагмент, який містить:
 - а) варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 і SEQ ID NO: 30, і
 - б) варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 33,
або
 - а') варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 24, і
 - б') варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 31,
зокрема, який містить:
 - варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, і більше конкретно SEQ ID NO: 30; і
 - варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 33.
- 3. Антитіло до SIRPa людини або його антигензв'язуючий фрагмент за п. 1 або 2, який містить:
 - варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 24, і
 - варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 31,
або
 - варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 25, і
 - варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 33,
або
 - варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 26, і
 - варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 33,
або
 - варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 27, і

- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 33, або
- 5 - варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 28, і
- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 33, або
- 10 - варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 29, і
- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 33, або
- 15 - варіабельний домен важкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 30, і
- варіабельний домен легкого ланцюга, що містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої у SEQ ID NO: 33.
- 4. Антитіло до SIRPa людини або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким із пп. 1-3, який не зв'язується специфічно з SIRP_g людини.
- 20 5. Антитіло до SIRPa людини або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким із пп. 1-4, який не зв'язується специфічно з Т-клітинами людини, зокрема, CD3⁺ Т- клітинами.
- 6. Антитіло до SIRPa людини або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким із пп. 1-5, який не інгібує проліферацію Т-клітин людини.
- 7. Антитіло до SIRPa людини або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким із пп. 1-6, який
- 25 не інгібує зв'язування CD47 людини з SIRP_g людини.
- 8. Антитіло до SIRPa людини або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що зазначене антитіло являє собою гуманізоване моноклональне антитіло, зокрема, в якому константний домен легкого ланцюга антитіла походить з константного домену легкого каппа-ланцюга людини, більше конкретно, в якому константний домен легкого ланцюга
- 30 складається з послідовності, представленої у SEQ ID NO: 35, і в якому константний домен важкого ланцюга антитіла походить з константного домену важкого ланцюга IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 людини, зокрема, з константного домену важкого ланцюга IgG4 людини, більше конкретно, в якому константний домен важкого ланцюга антитіла складається з послідовності, представленої у SEQ ID NO: 34.
- 35 9. Антитіло до SIRPa людини або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким із пп. 1-8, для застосування як лікарський засіб.
- 10. Антитіло до SIRPa людини або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким із пп. 1-8, для застосування в запобіганні або лікуванні захворювання, вибраного з групи, яка складається з
- 40 раку (зокрема запального раку та раку з інфільтрованими мієлоїдними клітинами, зокрема з інфільтрованими MDSC і/або TAM клітинами), інфекційного захворювання, хронічного запального захворювання, аутоімунного захворювання, неврологічного захворювання, ушкодження головного мозку, ушкодження нервів, поліцитемії, гемохроматозу, травми, септичного шоку, хронічного інфекційного захворювання (зокрема захворювання, викликаного *Pseudomonas* і CMV), фіброзу, атеросклерозу, ожиріння, цукрового діабету II типу та дисфункції
- 45 трансплантата, або для застосування при вакцинації.
- 11. Антитіло до SIRPa людини або його антигензв'язуючий фрагмент, визначений у будь-якому з пп. 1-10, для застосування за п. 10, який **відрізняється** тим, що зазначене антитіло до SIRPa людини або його антигензв'язуючий фрагмент вводять пацієнту, що має симптоми SIRPa-позитивної пухлини.
- 50 12. Фармацевтична композиція, яка містить щонайменше одне антитіло до SIRPa людини або його антигензв'язуючий фрагмент, визначений у будь-якому з пп. 1-10, і фармацевтично прийнятний носій.
- 13. Комбінований продукт, який містить:
 - щонайменше одне антитіло до SIRPa людини або його антигензв'язуючий фрагмент,
 - 55 визначений у будь-якому з пп. 1-10, і
 - щонайменше один другий терапевтичний агент, вибраний з групи, яка складається з хіміотерапевтичних агентів, радіотерапевтичних агентів, імунотерапевтичних агентів, агентів для клітинної терапії, антибіотиків і пробіотиків; зокрема імунотерапевтичних агентів, вибраних з групи, яка складається з блокатора або активатора контрольних точок адаптивних імунних
 - 60 клітин, особливо вибраного з групи, яка складається з агоністів, спрямованих проти PDL1, PD1,

CTLA4, CD137, CD2, CD28, CD40, HVEM, BTLA, CD160, TIGIT, TIM-1/3, LAG-3, 2B4, OX40 і CD40, CD40-L, агоністів TLR, агоністів, спрямованих проти ICOS, ICOS-L й агоністів, спрямованих проти рецепторів В-клітин,

для одночасного, роздільного або послідовного застосування як лікарський засіб.

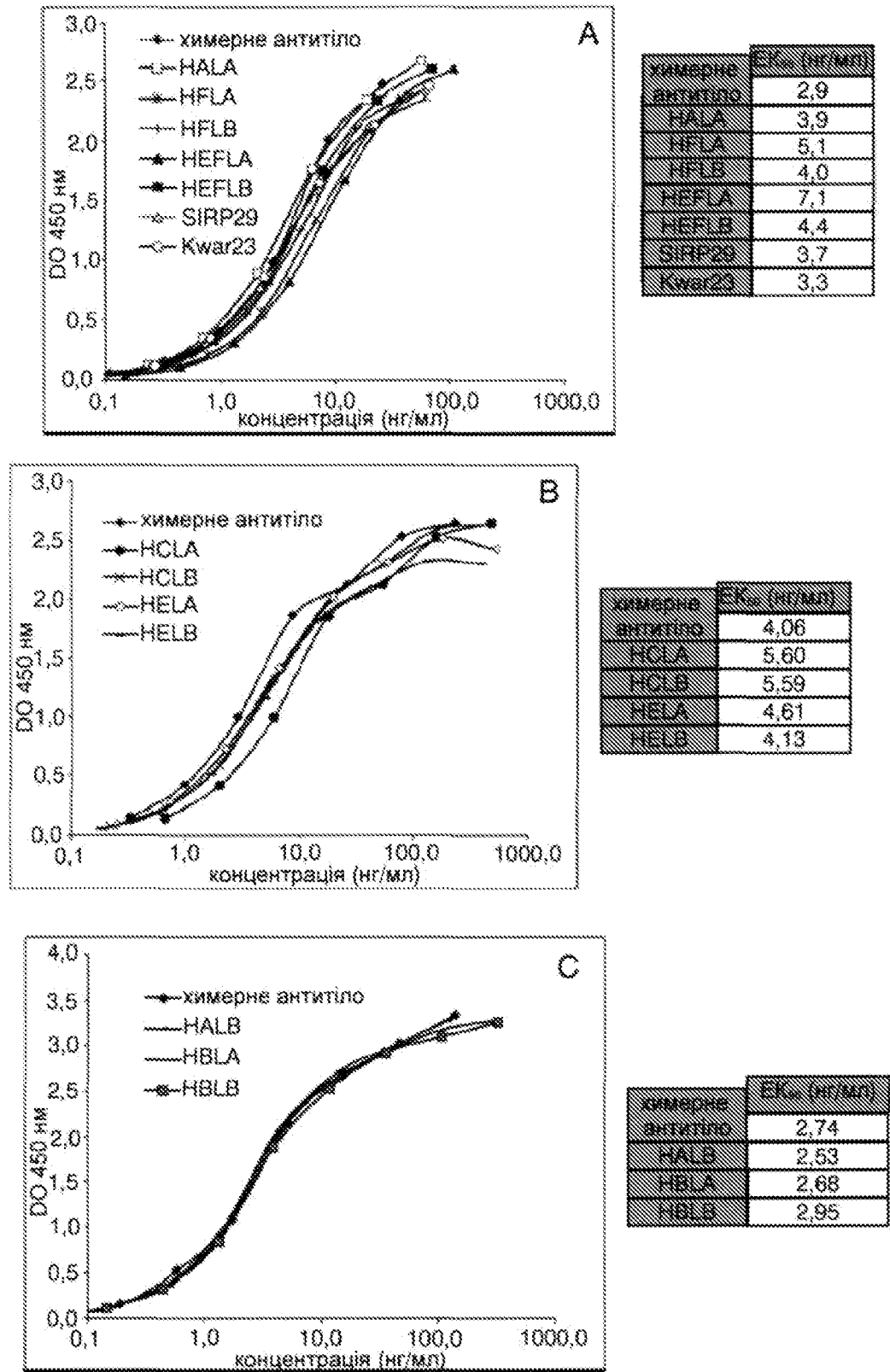
5 14. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує антитіло до SIRPa людини або його антигензв'язуючий фрагмент, для забезпечення антитіла до SIRPa людини або його антигензв'язуючого фрагмента за будь-яким із пп. 1-10.

15. Вектор, який містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. 14.

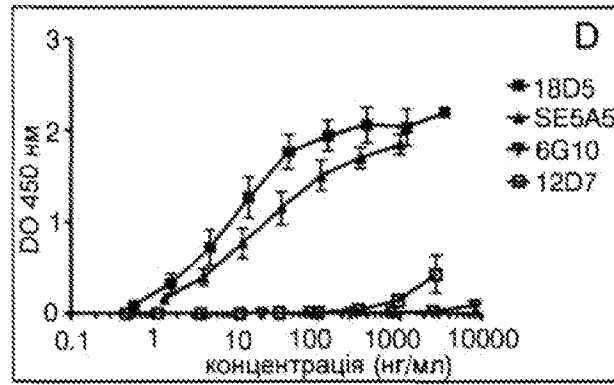
10 16. Виділена клітина-хазяїн, яка містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. 14 і/або вектор за п. 15.

17. Спосіб отримання антитіла, визначеного у будь-якому з пп. 1-10, який включає імунізацію тварини, що не належить до людини, зокрема ссавця, що не належить до людини, проти щонайменше одного антигена, що містить або складається з послідовності епітопу SIRPa людини, що складається з SEQ ID NO: 3 і щонайменше однієї послідовності епітопу SIRPa людини, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 або SEQ ID NO: 6, більше конкретно антиген, що містить або складається з послідовностей епітопу SIRPa людини, що складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 і SEQ ID NO: 6 і/або проти щонайменше одного антигена, який містить або складається з щонайменше одного пептиду, вибраного з групи, яка складається з SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73 і пептиду амінокислотної послідовності SIR,

20 причому зазначений антиген складається з послідовності, яка містить аж до 100 амінокислот, і, зокрема, збирання отриманої сироватки в зазначеній імунізованій тварини, що не належить до людини, для отримання антитіл, спрямованих проти зазначеного антигена.



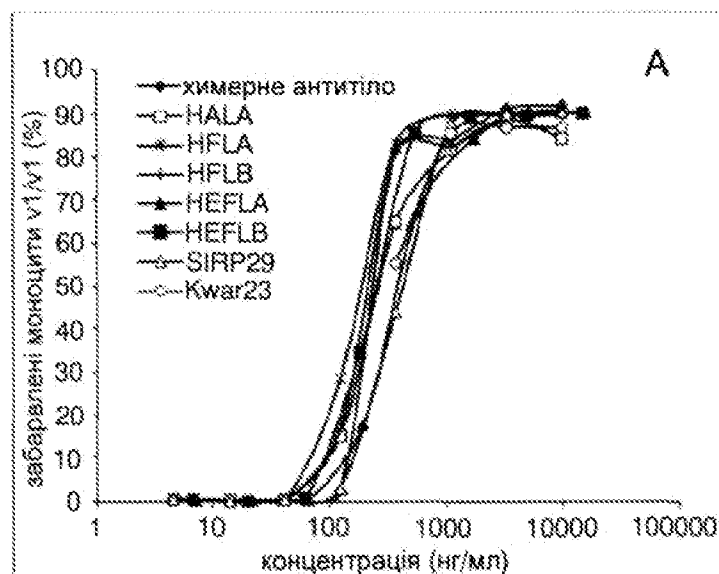
Фіг. 1
(початок)



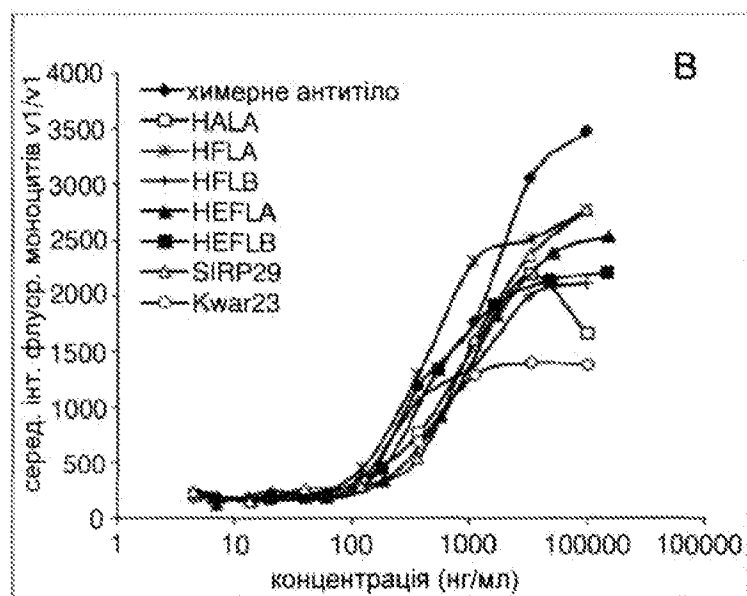
Фіг. 1
(кінець)

	Асоціація (ka) (1/Мс)	Дисоціація (kd) (1/с)	Афінність (KD) (М)
Мишаче антитіло 18D5	$6,23 \times 10^4$	$1,20 \times 10^{-5}$	$1,93 \times 10^{-10}$
Химерне антитіло	$1,49 \times 10^5$	$5,14 \times 10^{-5}$	$3,44 \times 10^{-10}$
HFLA	$8,57 \times 10^5$	$1,86 \times 10^{-4}$	$2,17 \times 10^{-10}$
HFLB	$7,91 \times 10^5$	$2,49 \times 10^{-4}$	$3,15 \times 10^{-10}$
HEFLA	$5,59 \times 10^5$	$1,48 \times 10^{-4}$	$2,64 \times 10^{-10}$
HEFLB	$6,54 \times 10^5$	$1,89 \times 10^{-4}$	$2,89 \times 10^{-10}$
SIRP29	$4,15 \times 10^4$	$1,01 \times 10^{-5}$	$2,43 \times 10^{-10}$
Kwar23	$2,44 \times 10^5$	$8,95 \times 10^{-5}$	$3,67 \times 10^{-10}$
SE7C2	$5,98 \times 10^3$	0,01	$1,67 \times 10^{-6}$
SE5A5	$2,45 \times 10^4$	$9,49 \times 10^{-4}$	$3,87 \times 10^{-6}$

Фіг. 2

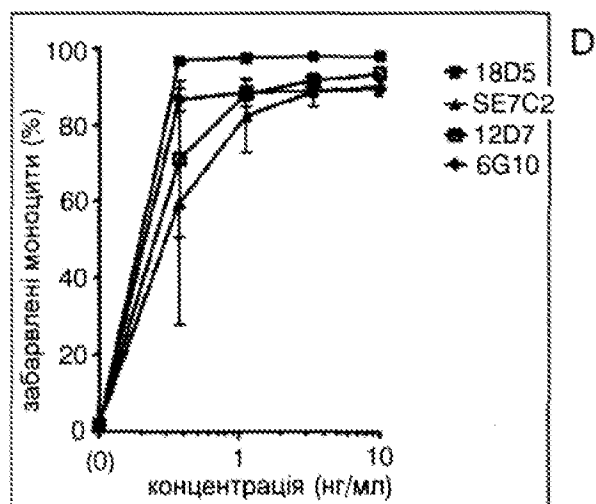
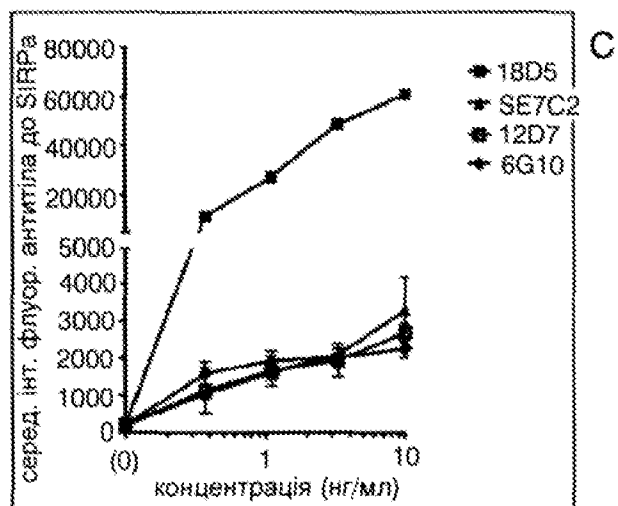


забарвлені (%)	EC ₅₀ (нг/мл)
химерне антитіло	225
HALA	242
HFLA	174
HFLB	201
HEFLA	356
HEFLB	208
SIRP29	376
Kwar23	260

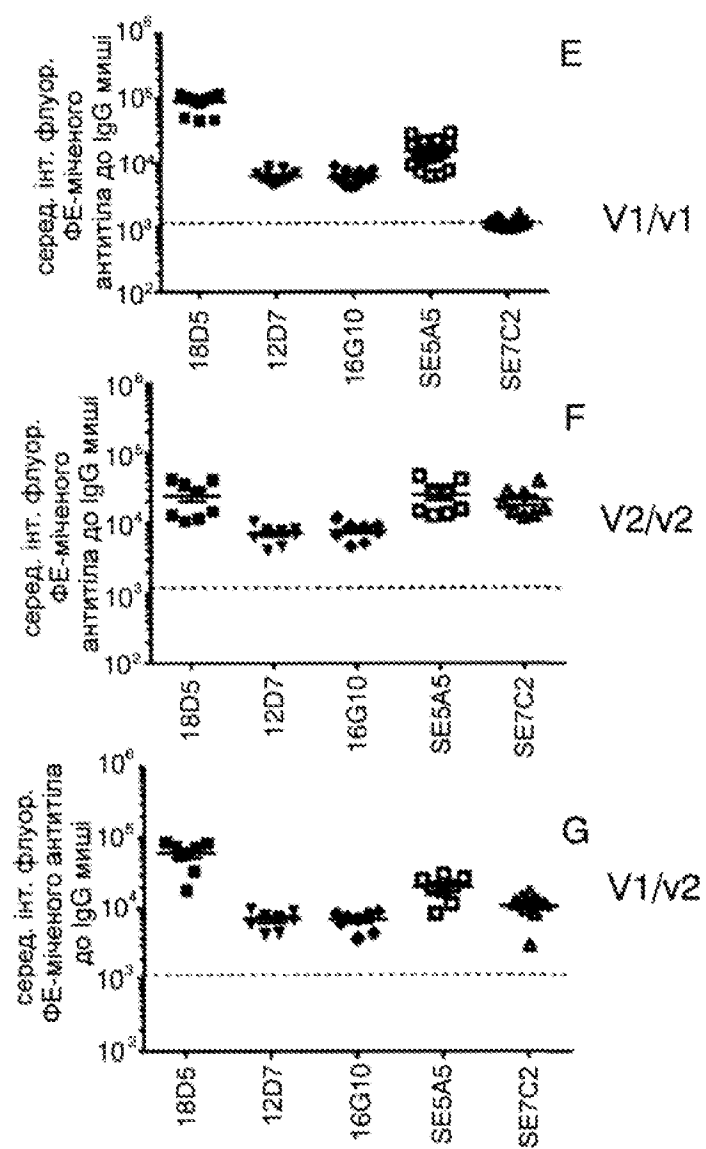


Серед. інт. флуор.	EC ₅₀ (нг/мл)
Химерне антитіло	780
HALA	590
HFLA	328
HFLB	467
HEFLA	858
HEFLB	449
SIRP29	960
Kwar23	378

Фіг. 3
(початок)



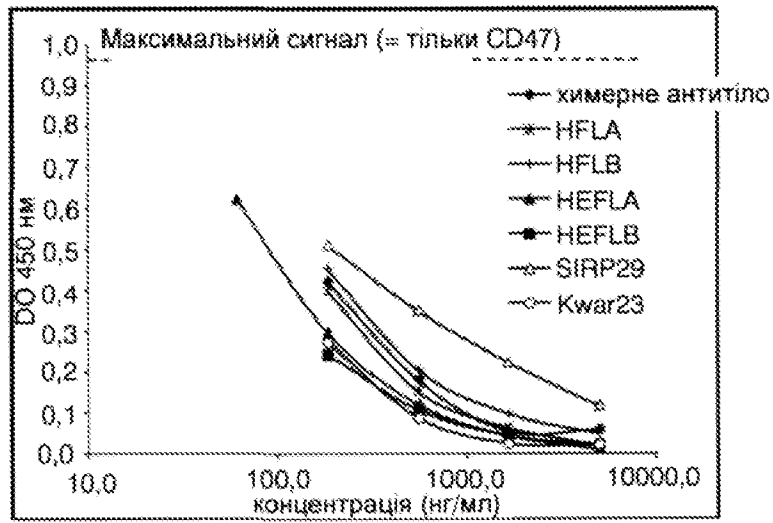
Фіг. 3
(середина)



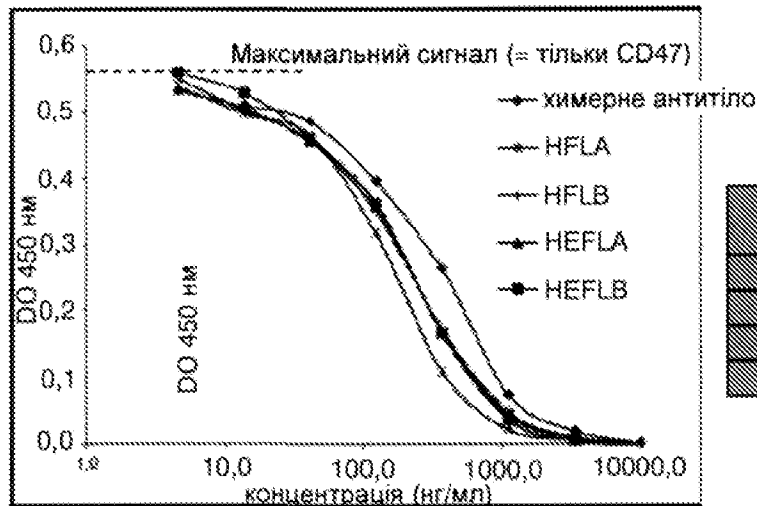
Фіг. 3
(кінець)

A

Перший експеримент



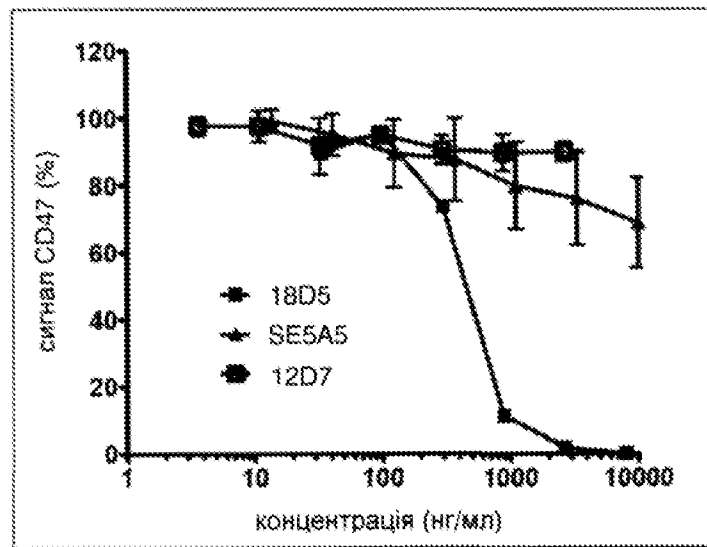
Другий експеримент



	EC ₅₀ (нг/мл)
химерне антитіло	303,8
HFLA	146,2
HFLB	182,7
HEFLA	190,6
HEFLB	186,3

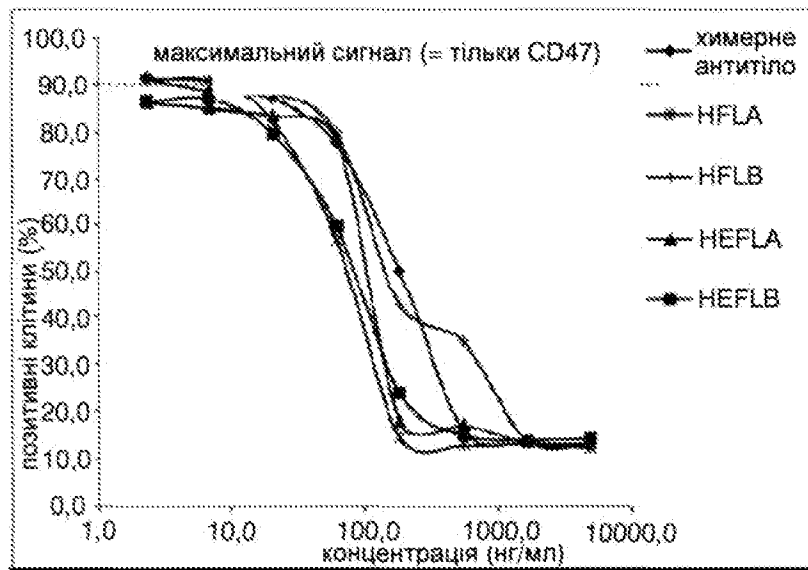
Фіг. 4
(початок)

В



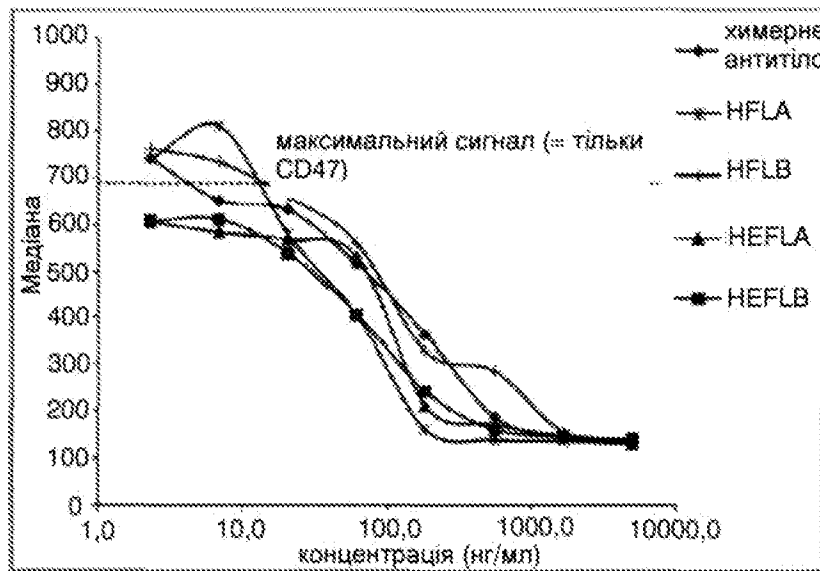
Фіг. 4
(кінець)

A



	EC ₅₀ (нг/мл)
химерне антитіло	171,83
HFLA	69,09
HFLB	149,73
HEFLA	104,56
HEFLB	73,49

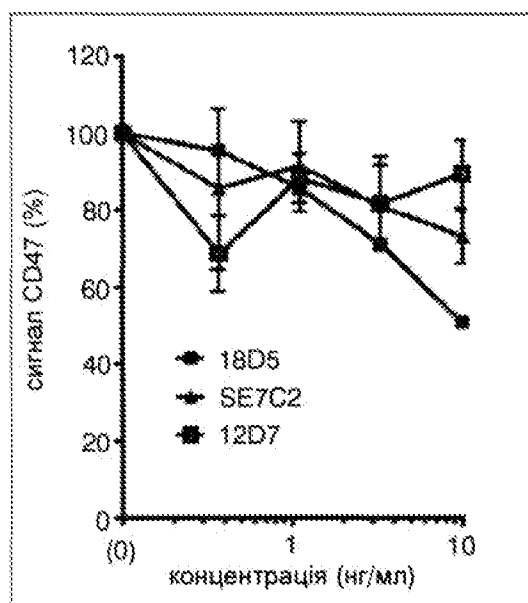
B



	EC ₅₀ (нг/мл)
химерне антитіло	199,9
HFLA	75,1
HFLB	169,9
HEFLA	117,6
HEFLB	90,1

Фіг. 5
(початок)

C



Фіг. 5
(кінець)

А	Асоціація (ka) (1/Мс)			Дисоціація (kd) (1/с)			Афінність (KD) (М)		
	Мишаче антитіло 18D5			1,58.10 ⁴			1,76.10 ⁻³		
Б	Мишаче антитіло 18D5 з SP-D			3,797.10 ⁵			1,088.10 ⁻²		
	2,865.10 ⁻⁸								

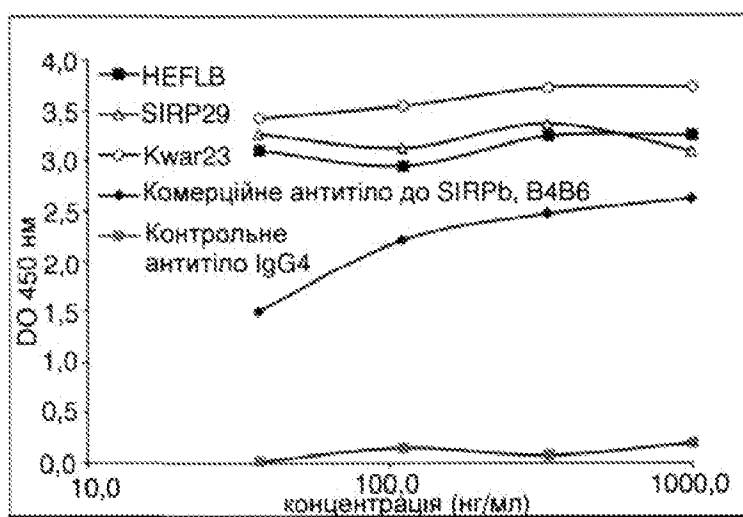
Б	Асоціація (ka) (1/Мс)			Дисоціація (kd) (1/с)			Афінність (KD) (М)		
	SP-D			2,465.10 ³			1,078.10 ⁻³		
Б	SP-D з Мишачим антитілом 18D5			3,272.10 ³			2,405.10 ⁻³		
	7,35.10 ⁻⁷								

Фіг. 6

А

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

Б

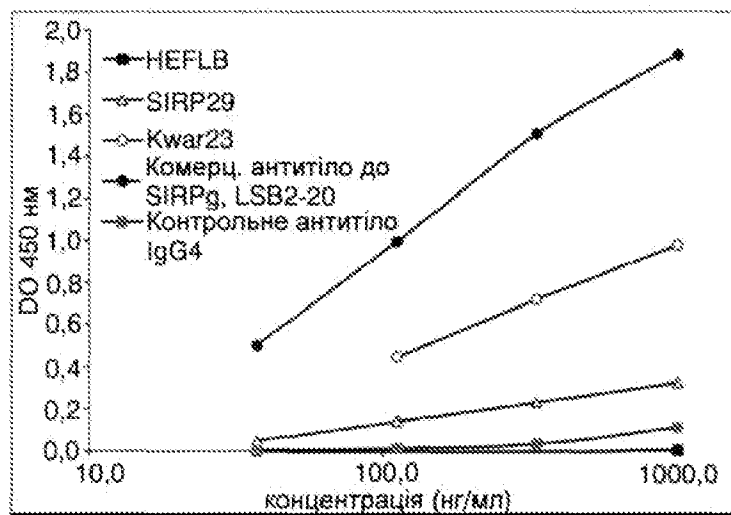


Фіг. 7

A

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

B



Фіг. 8

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

Fig. 9

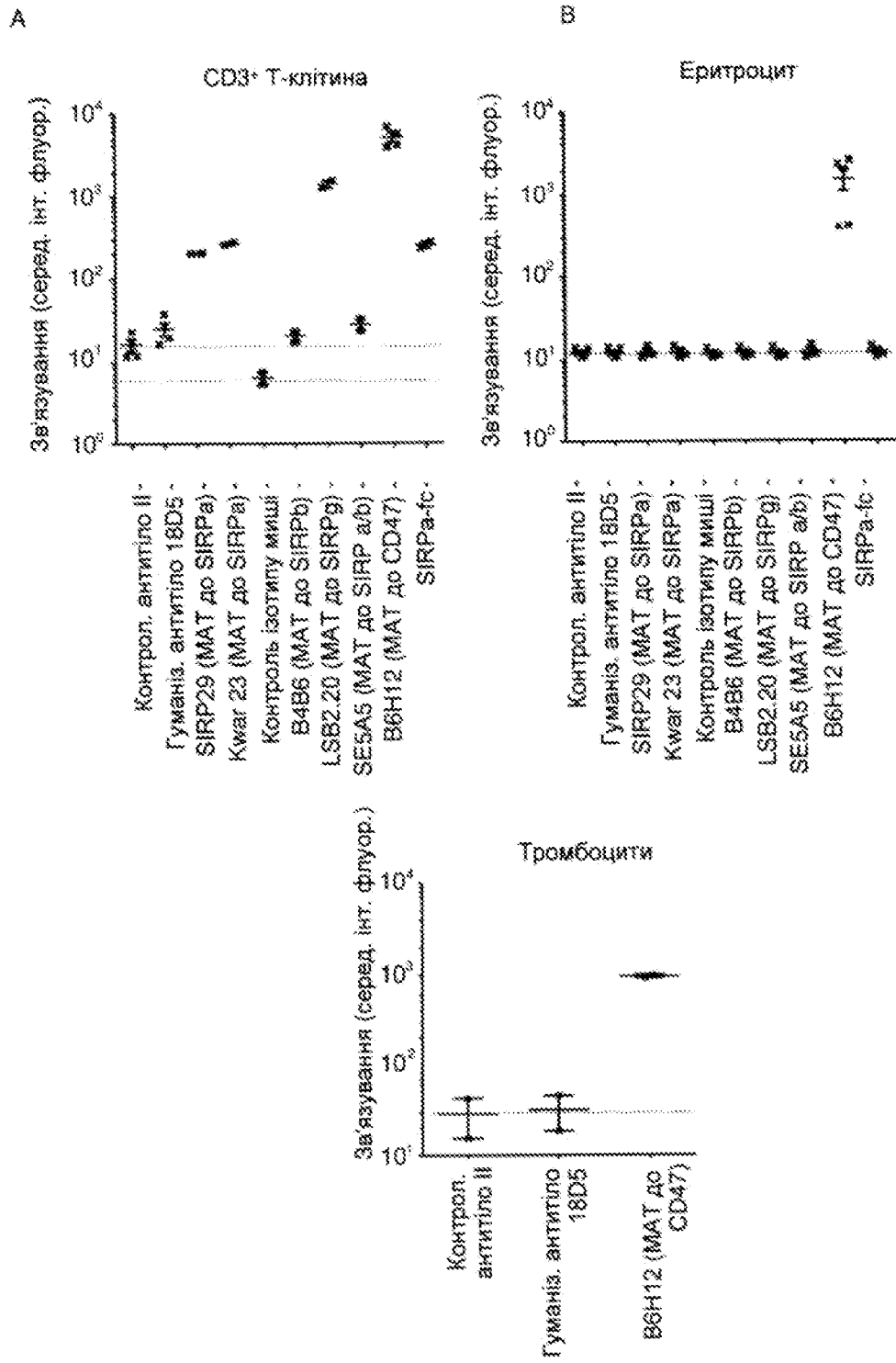
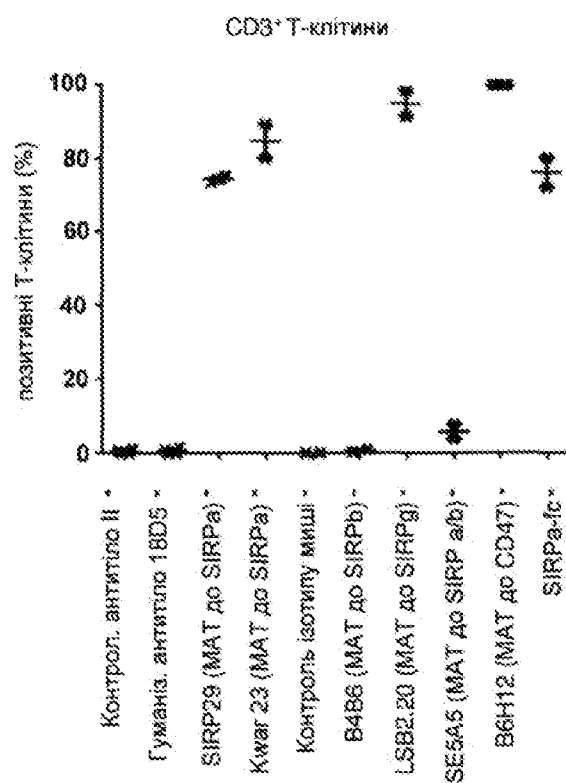
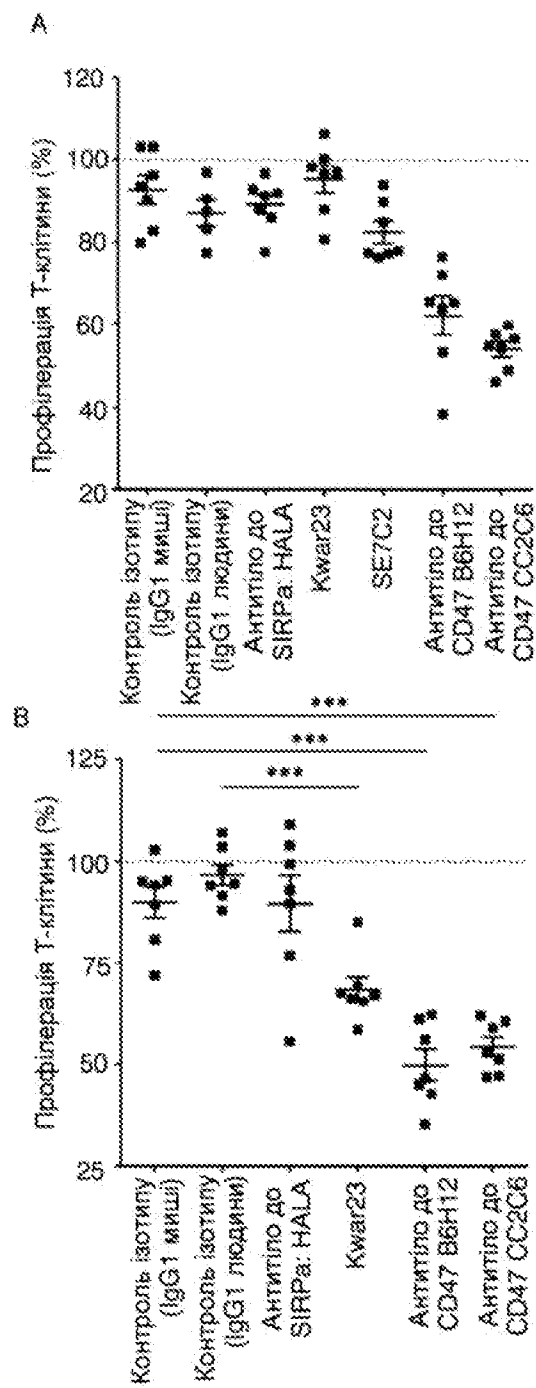


Fig. 10

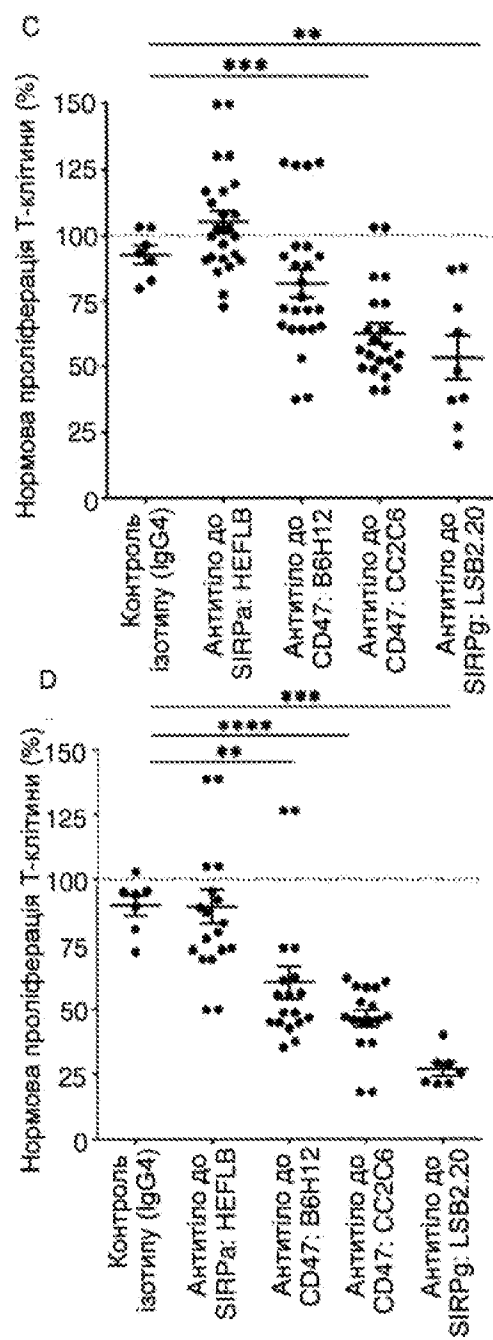


	Контрольне антитіло II	Гуманізоване антитіло 18D5	SIRP29 (MAT до SIRPa)	Kwar23 (MAT до SIRPa)	Контроль ізо типу миші	B4B6 (MAT до SIRPb)	LSB2.20 (MAT до SIRPg)	SE5A5 (MAT до SIRPa/b)	B6H12 (MAT до CD47)	SIRPa-Fc
Експ. 1 HV1	0,45	1,54	73,5	80	0	0,87	91,4	3,72	100	72,2
Експ. 1 HV2	1,12	0,84	75,2	89,3	0,016	0,25	98,4	7,69	100	81,4
Експ. 2 HV1	0,057	0,016							99,9	
Експ. 2 HV2	0,076	0,058							99,9	

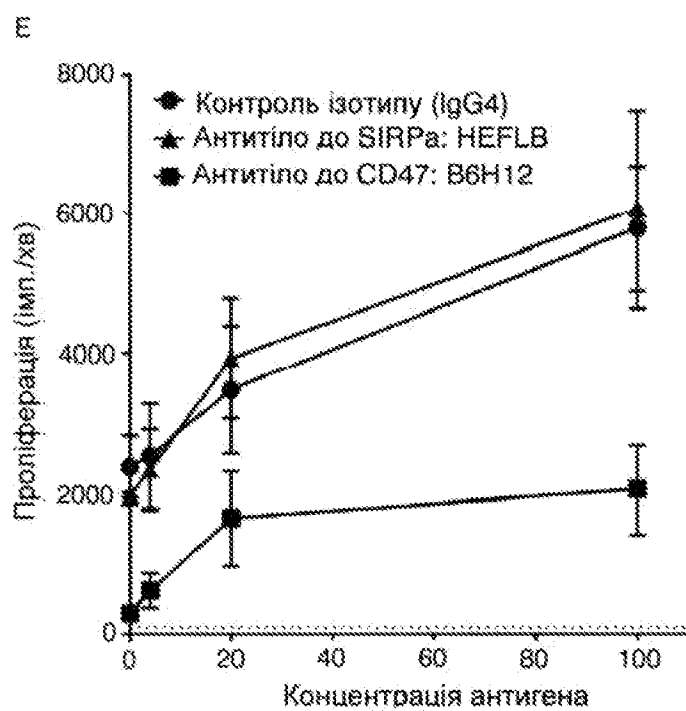
Fig. 11



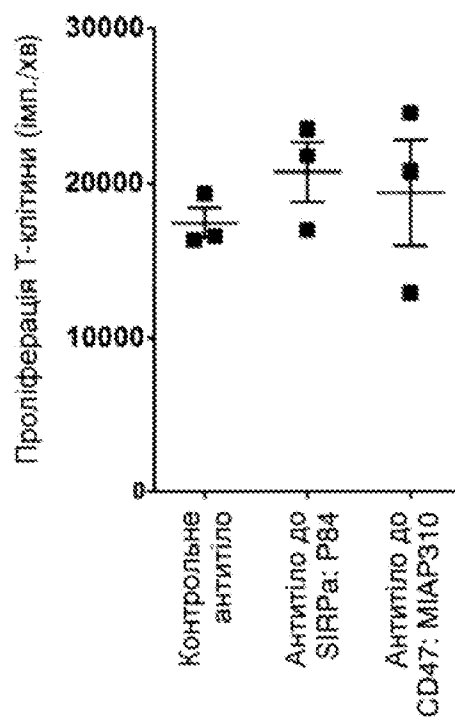
Фіг. 12
(початок)



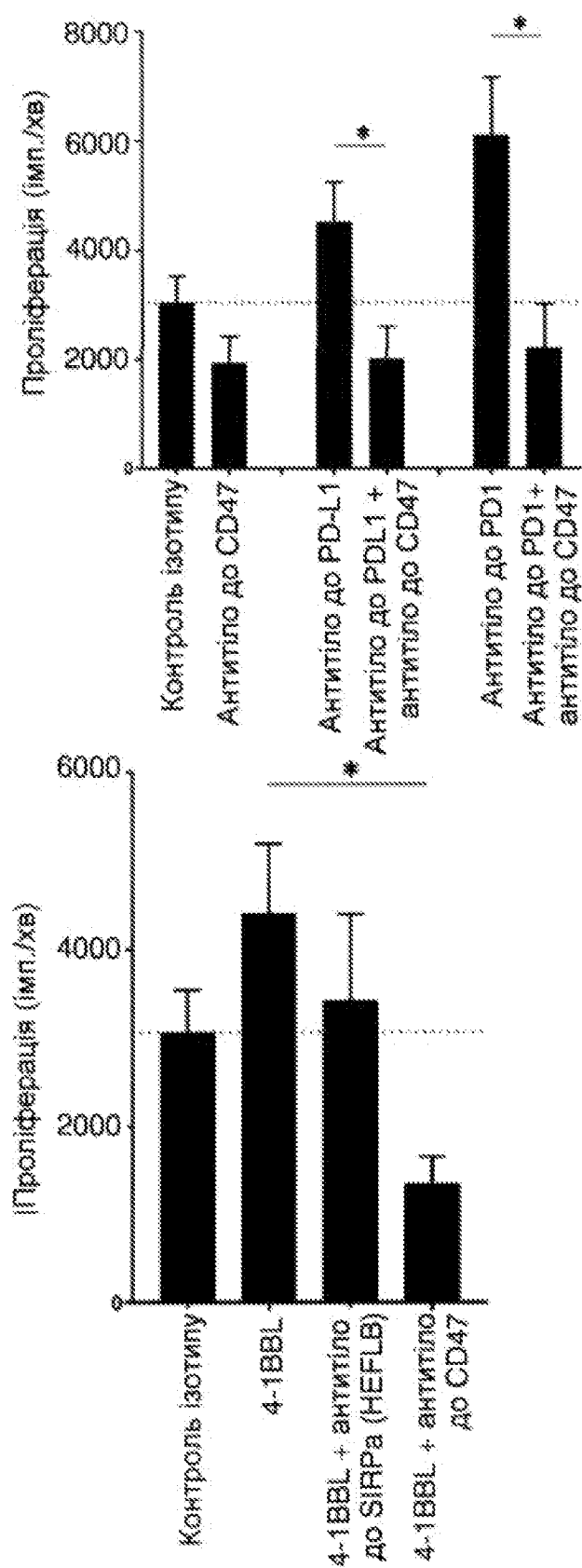
Фіг. 12
(середина)



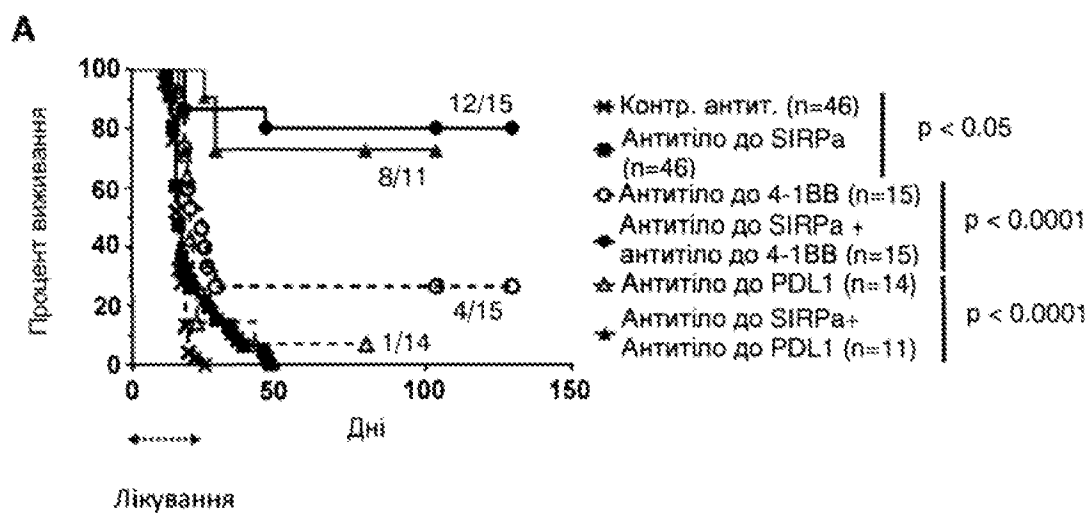
Фіг. 12
(кінець)



Фіг. 13



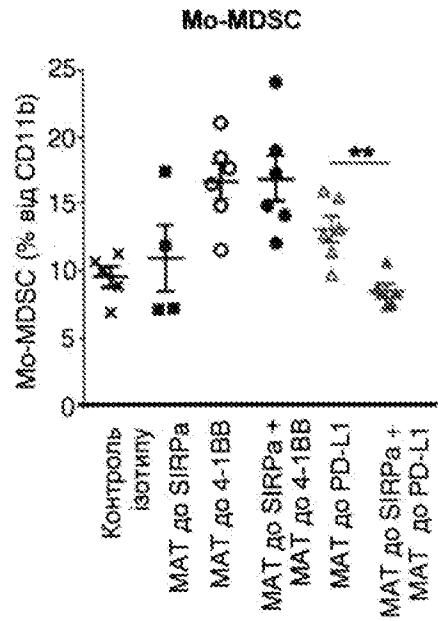
Фиг. 14



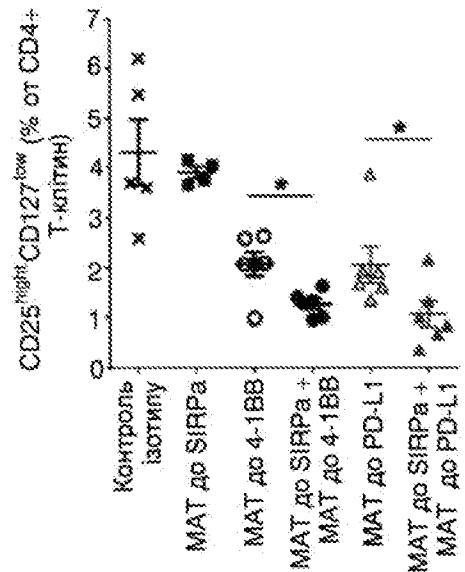
Фіг. 15
(початок)

В

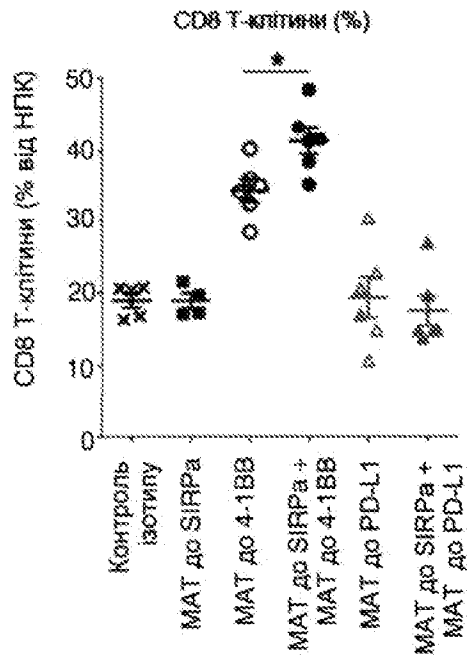
Знижена к-сть регуляторних клітин



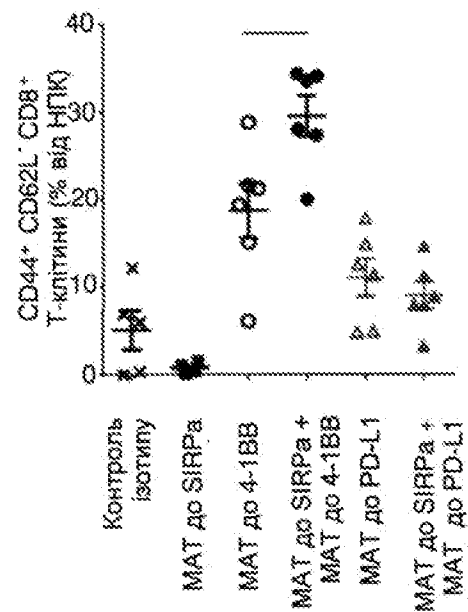
Природні регуляторні Т-клітини



Підвищена к-сть ефекторних Т-клітин



Ефекторні Т-клітини пам'яті



Фіг. 15
(середина)

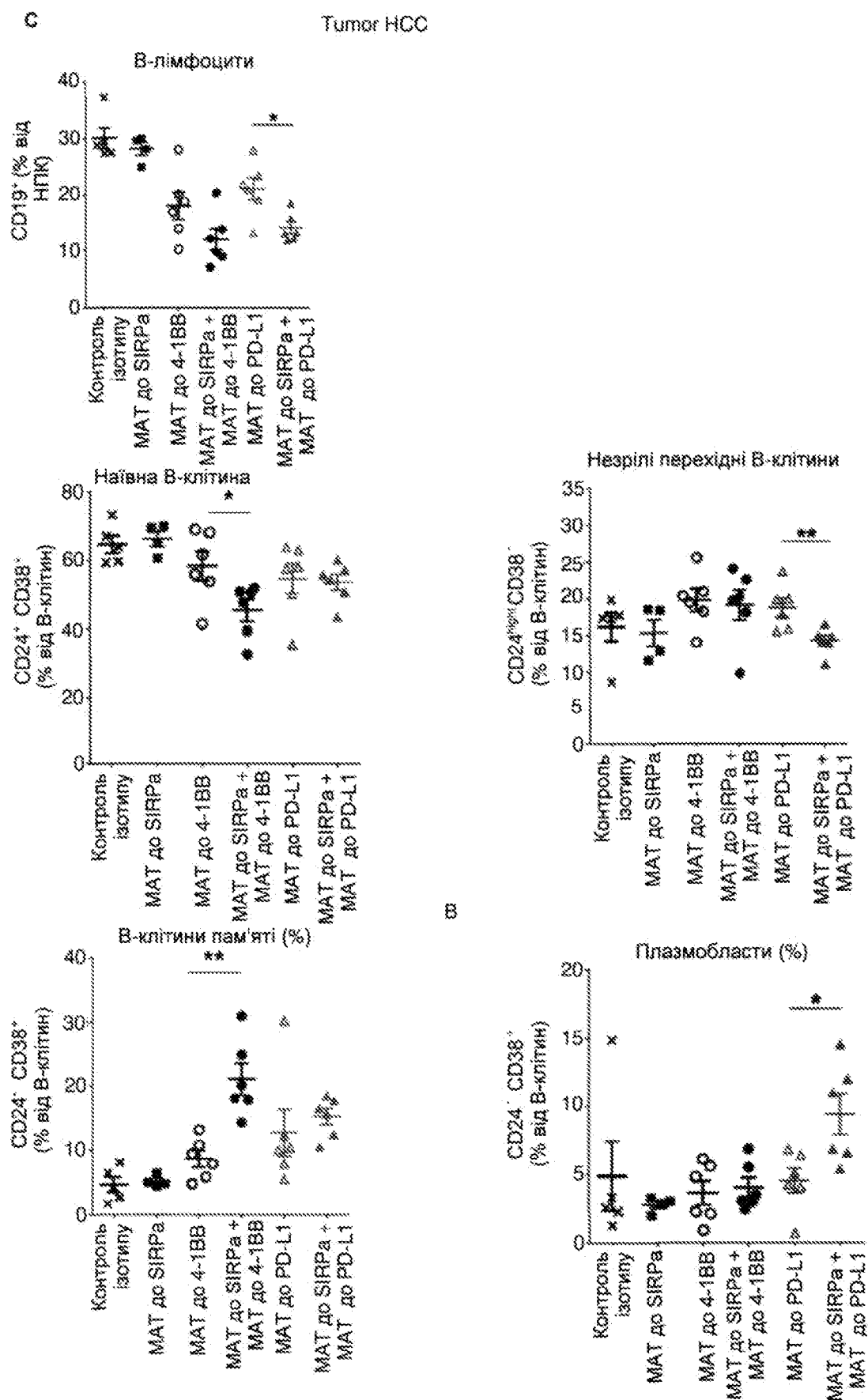
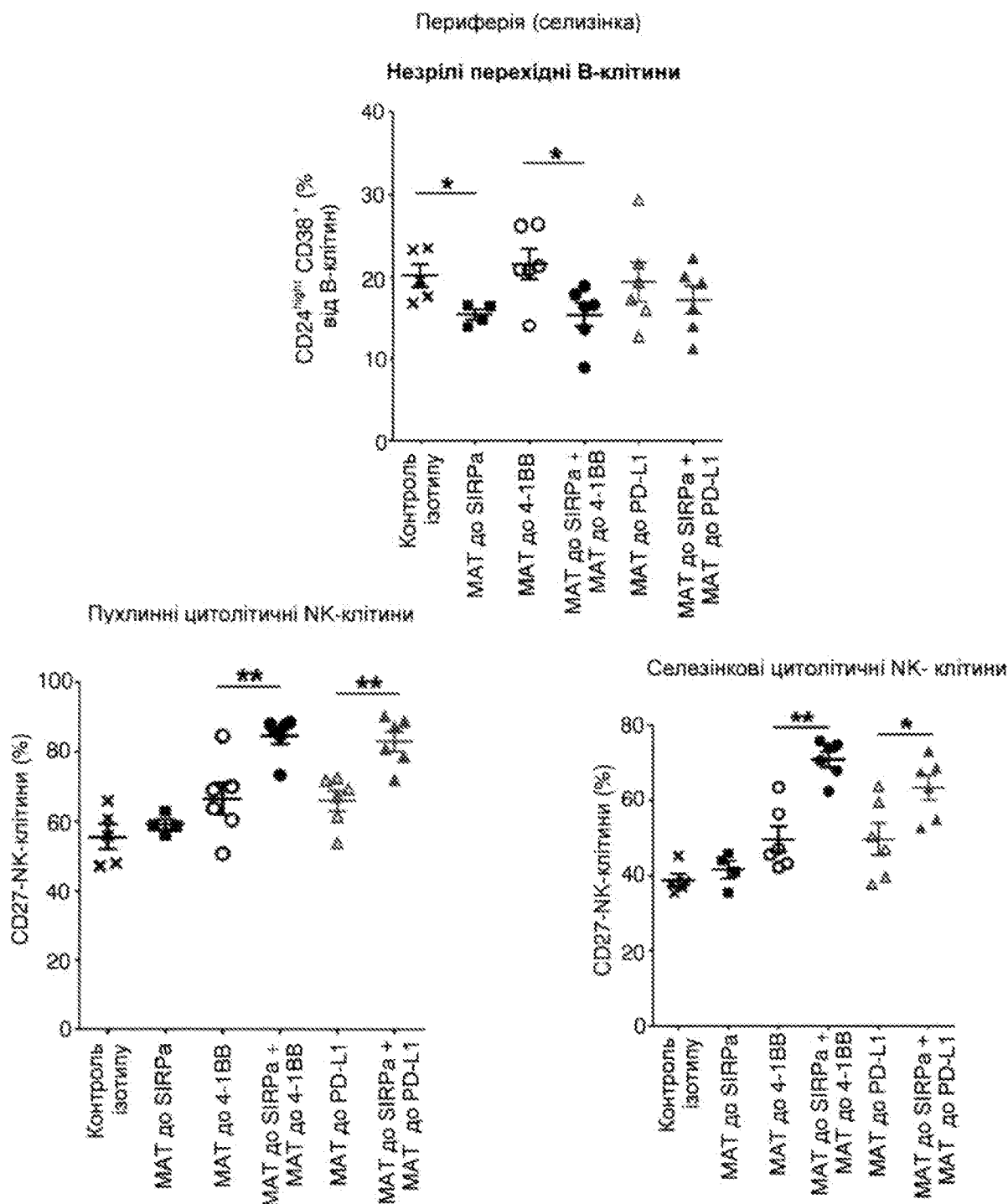
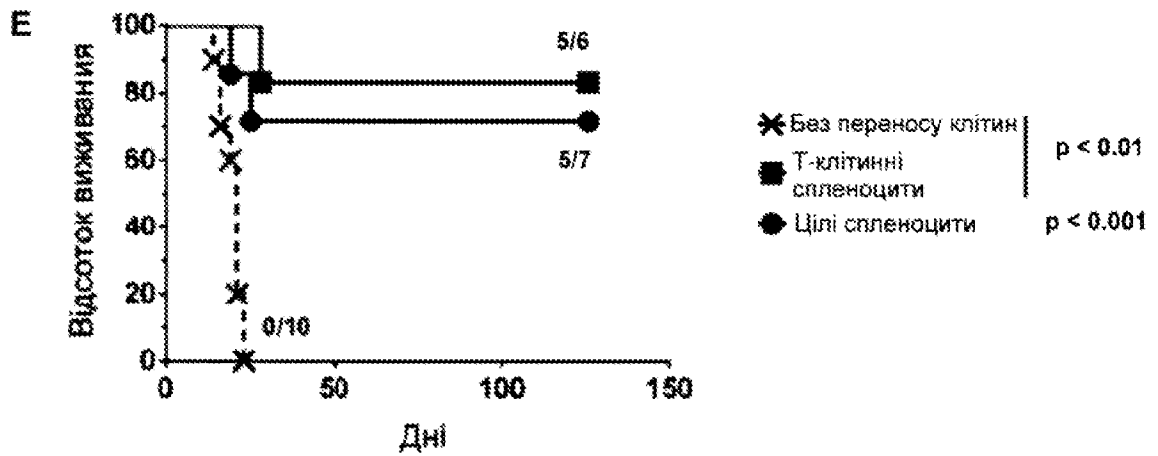


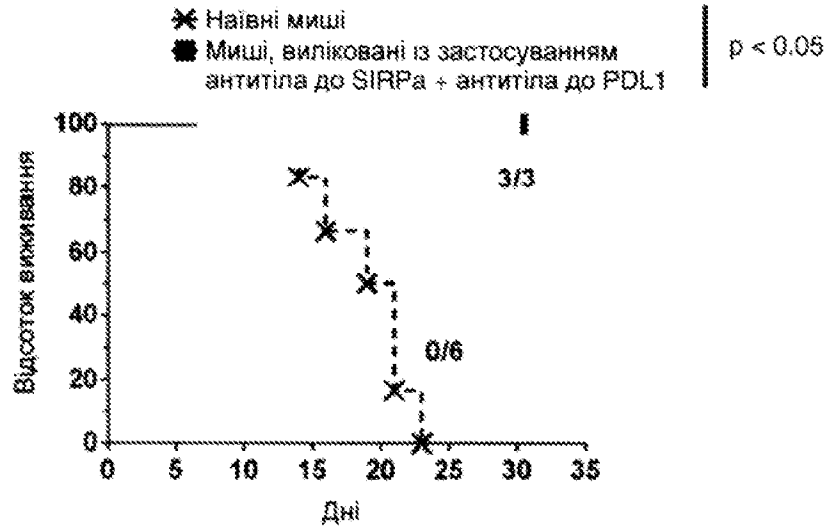
Fig. 15
(середина)



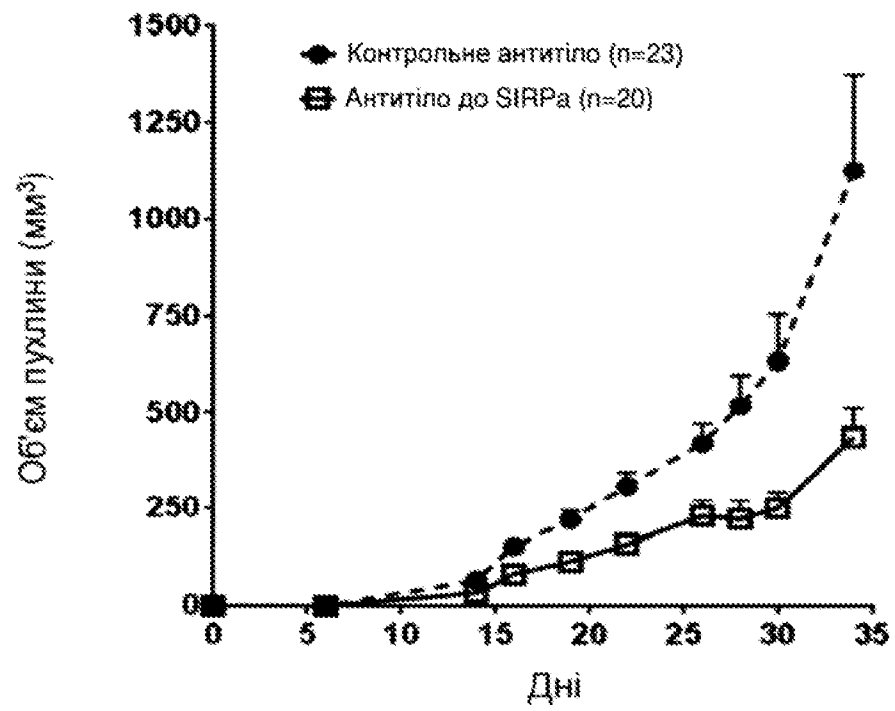
Фіг. 15
(середина)



Фіг. 15
(кінець)

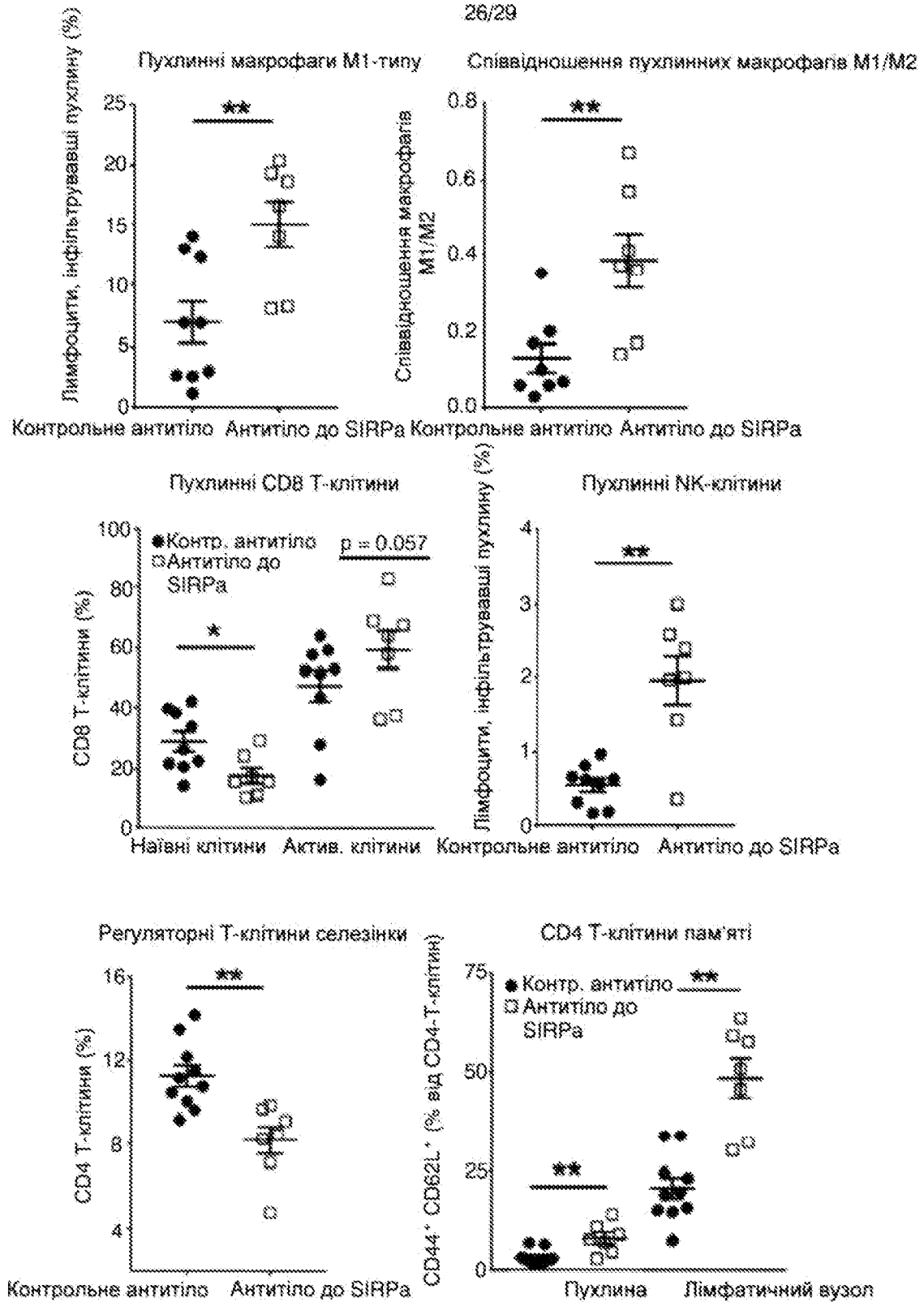


Фіг. 16

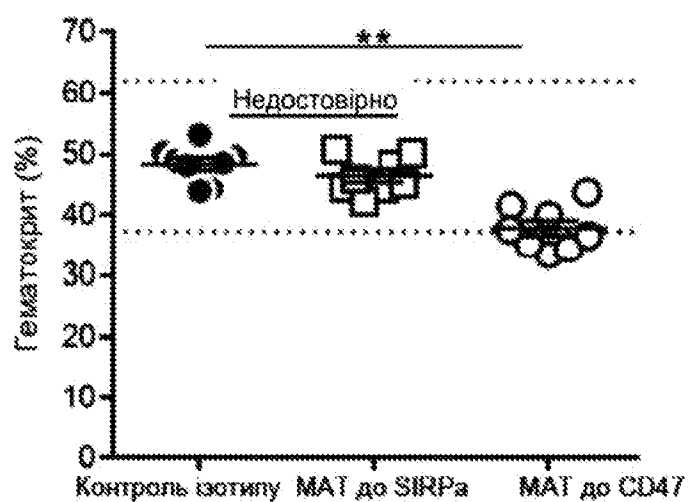
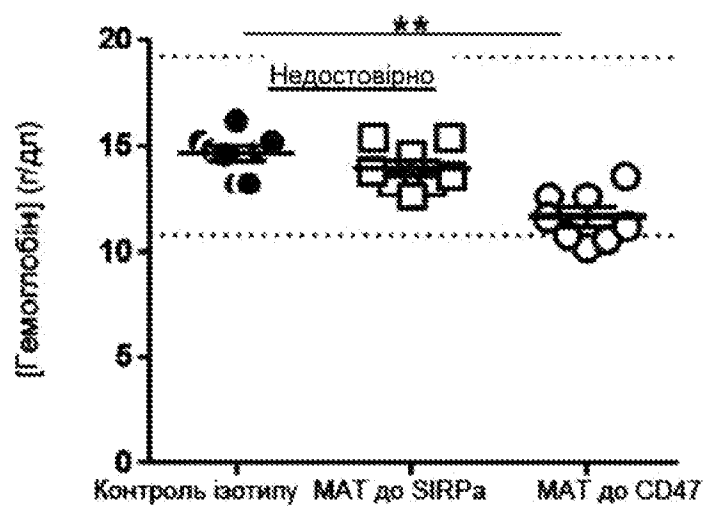


Фіг. 17

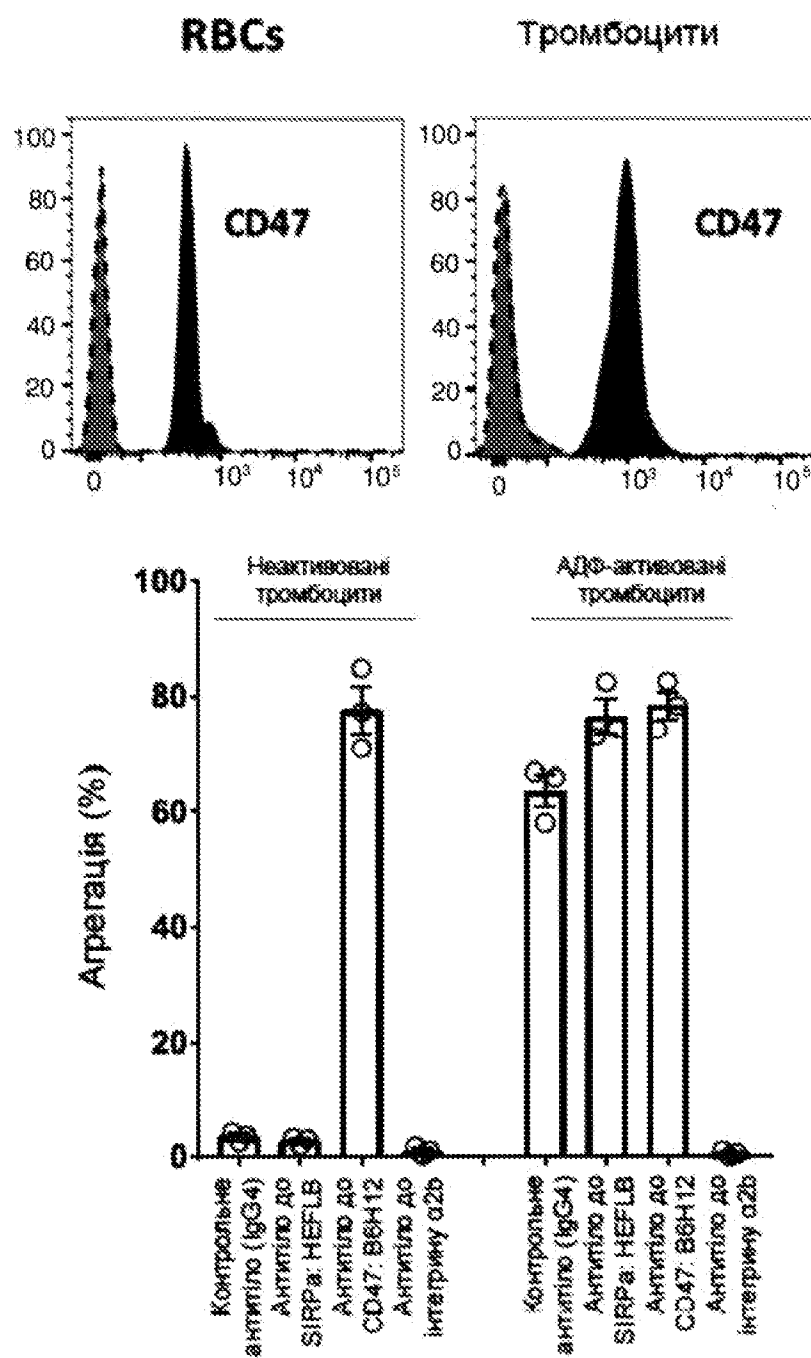
26/29



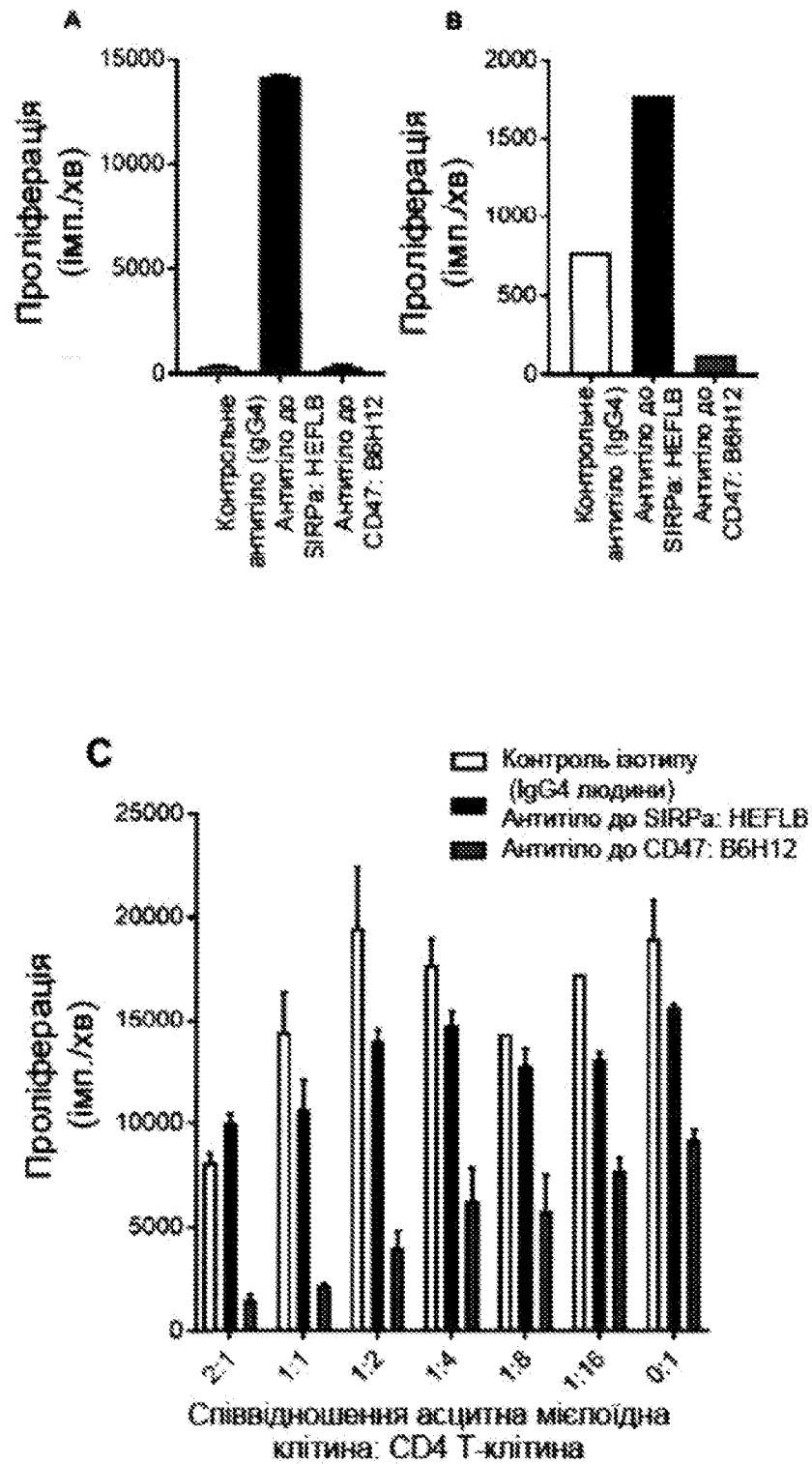
Фіг. 18



Фіг. 19



Фіг. 20



Фіг. 21