

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393348** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.07.31

(22) Дата подачи заявки
2015.09.28

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(54) **МОДУЛЯЦИЯ СТИМУЛИРУЮЩИХ И НЕСТИМУЛИРУЮЩИХ МИЕЛОИДНЫХ КЛЕТОК**

(31) 62/056,569; 62/129,883

(32) 2014.09.28; 2015.03.08

(33) US

(62) 202090201; 2015.09.28

(71) Заявитель:
**ЗЕ РЕДЖЕНТС ОФ ЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ
(US)**

(72) Изобретатель:
**Крумел Мэтью, Броз Миранда, Волф
Денис, Поллак Джошуа, Бинневис
Михаил (US)**

(74) Представитель:
**Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В.,
Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А. (RU)**

(57) Описаны способы и композиции для усиления иммунного ответа и/или для лечения у индивида патологического состояния, связанного с иммунной системой, например ракового заболевания, включающие уничтожение, блокирование или истощение нестимулирующих миелоидных клеток с использованием антигенсвязывающего белка, такого как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

A1

202393348

202393348

A1

МОДУЛЯЦИЯ СТИМУЛИРУЮЩИХ И НЕСТИМУЛИРУЮЩИХ МИЕЛОИДНЫХ КЛЕТОК

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США №62/056569, поданной 28 сентября 2014 г., и предварительной заявке на патент США №62/129883, поданной 8 марта 2015 г., каждая из которых тем самым включена в данный документ в полном объеме путем ссылки во всех смыслах.

Заявление о финансировании исследований или разработок из федерального бюджета

[0002] Данное изобретение сделано при государственной поддержке по грантам U01 CA141451 и U54 CA163123, присужденных Национальным институтом здравоохранения. Правительство имеет определенные права на данное изобретение.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Иммуитет играет важную роль для предотвращения роста опухолей. Внутри очага поражения может создаваться сложное микроокружение и, несмотря на рекрутирование Т-клеток, часто отсутствует эффективный контроль за размножением клеточной массы. Понимание равновесия между удалением опухолей и избеганием обнаружения опухолей может основываться на осмыслении различных ролей миелоидных клеток, которые они играют в микроокружении опухолей.

[0004] Миелоидные популяции микроокружения опухолей в значительной степени включают моноциты и нейтрофилы (иногда более широко сгруппированные как миелоидные супрессорные клетки), макрофаги и дендритные клетки. Хотя внутриопухолевые миелоидные популяции, в целом, долго время считались нестимулирующими или супрессорными, недавно было признано, что не все опухоль-инфильтрирующие миелоидные клетки являются одинаковыми.

[0005] В нормальных тканях многие из этих миелоидных клеток являются необходимыми как для врожденного и приобретенного иммунитета, так и, в частности, для заживления ран. Однако на фоне ракового заболевания обычно описывают значительный избыток макрофагов и дисфункциональные или искаженные популяции этих и других типов клеток. Если считать, что совокупная популяция определяется отдельными маркерами, такими как CD68 или CD163, то «макрофаговая» инфильтрация коррелирует у субъектов с более неблагоприятными исходами по множеству типов опухолей ((de Visser, *Cancer Immunol Immunother*, 2008;57:1531–9); (Hanada et al., *Int J Urol* 2000;7:263–9); (Yao et al. *Clin Cancer Res*, 520, 2001;7:4021–6); (Ruffell et al., *PNAS*, 523 2012; 109:2796–801)). Но определение

фенотипических и функциональных субпопуляций макрофагов из микроокружения опухолей усложнено сходством макрофагов и дендритных клеток, и является проблемой в биологии опухолей. Для решения задачи часто применяется морфологический критерий; один подход при попытке дифференцировать дендритные клетки от макрофагов основан на более остроконечной или дендритной морфологии первых и более гладкой или выпуклой морфологии последних (Bell et al., J Exp Med 555, 1999;190:1417–26). Другие группы исследователей пытаются дифференцировать на основе генетических маркеров и маркеров клеточной поверхности.

[0006] Внутри опухолей существует разнообразие в антигенпрезентирующем компартменте и Т-клетки могут дифференцироваться по признакам антигенпрезентирующих клеток (АРС). Благодаря тому, что Т-клетки представляют собой основной источник иммунитета против опухолей, то будет важным получить представление о точных признаках распознаваемых АРС. Миелоидные клетки выделяются среди клеток способностью презентовать опухолевые антигены на Т-клетках и тем самым поддерживать последние в активированном состоянии. Презентация антигенов происходит внутри самих опухолей и вероятно влияет на функции опухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL). Активация Т-клеток антигенпрезентирующими клетками (АРС) является важным компонентом антигенспецифических иммунных реакций и уничтожения опухолевых клеток. Так как данные миелоидные популяции представляют собой основных партнеров, взаимодействующих с Т-клетками и антигенпрезентирующими клетками для приходящих опухолереактивных цитотоксических Т-лимфоцитов, то получение представления об их особенностях может формировать направления лечения.

[0007] Все патенты, патентные заявки, публикации, документы и статьи, упомянутые в данном документе, включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] В данном документе описан способ уничтожения, блокирования или истощения нестимулирующих миелоидных клеток, присутствующих в раковой ткани субъекта, включающий приведение в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который связывается с нестимулирующими миелоидными клетками и присутствует в количестве, эффективном для уничтожения, блокирования или истощения нестимулирующих миелоидных клеток в раковой ткани субъекта. В некоторых аспектах изобретения нестимулирующие миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, содержащей стимулирующие миелоидные клетки и нестимулирующие миелоидные клетки. В некоторых аспектах изобретения уничтожение, блокирование или истощение нестимулирующих миелоидных клеток

излечивает субъекта путем уменьшения количества или объема раковой ткани. В некоторых аспектах изобретения приведение в контакт увеличивает соотношение стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам в популяции иммунных клеток. В некоторых аспектах изобретения приведение в контакт уменьшает соотношение нестимулирующих миелоидных клеток к стимулирующим миелоидным клеткам в популяции иммунных клеток. В некоторых аспектах изобретения приведение в контакт усиливает у субъекта иммунный ответ. В некоторых аспектах изобретения приведение в контакт практически не уничтожает, не блокирует или не истощает миелоидные клетки, присутствующие за пределами раковой ткани, и/или стимулирующие миелоидные клетки, присутствующие в раковой ткани.

[0009] В данном документе также описан способ лечения рака у субъекта, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с нестимулирующими миелоидными клетками, присутствующими в раковом образовании, и присутствует в количестве, эффективном для уничтожения, блокирования или истощения нестимулирующих миелоидных клеток. В некоторых аспектах изобретения нестимулирующие миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, содержащей стимулирующие миелоидные клетки и нестимулирующие миелоидные клетки. В некоторых аспектах изобретения уничтожение, блокирование или истощение нестимулирующих миелоидных клеток излечивает субъекта путем уменьшения количества или объема раковой ткани. В некоторых аспектах изобретения приведение в контакт увеличивает соотношение стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам в популяции иммунных клеток. В некоторых аспектах изобретения приведение в контакт уменьшает соотношение нестимулирующих миелоидных клеток к стимулирующим миелоидным клеткам в популяции иммунных клеток. В некоторых аспектах изобретения приведение в контакт практически не уничтожает, не блокирует или не истощает миелоидные клетки, присутствующие за пределами ракового образования, и/или стимулирующие миелоидные клетки, присутствующие в раковом образовании. В некоторых аспектах изобретения рак субъекта лечат возникновением или усилением иммунного ответа к раковому заболеванию.

[0010] В некоторых аспектах изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с внеклеточным доменом белка-мишени, экспрессируемым на нестимулирующих миелоидных клетках, выбранных из группы, состоящей из TREM2, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK и TMEM119, причем нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой клетки CD45⁺, HLA-DR⁺, CD11c⁺, CD14⁺ и BDCA3⁻, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент уничтожает, блокирует или истощает нестимулирующие миелоидные клетки посредством антителозависимой клеточно-опосредованной

цитотоксичности (АЗКЦ) или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) до уровня, который меньше уровня нестимулирующих миелоидных клеток, присутствующих в раковой ткани до приведения в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, причем нестимулирующие миелоидные клетки присутствуют в популяции иммунных клеток, содержащей стимулирующие миелоидные клетки, которые представляют собой клетки CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺, BDCA1⁻ и BDCA3⁺, и нестимулирующие миелоидные клетки, при этом приведение в контакт или введение практически не уничтожает, не блокирует или не истощает миелоидные клетки, присутствующие за пределами раковой ткани, и/или стимулирующие миелоидные клетки, присутствующие в раковой ткани, и при этом уничтожение, блокирование или истощение нестимулирующих миелоидных клеток излечивает рак путем усиления иммунного ответа к раковой ткани.

[0011] В некоторых аспектах изобретения нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой по меньшей мере одни из: опухолеассоциированных макрофагов; опухолеассоциированных дендритных клеток; клеток CD45⁺, HLA-DR⁺, CD11c⁺, CD14⁺, и BDCA3⁻; CD45⁺, HLA-DR⁺, и CD14⁺; CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, BDCA3⁻, CD11b⁺, и CD11c⁺; CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺ и BDCA1⁺; но не клетки BDCA3⁺, например, как можно определить анализом проточной цитометрии или эквивалентным анализом. В некоторых аспектах изобретения нестимулирующие миелоидные клетки являются положительными по меньшей мере по одному из: C5AR1, LYVE1, ABCC3, MRC1, SIGLEC1, STAB1, C1QB, C1QA, TMEM37, MERTK, C1QC, TMEM119, MS4A7, APOE, CYP4F18, TREM2, TLR7 и LILRB4; и/или являются отрицательными по одному из: KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, VTLA, MYCL1, CLEC9A, BDCA3 и XCR1, например, как можно определить методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), на генетическом чипе, проточной цитометрией, секвенированием РНК или эквивалентным анализом.

[0012] В некоторых аспектах изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет по меньшей мере одну из антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксической (АЗКЦ) активности, комплементзависимой цитотоксической (КЗЦ) активности и антитело-опосредованной активности фагоцитоза. В некоторых аспектах изобретения антитело представляет собой по меньшей мере одно из моноклонального антитела, антагонистического антитела, поликлонального антитела, антитела IgG1, антитела IgG3, афукозилированного антитела, биспецифического антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, полноразмерного антитела и антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не является антителом IgG2 или при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не является антителом IgG4. В некоторых аспектах изобретения

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является конъюгированным. В некоторых аспектах изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгирован с по меньшей мере одним терапевтическим средством, выбранным из группы, состоящей из радионуклида, цитотоксина, химиотерапевтического средства, лекарственного средства, пролекарства, токсина, фермента, иммуномодулятора, анти-ангиогенного средства, про-апоптического средства, цитокина, гормона, олигонуклеотида, антисмысловой молекулы, миРНК, второго антитела и фрагмента второго антитела. В некоторых аспектах изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент селективно связывается с по меньшей мере одним из TREM2, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK и TMEM119. В некоторых аспектах изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не связывает селективно LILRB4.

[0013] В некоторых аспектах изобретения приведение в контакт или введение индуцирует по меньшей мере одно из: гибели нестимулирующих миелоидных клеток, апоптоза нестимулирующих миелоидных клеток, лизиса нестимулирующих миелоидных клеток, фагоцитоза нестимулирующих миелоидных клеток и остановки роста у нестимулирующих миелоидных клеток.

[0014] В некоторых аспектах изобретения стимулирующие миелоидные клетки включают клетки, которые представляют собой по меньшей мере одни из: CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺, BDCA1⁻ и BDCA3⁺; CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺ и BDCA3⁺; CD45⁺, HLA-DR⁺ и BDCA3⁺; CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻ и BDCA3⁺, и CD45⁺, HLA-DR⁺, CD11c⁺ и BDCA3⁺, например, как можно определить анализом проточной цитометрии или эквивалентным анализом. В некоторых аспектах изобретения стимулирующие миелоидные клетки являются отрицательными по меньшей мере по одному из: C5AR1, LYVE1, ABCC3, MRC1, SIGLEC1, STAB1, C1QB, C1QA, TMEM37, MERTK, C1QC, TMEM119, MS4A7, APOE, CYP4F18, TREM2, TLR7 и LILRB4; и/или положительными по меньшей мере по одному из: KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, CLEC9A, BDCA3 и XCR1, например, как можно определить методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), на генетическом чипе, проточной цитометрией, секвенированием РНК или эквивалентным анализом.

[0015] В некоторых аспектах изобретения нестимулирующие миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, содержащей стимулирующие миелоидные клетки и нестимулирующие миелоидные клетки.

[0016] В некоторых аспектах изобретения раковая ткань представляет собой солидный рак или гемобластоз. В некоторых аспектах изобретения рак выбран из группы, состоящей из: меланомы, рака почки, гепатобилиарного рака, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКГШ), рака

поджелудочной железы, толстой кишки, мочевого пузыря, глиобластомы, рака простаты, легкого и молочной железы.

[0017] В некоторых аспектах изобретения субъект является человеком. В некоторых аспектах изобретения субъект предварительно получал, параллельно получает или впоследствии будет получать иммунотерапию. В некоторых аспектах изобретения иммунотерапия представляет собой по меньшей мере одну из: иммунотерапии, которая подавляет ингибитор контрольной точки; иммунотерапии, которая подавляет ингибитор контрольной точки Т-клеток; в которой используются антитела против PD1; против PDL1; против CTLA4; адаптивной Т-клеточной терапии; CAR-Т-клеточной терапии; применения вакцины на основе дендритных клеток; моноцитарной вакцины; антигенсвязывающего белка, который связывает и Т-клетки и антигенпрезентирующие клетки; антигенсвязывающего белка ViTE; toll-подобного приемного лиганда и цитокина.

[0018] В некоторых аспектах изобретения способы усиливают у субъекта иммунный ответ. В некоторых аспектах изобретения иммунный ответ представляет собой иммунный ответ на основе применения иммунотерапии. В некоторых аспектах изобретения иммунный ответ на основе применения иммунотерапии направлен против раковой ткани.

[0019] В некоторых аспектах изобретения способ дополнительно включает введение средства, которое усиливает активность или увеличивает количество стимулирующих миелоидных клеток. В некоторых аспектах изобретения средство представляет собой FLT3L.

[0020] В некоторых аспектах изобретения способы излечивают у субъекта рак.

[0021] В некоторых аспектах изобретения приведение в контакт или введение увеличивает соотношение стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам в популяции иммунных клеток. В некоторых аспектах изобретения приведение в контакт или введение приводит к получению у субъекта более 1-4, 1-2, 1, 1,37, 1,6, 2, 3 или 4 % стимулирующих миелоидных клеток, присутствующих в опухоли от всех клеток CD45+, HLA-DR+, присутствующих в опухоли.

[0022] В некоторых аспектах изобретения способ дополнительно включает определение количества стимулирующих миелоидных клеток и/или нестимулирующих миелоидных клеток в биологическом образце, взятом у субъекта. В некоторых аспектах изобретения этап определения используют для определения того может ли субъект получить пользу от введения данного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах изобретения этап определения используют для контроля эффективности введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0023] В некоторых аспектах изобретения способ дополнительно включает определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из C5AR1, LYVE1, ABCC3, MRC1, SIGLEC1, STAB1, C1QB, C1QA, TMEM37, MERTK, C1QC, TMEM119, MS4A7, APO E, CYP4F18, TREM2, TLR7 и LILRB4 в биологическом образце, взятом у субъекта. В некоторых аспектах изобретения способ дополнительно включает определение уровня экспрессии из по меньшей мере одного из KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, VTLA, MYCL1, CLEC9A, BDCA3 и XCR1 в биологическом образце, взятом у субъекта.

[0024] В некоторых аспектах изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых аспектах изобретения композиция является стерильной.

[0025] В некоторых аспектах изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с внеклеточным доменом белка-мишени, экспрессируемым на нестимулирующих миелоидных клетках, выбранных из группы, состоящей из TREM2, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK и TMEM119, причем нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой клетки CD45⁺, HLA-DR⁺, CD11c⁺, CD14⁺ и BDCA3⁻, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент уничтожает, блокирует или истощает нестимулирующие миелоидные клетки посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) до уровня, который меньше уровня нестимулирующих миелоидных клеток, присутствующих в раковой ткани до приведения в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, причем нестимулирующие миелоидные клетки присутствуют в популяции иммунных клеток, содержащей стимулирующие миелоидные клетки, которые представляют собой клетки CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺, BDCA1⁻ и BDCA3⁺, и нестимулирующие миелоидные клетки, и при этом уничтожение, блокирование или истощение нестимулирующих миелоидных клеток излечивает рак.

[0026] В данном документе также описан способ усиления иммунного ответа субъекта к опухоли, включающий введение субъекту эффективного количества лекарства, которое увеличивает избыток стимулирующих миелоидных клеток в опухоли или уменьшает избыток нестимулирующих миелоидных клеток в опухоли, причем лекарство усиливает иммунный ответ к опухоли и необязательно при этом иммунный ответ уменьшает объем опухоли.

[0027] В данном документе также описан способ улучшения эффективности противоракового иммунотерапевтического лекарства у субъекта, имеющего опухоль, включающий введение субъекту

эффективного количества лекарства, которое увеличивает избыток стимулирующих миелоидных клеток в опухоли или уменьшает избыток нестимулирующих миелоидных клеток в опухоли, причем субъект предварительно получал, параллельно получает или будет впоследствии получать противораковую иммунотерапию.

[0028] В некоторых аспектах изобретения способ включает системное введение или усиление FLT3L. В некоторых аспектах изобретения способ включает системное введение одного или более антител, которые приводят к удалению или снижению количества нестимулирующих миелоидных клеток, избирательно не затрагивая стимулирующие миелоидные клетки. В некоторых аспектах изобретения способ включает лечение аутологических клеток костного мозга или крови субъекта с помощью FLT3L, при одновременном блокировании экспрессии или действия CSF1. В некоторых аспектах изобретения способ включает усиление экспрессии IRF8, Mycl1 или BATF3, или ZBTB46 в популяциях предшественников клеток костного мозга или крови.

[0029] В данном документе также описан способ определения присутствия или отсутствия нестимулирующих миелоидных клеток в образце, взятом у субъекта, включающий: приведение в контакт популяции иммунных клеток, содержащей нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который связывается с нестимулирующими миелоидными клетками; определение присутствия комплексов, указывающих на связывание антитела с нестимулирующими миелоидными клетками; необязательно определение количества нестимулирующих миелоидных клеток в популяции и необязательно лечение субъекта с помощью антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с нестимулирующими миелоидными клетками.

[0030] В данном документе также описан способ определения присутствия или отсутствия стимулирующих миелоидных клеток в образце, взятом у субъекта, включающий: приведение в контакт популяции иммунных клеток, содержащей стимулирующие миелоидные клетки и нестимулирующие миелоидные клетки, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который связывается со стимулирующими миелоидными клетками; определение присутствия комплексов, указывающих на связывание антитела со стимулирующими миелоидными клетками; необязательно определение количества стимулирующих миелоидных клеток в популяции и необязательно лечение субъекта.

[0031] В данном документе также описан способ количественного определения нестимулирующих миелоидных клеток в образце опухоли, включающий измерение количества клеток, которые являются по меньшей мере одними из: опухолиассоциированных макрофагов; опухолиассоциированных

дендритных клеток; клеток CD45⁺, HLA-DR⁺, and CD14⁺; CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, BDCA3⁻, CD11b⁺ и CD11c⁺; CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺ и BDCA1⁺; но не BDCA3⁺.

[0032] В данном документе также описан способ количественного определения стимулирующих миелоидных клеток, присутствующих в образце опухоли, включающий измерение количества клеток, которые являются по меньшей мере одними из клеток CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺ и BDCA3⁺; CD45⁺, HLA-DR⁺, и BDCA3⁺; CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻ и BDCA3⁺, и CD45⁺, HLA-DR⁺, CD11c⁺ и BDCA3⁺.

[0033] В некоторых аспектах изобретения клетки количественно определяют методом сортировки клеток. В некоторых аспектах изобретения метод сортировки клеток выбирают из группы, состоящей из сортировки клеток с активированной флуоресценцией, проточной цитометрии, магнитной сортировки клеток, сортировки на системе micrograft и разделения клеток на основе аффинности.

[0034] В данном документе также описан способ количественного определения нестимулирующих миелоидных клеток в образце опухоли, включающий измерение экспрессии по меньшей мере одного из маркеров нестимулирующих миелоидных клеток: C5AR1, LYVE1, ABCC3, MRC1, SIGLEC1, STAB1, C1QB, C1QA, TMEM37, MERTK, C1QC, TMEM119, MS4A7, APOE, CYP4F18, TREM2, TLR7 и LILRB4.

[0035] В данном документе также описан способ количественного определения стимулирующих миелоидных клеток, присутствующих в образце опухоли, включающий измерение экспрессии по меньшей мере одного из маркеров стимулирующих миелоидных клеток: KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, VTLA, MYCL1, CLEC9A, BDCA3 и XCR1.

[0036] В некоторых аспектах изобретения экспрессию маркеров измеряют методом количественной ПЦР. В некоторых аспектах изобретения количественное определение экспрессии маркерных генов выполняют с использованием олигонуклеотидного чипа, содержащего иммобилизованные зонды для последовательностей маркерных генов.

[0037] В некоторых аспектах изобретения образец опухоли получают из опухоли путем игольчатой биопсии, штанцевой биопсии или хирургическим иссечением опухоли.

[0038] В данном документе также описан способ оценки ракового статуса у пациента, включающий этапы получения образца опухоли у субъекта и измерения избытка стимулирующих миелоидных клеток в образце опухоли, полученном у субъекта.

[0039] В некоторых аспектах изобретения оцененный раковый статус представляет собой вероятность повторного проявления рака и при этом повышенный избыток стимулирующих миелоидных клеток в образце опухоли является показателем сниженной вероятности повторного проявления рака. В некоторых аспектах изобретения оцененный раковый статус представляет собой восприимчивость субъекта к иммунотерапевтическому лечению и при этом повышенный избыток стимулирующих миелоидных клеток в образце опухоли является показателем повышенной вероятности того, что субъект будет положительно отвечать на иммунотерапевтическое лечение. В некоторых аспектах изобретения оцененный раковый статус представляет собой эффективность иммунотерапевтического лечения и при этом повышенный избыток стимулирующих миелоидных клеток в образце опухоли является показателем эффективности иммунотерапевтического лечения. В некоторых аспектах изобретения оцененный раковый статус представляет собой ожидаемую продолжительность выживания при раковом заболевании и при этом повышенный избыток стимулирующих миелоидных клеток в образце опухоли является показателем ожидаемой продолжительности выживания при раковом заболевании.

[0040] В некоторых аспектах изобретения повышенный избыток стимулирующих миелоидных клеток представляет собой избыток, который превышает медианный или средний избыток стимулирующих миелоидных клеток, наблюдаемый в пуле репрезентативных образцов опухолей. В некоторых аспектах изобретения избыток стимулирующих миелоидных клеток измеряют как соотношение стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам, присутствующим в образце. В некоторых аспектах изобретения избыток стимулирующих миелоидных клеток измеряют как соотношение стимулирующих миелоидных клеток к общему количеству миелоидных клеток, присутствующих в образце. В некоторых аспектах изобретения избыток стимулирующих миелоидных клеток измеряют как соотношение стимулирующих миелоидных клеток к общему количеству клеток HLA-DR⁺, присутствующих в образце. В некоторых аспектах изобретения повышенный избыток стимулирующих миелоидных клеток определяют как более, чем 1,37 стимулирующих миелоидных клеток на 100 клеток HLA-DR⁺. В некоторых аспектах изобретения иммунотерапевтическое лечение представляет собой лечение антителом против PD1. В некоторых аспектах изобретения лечение антителом против PD1 представляет собой введение ниволумаба или пембромузулаба. В некоторых аспектах изобретения субъект болеет меланомой.

[0041] В данном документе также описан способ оценки эффективности лечения с целью увеличения избытка стимулирующих миелоидных клеток в опухолях, включающий этапы: введения лекарства одному или более субъектам, болеющим раком, и измерения избытка стимулирующих миелоидных клеток в одном или более образцов опухолей, полученных от одного или более субъектов,

причем увеличенный избыток стимулирующих миелоидных клеток в одном или более образцов опухолей является показателем того, что средство является эффективным.

[0042] В некоторых аспектах изобретения увеличенный избыток стимулирующих миелоидных клеток определяют как больший избыток стимулирующих миелоидных клеток в одном или более образцов опухолей, чем избыток, который наблюдали в одном или более образцов опухолей, полученных от одного или более субъектов, перед введением лекарства. В некоторых аспектах изобретения увеличенный избыток стимулирующих миелоидных клеток определяют как больший избыток стимулирующих миелоидных клеток в одном или более образцов опухолей, взятых у лечившихся субъектов, чем избыток, который наблюдали в пуле репрезентативных образцов опухолей, взятых у нелечившихся субъектов.

[0043] Антитело против LILRB4 или его антигенсвязывающий фрагмент, который содержит одну или более последовательностей, показанных в таблице ВВ, или ее вариант, имеющий по меньшей мере 80, 90 или 95 % идентичности последовательности с последовательностью, показанной в таблице ВВ, причем необязательно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каждый из CDR из последовательностей CDR, показанных в таблице ВВ, и при этом необязательно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каждый из переменных доменов, показанных в таблице ВВ, и при этом необязательно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит полноразмерные последовательности, показанные в таблице ВВ.

[0044] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает белок LILRB4 и способен специфически уничтожать, истощать или блокировать нестимулирующие миелоидные клетки.

[0045] В некоторых аспектах изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с внеклеточным доменом LILRB4, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент уничтожает, блокирует или истощает нестимулирующие миелоидные клетки посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ).

[0046] В некоторых аспектах изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет по меньшей мере одну из антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксической (АЗКЦ) активности, комплементзависимой цитотоксической (КЗЦ) активности и антитело-опосредованной активности фагоцитоза. В некоторых аспектах изобретения антитело представляет собой по меньшей мере одно из моноклонального антитела, антагонистического антитела, поликлонального антитела,

антитела IgG1, антитела IgG3, афукозилированного антитела, биспецифического антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, полноразмерного антитела и антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не является антителом IgG2 или при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не является антителом IgG4. В некоторых аспектах изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является конъюгированным. В некоторых аспектах изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгирован с по меньшей мере одним терапевтическим средством, выбранным из группы, состоящей из радионуклида, цитотоксина, химиотерапевтического средства, лекарственного средства, пролекарства, токсина, фермента, иммуномодулятора, анти-ангиогенного средства, про-апоптического средства, цитокина, гормона, олигонуклеотида, антисмысловой молекулы, миРНК, второго антитела и фрагмента второго антитела. В некоторых аспектах изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95 % идентична последовательности, изложенной в таблице ВВ.

[0047] Фармацевтическая композиция, содержащая антитело против LILBR4 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе и фармацевтически приемлемый наполнитель.

[0048] В некоторых аспектах изобретения композиция является стерильной.

[0049] В некоторых аспектах изобретения антитело против LILBR4 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, применяют в способе, описанном в данном документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0050] **Фиг. 1. Отдельные DC и избыточные макрофаги в мышинных и человеческих опухолях.** (Фиг. 1A) Результаты проточной цитометрии и распределения по гейтам популяций опухолевых APC, полученных из дезагрегированных и обогащенных CD45 опухолей PyMTchOVA. A-C: Репрезентативные результаты из более 5 независимых экспериментов. (Фиг. 1B) Результаты цитометрии популяций опухолевых APC в эктопических опухолях B78ChOVA. (Фиг. 1C) Гистограмма опухолевой флуоресценции mCherry от опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток в B78chOVA. (Фиг. 1D) Репрезентативные результаты дезагрегированного метастатического биоптата меланомы человека, выявляющие дополнительные популяции DC и TAM, определенные по CD45⁺ Lin⁻ (CD3e, CD56, CD19) HLA-DR⁺ и разделенные по CD14, BDCA1 и BDCA3. Дважды отрицательные клетки вероятно отображают избегание попадания В-клеток в гейт линии дифференцировки, незрелые моноциты или pDC. (Фиг. 1E) Относительные пропорции инфильтрирующих опухоли миелоидных

клеток в виде % от общего количества клеток CD45⁺ для моделей PyMTchOVA и B78chOVA. Объединенные данные, полученные для отдельных опухолей, представлены в виде среднего значения \pm стандартной ошибки среднего значения \pm SEM из (n=5) мышей. (Фиг. 1F) Частота встречаемости популяций DC и TAM, инфильтрирующих метастатическую меланому человека, представленная в виде % от общего количества клеток CD45⁺. Объединенные данные, полученные для отдельных опухолей, представлены в виде среднего значения \pm SEM из (n=4) мышей. На Фиг. 1C, гистограмма для каждого типа клеток от переднего до заднего графика: Т-клетки, Nф, DC2, DC1, Моно, TAM2, TAM1 и Опухолевые, соответственно.

[0051] Фиг. 2. Определение поверхностных и транскрипционных профилей выделяет различные линии дифференцировки опухолевых DC и макрофагов. Все данные (Фиг. 2A-G) получены из эктопической модели опухоли B78chOVA. Клеточные линии дифференцировки определены согласно Фиг. 1. (Фиг. 2A) Экспрессия набора специфических маркеров DC, по сравнению с соответствующим изотипом (закрашено серым цветом). Черными прямоугольниками отмечены популяции CD103⁺ DC2, демонстрирующие уникальную экспрессию. (Фиг. 2B) Дифференциальная экспрессия специфических маркеров макрофагов (отмечено цветом) с соответствующим изотипом (закрашено серым цветом). Черными прямоугольниками отмечены популяции CD11b⁺ DC1, TAM1 и TAM2, демонстрирующие уникальную экспрессию. (Фиг. 2C) Специфическая экспрессия маркеров DC-T_h2 (отмечено цветом) популяцией CD11b⁺ DC1 по сравнению с соответствующим изотипом (закрашено серым цветом). Черными прямоугольниками отмечены CD11b⁺ DC1, которые демонстрируют уникальную экспрессию. (Фиг. 2D) Общий транскрипционный профиль, выявленный секвенированием РНК очищенных методом FACS популяций из биологических образцов в трех повторах. Данные отображены в виде карты максимумов кратных Log₂ изменений относительно общего среднего значения из наиболее экспрессируемых 1000 генов по максимальной вариации между DC1, DC2, TAM1 и TAM2. (Фиг. 2E) Популяции PCA из DC1, DC2, TAM1 и TAM2 на основе общих транскрипционных профилей, полученных при секвенировании РНК. (Фиг. 2F) Результаты анализа количественной ПЦР в режиме реального времени (кПЦР-РВ) экспрессии *Irf4*, *Irf8*, *Myb* и *Zbtb46* (zDC) из отсортированных популяций APC. Данные представлены в виде среднего значения Δ Ct \pm SEM, рассчитанного из биологических анализов в трех повторах (n=3), (N. D. – не выявлено). (Фиг. 2G) Внутриклеточное окрашивание для *Irf4* и *Irf8* в опухолевых популяциях APC по сравнению с соответствующим изотипом (серый цвет). На Фиг. 2E каждый кластер из трех точек слева направо представляет собой: CD103⁺DC2, CD11b⁺DC1, F4/80⁺ TAM1 и F4/80⁺ TAM2, соответственно.

[0052] Фиг. 3. Различные требования *Irf4*, *Irf8* и *Batf3* для инфильтрирующих опухоли популяций APC. Все данные являются репрезентативными для проточного цитометрического анализа

популяций CD11b⁺DC1 и CD103⁺DC2 (разделенных на гейты по CD45⁺, Ly6C⁻, MHCII⁺, и CD24⁺). Данные показаны в виде среднего значения ±SEM. Статистическая значимость указана как *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; ns=статистически не значимый. (Фиг. 3А) Эктопические опухоли PyMT-VO из *Irf8*^{-/-} (КО) по сравнению с контролем (дикий тип – WT). Относительные соотношения клеток в виде % от общего количества клеток MHCII⁺. Данные объединены для отдельных мышей (n=6) из 2 независимых экспериментов. (Фиг. 3В) Эктопические опухоли B78chOVA у хозяина *Irf4*^{fl/fl} x CD11c-CRE⁺ по сравнению с Cre-отрицательными животными того же помета. Относительные соотношения клеток в виде % от общего количества клеток MHCII⁺. Данные объединены для отдельных мышей (n=7) из 2 независимых экспериментов. (Фиг. 3С) Эктопические опухоли B78chOVA у *Batf3* KO по сравнению с WT. Относительные соотношения клеток изображены в виде % от общего количества клеток MHCII⁺. Данные объединены для отдельных мышей (n=6). (Фиг. 3D) Эктопические опухоли B78chOVA у мышей *Zbtb46*-DTR, получающих острую форму истощения за 24 часа с помощью DT или ФСБ. Относительные соотношения клеток изображены в виде % от общего количества клеток MHCII⁺. Данные объединены для отдельных мышей (n=6) из 2 независимых экспериментов.

[0053] Фиг. 4. Различная возможность синтеза цитокинов M-CSF и GM-CSF опухолеинфильтрирующими популяциями APC. (Фиг. 4А) Результаты кПЦР экспрессии CSF1R, CSF2Rb и CSF3R из отсортированных APC. Данные представлены в виде среднего значения Δ Ct ± SEM, рассчитанного из биологических анализов в трех повторах (n=3) для отдельных опухолей B78chOVA, (N. D. – не выявлено). (Фиг. 4В) Результаты цитометрии опухолевых APC через 3 суток у животных с заблокированным αCSF-1 (заполнено точками) по сравнению с изотипными (закрашено) животными, получавшими лечение опухолей. Результаты количественного определения в виде % от общего количества опухолевых клеток CD45⁺, объединенные для отдельных мышей (n=6) из 2 независимых экспериментов, показаны как среднее значение ±SEM. Статистическая значимость указана как *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; ns=статистически не значимый. (Фиг. 4С) Схематический адоптивный перенос предшественников КМ и поступления в КМ, селезенку и опухоль. (Фиг. 4D) Репрезентативные результаты цитометрии прибывающих в опухоли конгенных клеток. Распределенные на гейты по CD45. 2 и последующая стратегия определения гейтов из Фиг. 1А. (Фиг. 4Е) Конкурентный адоптивный перенос КМ для WT по сравнению спредшественниками GMCSFR KO GMP в реципиенты опухолей B78chOVA. Эффективность репопуляции, отмеченная в виде % от общего количества перенесенных клеток. Репрезентативные результаты распределения по гейтам прибывающих в опухоль клеток GMP, WT (левый столбец для каждого типа данных для КМ, селезенки и опухоли), KO (правый столбец для каждого типа данных для КМ, селезенки и опухоли). Результаты количественного определения прибывающих в опухоли DC, определенные по CD24⁺ CD11c⁺. Данные объединены для 2 независимых экспериментов, отмечены в виде среднего значения ±SEM для отдельных опухолей (n=6).

(Фиг. 4F) Данные цитометрии для популяций CD11b⁺DC1 и CD103⁺DC2 (распределенный на гейты по CD45⁺, Ly6C⁻ MHCII⁺, CD24⁺) между эктопическими, экспрессирующими цитокины опухоли B16-F10, B16-GMCSF и B16-FLT3L. Популяции для каждой опухоли представлены в виде % от общего количества клеток MHCII⁺. Данные объединены из 3 независимых экспериментов, отмечены в виде среднего значения \pm SEM для отдельных опухолей (n=6). Для каждой группы на Фиг. 4F (правое изображение) столбцы слева направо представляют собой: DC2, DC1, TAM1 и TAM2, соответственно.

[0054] Фиг. 5. Уникальный процессинг антигенов и характеристики презентирования CD103⁺ DC2. Все данные (Фиг. 5A-G) получены из эктопической модели опухоли B78chOVA. (Фиг. 5A) Карта максимумов Log₂-трансформированных значений экспрессии, полученных при секвенировании РНК среди популяций по отобранным генам, вовлеченным в перекрестное презентирование, продукцию цитокинов и хемокинов и костимуляцию. Масштабирование в цвете определяется как: светло-серый=нижний 20^{-й} перцентиль, темно-серый=верхний 80^{-й} перцентиль, с распределенными по шкале и расположенными в центре 20^{-м}-80^{-м} перцентильями (50^{-й} перцентиль). Данные по отсортированным клеткам из биологических анализов в трех повторах. (Фиг. 5B) Данные цитометрии уровней поверхностных белков лигандов для регуляторных молекул Т-клеток (темная линия) по сравнению с соответствующим изотипом (закрашено серым цветом). (Фиг. 5C) Данные цитометрии для экспрессии MCHI и MHCII (темные линии; передние четыре линии) по сравнению с соответствующим изотипом (затененные; задние четыре линии). На Фиг. 5C каждая линия из окрашенных от передней до задней представляет собой CD103⁺ DC2, CD11b⁺ DC1, F4/80⁺ TAM1 и F4/80⁺ TAM2, соответственно. На Фиг. 5C каждая линия из затененных от передней до задней представляет собой CD103⁺ DC2, CD11b⁺ DC1, F4/80⁺ TAM1 и F4/80⁺ TAM2, соответственно. (Фиг. 5D) Данные цитометрии поглощения декстрана *ex vivo* среди популяций. Серый цвет=без декстрана, светлая гистограмма=связывание декстрана при 4°C и поглощение декстрана при 37°C=темная гистограмма, изображены в трех повторах. Изменение среднего геометрического значения интенсивности флуоресценции (gMFI) для каждой популяции, отмеченной в виде среднего значения \pm SEM. Данные являются репрезентативными для 2 независимых экспериментов (n=6). (Фиг. 5E) Цитометрический анализ относительного значения рН эндоцитозных компартментов среди популяций. Опухолевые клетки B78 трансфицированы конструкциями для измерения соотношений рН, N1-mCherry-pHluorin. Белок pHluorin – чувствительное к рН производное GFP (зеленого флуоресцентного белка), гасящее флуоресценцию при кислотном рН. Репрезентативные гистограммы показывают флуоресценцию pHluorin в клетках mCherry⁺, где меньшая величина для pH-GFP представляет более кислотную среду. Серые гистограммы представляют собой соответствующие популяции из не экспрессирующей pHluorin контрольной опухоли (исходная B78). Данные суммированы в виде соотношения значений gMFI между флуоресценцией GFP и mCherry. Данные представлены в виде среднего значения соотношения \pm SEM, объединенного для 3 независимых

экспериментов. (Фиг. 5F) Внутриклеточное окрашивание в популяциях цитокина ИЛ12. % от клеток ИЛ12⁺, количественно определенное в каждой популяции, данные объединены для 2 независимых экспериментов, (n=3), отмечены в виде среднего значения ±SEM. Статистическая значимость указана как *p<0,05. На Фиг. 5F каждая линия от передней до задней представляет собой CD103⁺ DC2, CD11b⁺ DC1, F4/80⁺ TAM1 и F4/80⁺ TAM2, соответственно. (Фиг. 5G) Уровни транскриптов, измеренные методом кПЦР для транскриптов цитокинов *Ил12b* и *Ил10*. Данные представлены в виде среднего значения ΔCt ±SEM, рассчитанного из биологических анализов в трех повторах (n=3) для отдельных опухолей (N. D. – не выявлено).

[0055] Фиг. 6. CD103⁺ DC являются самыми лучшими стимуляторами Т-клеток для наивных и активированных Т-клеток CD8⁺. Все данные (Фиг. 6A-G) получены на эктопической модели опухоли B78chOVA. Т-клетки+KMDC (затененные серым цветом; в большинстве случаев последние), Т-клетки+KMDC+ SL8 (незатененные серым цветом; в большинстве случаев предпоследние), Т-клетки+опухолевые APC (соответствующие цветные гистограммы). На планшеты помещены 20000 Т-клеток:соотношение APC 4000. Репрезентативные графики проточных анализов для 4 независимых экспериментов, если не отмечено иное. (Фиг. 6A) Результаты проточной цитометрии маркеров ранней активации, *Nur77* и CD69 (12 ч) на наивных или предварительно активированных Т-клетках OT-I CD8⁺, культивированных на отсортированных популяциях APC, полученных непосредственно из опухолей. На Фиг. 6A каждая линия от передней до задней представляет собой F4/80⁺ TAM2, F4/80⁺ TAM1, CD11b⁺ DC1 и CD103⁺ DC2, соответственно. (Фиг. 6B) Репрезентативные результаты цитометрии пролиферации наивных Т-клеток OT-I CD8⁺ измеренные разведением красителя eFluor670, отмеченные против *Nur77* (как измерено стимуляцией TCR) через 72 часа после совместного культивирования с популяцией опухолевых APC. Выше на графиках перечислены значения общего выхода клеток. (Фиг. 6C) Гистограмма охватывает данные по пролиферации наивных Т-клеток среди опухолевых APC. На Фиг. 6C каждая линия от первой до последней представляет собой F4/80⁺ TAM1, F4/80⁺ TAM2, CD11b⁺ DC1 и CD103⁺ DC2, соответственно. (Фиг. 6D) Репрезентативные результаты цитометрии пролиферации Т-клеток, измеренные разведением красителя eFluor670, отмеченные против *Nur77* через 72 часа для предварительно активированных Т-клеточных предшественников OT-I CD8⁺, культивированных на популяциях опухолевых APC. Выше на графиках перечислены значения общего выхода клеток. (Фиг. 6E) Гистограмма охватывает пролиферацию предварительно активированных Т-клеток OT-I CD8⁺ среди опухолевых APC. На Фиг. 6E каждая линия от передней до задней представляет собой F4/80⁺ TAM1, F4/80⁺ TAM2, CD11b⁺ DC1 и CD103⁺ DC2, соответственно. (Фиг. 6F) Репрезентативные результаты цитометрии пролиферации Т-клеток, измеренные разведением красителя eFluor670 через 72 часа для наивных Т-клеток OT-II CD4⁺, культивированных на популяциях опухолевых APC. Репрезентативные графики проточных анализов для 2 независимых экспериментов.

(Фиг. 6G) Гистограмма охватывает пролиферацию наивных Т-клеток OT-II CD4⁺ среди опухолевых APC. На Фиг. 6G каждая линия от передней до задней представляет собой F4/80+ TAM1, F4/80+ TAM2, CD11b+ DC1 и CD103+ DC2, соответственно.

[0056] Фиг. 7. На прижизненных изображениях и срезах выявлены CD11b⁺DC1 и CD103⁺DC2, которые рассеяны возле границ опухолей, но при этом могут взаимодействовать с Т-клетками, которые там присутствуют. (Фиг. 7A) Количественное определение проксимального/дистального расположения APC внутри опухоли. Данные объединены для 4 независимых анализов с визуализацией, представленных в виде среднего значения \pm SEM. На Фиг. 7A столбцы для каждой группы слева направо: TAM2, TAM1 и DC1/2, соответственно. (Фиг. 7B) Наблюдали контакты APC-Т-клеток *in vivo* в виде % от общего количества соединений Т-клеток. Накопленные данные 4 различных положений, в виде изображений, полученных в течение 30 минут в 2 независимых прижизненных 2-фотонных анализах с визуализацией. Контакты подсчитывали вручную путем подсчета физического контакта, установленного между Т-клетками и красными, желтыми и зелеными APC. Расположение столбца представляет APC контакта (вверху: CD103⁺, CD11b⁺ DC1, внизу: TAM1, посередине: TAM2). (Фиг. 7C) Анализ связывания Т-клеток *ex vivo*, положительно отобранных по CD45⁺ клеток из дезагрегированной опухоли, с предварительно активированными Т-клетками OT-I CD8⁺. Данные рассчитывали в виде % соединений Т-клеток в пределах каждой из популяций (слева) и как общий % от соединений Т-клеток (справа). Данные объединены из 2 независимых экспериментов, отмечены в виде среднего значения \pm SEM. На Фиг. 7C каждый столбец каждой группы слева направо представляет собой: DC2, DC1, TAM1 и TAM2, соответственно.

[0057] Фиг. 8. Для эффективной адоптивной терапии CTL требуется редкая популяция CD103⁺ DC2 в опухоли. (Фиг. 8A) Кривая роста опухоли, построенная как изменение площади опухоли (мм²) с течением времени для EG7. 1 у хозяев zDC-DTR. Стрелками указано время в. б. введения D. Т. /ФСБ и в. в. переноса 5×10^6 предварительно активированных Т-клеток OT-I CD8⁺, соответственно, на сутки 4 и 5. Впоследствии DT/ФСБ вводили каждые 3^{-и} сутки, а FTY-720/солевой раствор впоследствии вводили через сутки в течение всего времени лечения. Светло-серой штриховой линией (вверху) показан рост EG7. 1 у хозяина zDC-DTR без переноса Т-клеток. Регрессия EG7. 1 при переносе активированных Т-клеток CD8⁺ и лечение FTY-720 (черная линия; внизу) или с дополнительным DT-опосредованным истощением DC (темно-серая линия; посередине). Репрезентативные данные представлены в виде средней площади опухоли \pm SEM (n=4) из 2 независимых экспериментов. Статистическая значимость указана как *p<0,05. (Фиг. 8B) Сравнение прогностического значения соотношения CD103⁺/CD103⁻ сигналов генов по сравнению с отдельными генами (либо CD103⁺ специфическими, зеленый цвет, либо TAM1/TAM2/Cd11b DC1 специфическими генами, красный цвет)

для образцов TCGA, полученных от людей, в многовариантном анализе выживаемости с пропорциональными рисками по Коксу, с корректировкой на тип ракового заболевания как коварианту. Данные выражены как отношение рисков (HR) с 95 % доверительными интервалами, где значение <1 означает увеличенную общую выживаемость (ОВ); >1 означает сниженную ОВ для генов с p -значениями $<0,05$ для ВН. (Фиг. 8С) Сравнение прогностического значения соотношения CD103⁺/CD103⁻ сигнала генов по сравнению с некоторыми опубликованными прогностическими сигнатурами генов для образцов TCGA, полученных от людей, в многовариантном анализе выживаемости с пропорциональными рисками по Коксу, с корректировкой на тип ракового заболевания как коварианту. Данные выражены как отношение рисков (HR) с 95 % доверительными интервалами, где значение <1 означает увеличенную общую выживаемость (ОВ); >1 означает сниженную ОВ для генов с p -значениями $<0,05$ для ВН. (Фиг. 8D) График К-М среди всех 12 раковых заболеваний в наборе данных TCGA человека с корректировкой на тип ракового заболевания. Данные разбиты на ВЫСОКОЕ соотношение генов CD103⁺/CD103⁻ (черный цвет, $n=1801$) и НИЗКОЕ соотношение экспрессоров CD103⁺/CD103⁻ (серый цвет, $n=1801$) с p -значением = $1,76e-07$. (Фиг. 8E) График К-М для общей выживаемости пациентов с раком молочной железы в наборе данных TCGA. Данные разбиты на ВЫСОКОЕ соотношение генов CD103⁺/CD103⁻ (черный цвет, $n=422$) и НИЗКОЕ соотношение экспрессоров CD103⁺/CD103⁻ (серый цвет, $n=423$) с p -значением = $0,0255$. (Фиг. 8F) График К-М для общей выживаемости пациентов с плоскоклеточной карциномой головы и шеи в наборе данных TCGA. Данные разбиты на ВЫСОКОЕ соотношение генов CD103⁺/CD103⁻ (черный цвет, $n=151$) и НИЗКОЕ соотношение экспрессоров CD103⁺/CD103⁻ (серый цвет, $n=152$) с p -значением = $0,000207$. (Фиг. 8G) График К-М для общей выживаемости пациентов с раком аденокарциномой легкого в наборе данных TCGA. Данные разбиты на ВЫСОКОЕ соотношение генов CD103⁺/CD103⁻ (черный цвет, $n=177$) и НИЗКОЕ соотношение экспрессоров CD103⁺/CD103⁻ (серый цвет, $n=178$) с p -значением = $0,000874$.

[0058] Фиг. 9. Транскрипционный избыток ассоциаций генов CD103⁺ и VDCA3⁺ с увеличенной пострецидивной выживаемостью при метастатической меланоме. (Фиг. 9A) Сравнение прогностического значения для генов CD103⁺, соотношения CD103^{+/+} и отдельных генов с использованием набора данных для метастатической меланомы в анализе выживаемости с пропорциональными рисками по Коксу. Данные выражены как отношение рисков (HR) с 95 % доверительными интервалами, где значение <1 означает увеличенную общую выживаемость (ОВ) с момента метастазирования (пострецидивная выживаемость), а >1 означает сниженную ОВ с момента метастазирования ВН-корректированными p -значениями $<0,05$. (Фиг. 9B) График Каплана-Мейера для пострецидивной выживаемости пациентов с метастатической миеломой для перечня экспрессии генов CD103⁺. Данные разбиты на «высокую» (светло-серый цвет; верхняя линия каждого графика) и

«низкую» (черный цвет; нижняя линия для каждого графика) категории при строгих пороговых значениях 33 %, 50 % и 66 % для уровней экспрессии генов CD103⁺. (Фиг. 9C) График Каплана-Мейера для пострецидивной выживаемости пациентов с метастатической миеломой для соотношения экспрессии генов CD103^{+/−}. Данные разбиты на «высокую» (светло-серый цвет; верхняя линия каждого графика) и «низкую» (черный цвет; нижняя линия для каждого графика) категории при строгих пороговых значениях 33 %, 50 % и 66 % для уровней экспрессии соотношения генов CD103^{+/−}. (Фиг. 9D-E) Измерения основанные на определении класса категории TIL и Фиг. 9F-G с гистологическими измерениями перипухолевых количеств Т-клеток CD3⁺ из {Bogunovic et al, 2009} отмечали по сравнению с сигнатурой гена SDC (Фиг. 9D,F) и соотношения SDC/NSM (Фиг. 9E,G).

[0059] Фиг. 10. Количественное определение методом проточной цитометрии опухоль-инфильтрирующих популяций APC в метастатической миеломе человека. (Фиг. 10A) Таблица данных для биоптатов пациентов с метастатической миеломой человека. В таблице для каждого пациента указан идентификатор пациента, возраст, пол и локализация биоптата опухоли, а также предварительное лечение (если известно). Все перечисленные пациенты получали иммунотерапию антителом против PD-1 в UCSF. Предыдущая история лечения закодирована как не получавшие лечения, 0, или лечившиеся, 1. ** указывает на быстрое прогрессирование, которое устранялось дополнительными сканированиями. (Фиг. 10B) Репрезентативные данные для стратегии распределения гейтов проточной цитометрии для метастатических меланом человека для определения опухоль-инфильтрирующих миелоидных субпопуляций. Данные являются репрезентативными для пациента со значительной популяцией BDCA3⁺ и BDCA1⁺ DC, разделенной на гейты по синглетам и живым клеткам. (pDC, CD14⁺ TAM, BDCA1⁺ DC, BDCA3⁺, CD14- TAM). (Фиг. 10C) Репрезентативные данные для стратегии распределения гейтов проточной цитометрии для метастатических меланом человека для определения опухоль-инфильтрирующих миелоидных субпопуляций. Данные являются репрезентативными для пациента без значительной популяции BDCA3⁺ DC, разделенной на гейты по синглетам и живым клеткам (pDC, CD14⁺, BDCA1⁺ DC, BDCA3⁺ DC, CD14- TAM). (Фиг. 10D) Частоты встречаемости клеток CD45⁺ (черный цвет; левый столбец каждой группы) и HLA-DR⁺ (серый цвет; правый столбец каждой группы) в виде процента от общего количества жизнеспособных клеток среди биоптатов пациентов. (Фиг. 10E) Частоты встречаемости опухоль-инфильтрирующих иммунных популяций среди биоптатов пациентов при определении стратегией распределения гейтов. Данные представлены как частота встречаемости от общего количества клеток CD45⁺, среднего значения ± S. E. M. среди пациентов. pDC, CD14⁺ TAM, BDCA1⁺ DC, BDCA3⁺ DC, CD14- TAM, маркеры линии дифференцировки (CD3e, CD56, CD19).

[0060] Фиг. 11. Избыток клеток $BDCA3^+$ DC в опухоли меланомы человека, предсказанный по восприимчивости на антитело против PD1. Пациентов разделяли на категории либо отвечающие на лечение (серый цвет, включая частичные или полные ответы), либо не отвечающие на лечение (черный цвет, включая стабильное заболевание и прогрессирующее заболевание). (Фиг. 11А) Каскадная диаграмма процентного содержания клеток $CD45^+$ от общего количества живых клеток у отдельных пациентов, разделенных на отвечающие и не отвечающие на лечение. (Фиг. 11В) Количественное определение частоты встречаемости отвечающих (серый цвет) и не отвечающих (черный цвет) на лечение для процентного содержания клеток $CD45^+$ от общего количества живых клеток в опухоли. Данные объединены среди пациентов и представлены как среднее значение \pm S. E. M., n. s. = незначимое значение. (С) Каскадная диаграмма процентного содержания клеток $BDCA3^+$ DC в опухоли от общего количества клеток $CD45^+$ у отдельных пациентов, разделенных на отвечающие и не отвечающие на лечение. (Фиг. 11D) Количественное определение частоты встречаемости отвечающих (серый цвет) и не отвечающих (черный цвет) на лечение для процентного содержания клеток $BDCA3^+$ DC от общего количества клеток $CD45^+$ в опухолях. Данные объединены среди пациентов и представлены как среднее значение \pm S. E. M., **p=0,0056. (Фиг. 11E) Диаграмма рассеяния частот встречаемости $BDCA3^+$ DC и $CD14^+$ TAM в виде пропорции от общего количества клеток $HLA-DR^+$ в опухоли, отвечающие на лечение показаны незакрашенными кружками, а не отвечающие на лечение показаны закрашенными кружками. (Фиг. 11F) Диаграмма рассеяния частот встречаемости $BDCA3^+$ DC и $BDCA1^+$ DC в виде пропорции от общего количества клеток $HLA-DR^+$ в опухоли, отвечающие на лечение показаны незакрашенными кружками, а не отвечающие на лечение показаны закрашенными кружками. (Фиг. 11G) Диаграмма рассеяния частот встречаемости $BDCA3^+$ DC и $CD14^+$ TAM в виде пропорции от общего количества клеток $HLA-DR^+$ в опухоли, отвечающие на лечение показаны незакрашенными кружками, а не отвечающие на лечение показаны закрашенными кружками.

[0061] Фиг. 12. Требования к $CD103^+$ DC для эффективности применения антитела против PD1 в мышинной модели меланомы. (Фиг. 12А) Схема использования мышинной и опухолевой модели при комбинированном режиме иммунотерапевтического лечения. (Фиг. 12В) Площадь опухоли (mm^2) отдельных опухолей B78chOVA у контрольных мышей B6 (самый левый график), получавших 100 мкг контрольного IgG армянского хомяка и 100 мкг контрольного IgG2a крысы в. б. на сутки 5, 8 и 11 роста опухолей. Данные объединены из 2 независимых экспериментов, n=8. (Фиг. 12С) Площадь опухоли (mm^2) отдельных опухолей B78chOVA у химерных мышей *Zbtb46-DTR* KM (средний график), получавших 100 мкг антитела против CTLA-4 и 100 мкг антитела против PD-1 на сутки 5, 8 и 11 роста опухолей с инъекцией ФСБ на сутки 4, 7 и 10. Данные объединены из 2 независимых экспериментов, n=8. (Фиг. 12D) Площадь опухоли (mm^2) отдельных опухолей B78chOVA у химерных мышей *Zbtb46-*

DTR KM (самый правый график), получавших 100 мкг антитела против CTLA-4 и 100 мкг антитела против PD-1 на сутки 5, 8 и 11 роста опухолей с инъекцией DT на сутки 4, 7 и 10. Данные объединены из 2 независимых экспериментов, n=8.

[0062] На **Фиг. 13** показано, что прогрессивным распределением по гейтам идентифицированы как популяция NSM, так и популяции SDC, во всех отображенных типах опухолей человека, проанализированных методом проточной цитометрии (метастатическая меланома, плоскоклеточная карцинома головы и шеи (ПКГШ) и карцинома толстой кишки).

[0063] На **Фиг. 14** показано нанесение метки для субпопуляций указанных клеток в микроокружении опухоли различными маркерами NSM, включая TREM2, среди моделей эктопических мышечных опухолей B16-F10 и MC38, а также окрашивания MS467, LILRB4 и CD88, проанализированных методом проточной цитометрии. Шаблоны окрашивания для всех маркеров NSM выявляют высокую специфичность для популяции NSM (TAM, Ly6C+ моноциты, CD11b+ DC) без окрашивания SDC (CD103+ DC). Популяции предварительно распределенные по гейтам согласно стратегии распределения гейтов как на **Фиг. 1A, B**. Вторичный контроль каждой популяции представлен в виде затенения серым цветом, тогда как окрашивание маркеров NSM для каждой популяции наложено сплошной черной гистограммой.

[0064] На **Фиг. 15** показана экспрессия CCR7 на SDC человека. Популяции предварительно распределенные по гейтам согласно стратегии распределения гейтов на **Фиг. 13**.

[0065] На **Фиг. 16** показана специфическая экспрессия продуктов генов SDC, CCR7 и XCR1 на SDC (CD103+ DC) и недостаток экспрессии белка SDC на NSM (TAM, Ly6C+ моноциты, CD11b+ DC) в микроокружении опухоли эктопических опухолей B16-F10 мышей. Популяции предварительно распределенные по гейтам согласно стратегии распределения гейтов как на **Фиг. 1A, B**. Вторичный контроль каждой популяции представлен в виде затенения серым цветом, тогда как окрашивание маркеров SDC для каждой популяции наложено сплошной черной гистограммой.

[0066] На **Фиг. 17** показано отсутствие окрашивания маркеров NSM, MS4A7 и TREM2 в здоровых тканях KM и селезенки самцов мышей дикого типа C57BL/6, проанализированное методом проточной цитометрии. Популяции предварительно распределенные по гейтам согласно стратегии распределения гейтов как на **Фиг. 1A, B**. Вторичный контроль каждой популяции представлен в виде затенения серым цветом, тогда как окрашивание MS4A7 и TREM2 для каждой популяции (верхняя фигура) наложено сплошной черной гистограммой. На нижней половине фигуры показано отсутствие специфического

окрашивания в здоровой ткани КМ и селезенки мышей титрованными концентрациями (0 нМ, 2 нМ, 20 нМ и 200 нМ) клонов антител TREM2 2, 5 и 7 среди иммунных популяций.

[0067] На **Фиг. 18** показано, что антитела против TREM2 и против LILRB4 специфически истощают несущие, соответственно, TREM2 и LILRB4 клетки *in vivo*. Контрольные и экспрессирующие TREM2 или LILRB4 клетки-трансфектанты EL4 смешивали в соотношении 1:1 и инъецировали ВБ самцам мышей WT В6. Через три часа животным инъецировали антитело (против TREM2 или против LILRB4) или контрольный IgG1 человека или ФСБ. Через 36 часов мышей умерщвляли и выделенные из брюшной полости клетки, собранные путем перитонеального смыва, подсчитывали методом проточной цитометрии.

[0068] На **Фиг. 19** указано, что антитела против NSM снижают рост опухолей относительно контроля в такой же степени, что и терапия с антителом против PD-1. Карциномы толстой кишки MC38 инъецировали самцам мышей В6 возрастом 6 недель. Мышей, рандомизированно распределенных в группы лечения, лечили указанными антителами на сутки 5, 7, 11, 15 путем ВБ инъекции. Данные показаны в виде 75 % ранга (отбрасывая наибольшее выпадающее значение и отображая меньшие данные 3 из 4 мышей). Дозировка: были проведены инъекции 200 мкг/сутки PD-1 и контроля Fc, 40 мкг, 20 мкг, 20 мкг и 40 мкг антитела против P1. 2 (aTREM2) на сутки 5, 7, 11 и 15. Опухоли измеряли штангенциркулем и показан объем опухолей.

[0069] На **Фиг. 20** показан анализ соотношений истинных к ложным обнаружениям сигналов (ROC) BDCA3⁺ в меланоме человека. Данные окрашивания для %BDCA3 и исхода лечения антителом против PD1 использовали для выполнения (**Фиг. 20А**) ROC-анализа BDCA3⁺ по сравнению с соотношением CD45⁺ по сравнению с исходом, и (**Фиг. 20В**) ROC-анализа BDCA3⁺ по сравнению с соотношением HLA-DR⁺ по сравнению с исходом.

[0070] На **Фиг. 21** продемонстрирована ограниченная экспрессия белка TREM2 относительно популяций NSM (CD14⁺ TAM) с небольшой или отсутствием экспрессии на CD14-отрицательных CD11c-положительных клетках, которые включают SDC (BDCA3⁺ DC) в ткани первичной опухоли ПКГШ человека. Окрашивание TREM2-специфического коммерческого антитела (RnD, клон 237920) выполняли на дезагрегированной опухолевой ткани ПКГШ человека по сравнению с вторичным контролем окрашивания (антитело IgG крысы, Jackson ImmunoResearch) и анализировали методом проточной цитометрии. На данной фигуре показана специфическая экспрессия продуктов генов NSM на клетках NSM и недостаток экспрессии на клетках SDC в опухолевой ткани человека. Популяции разделяли на гейты на живые, CD45⁺, отрицательную линию дифференцировки, HLA-DR⁺, CD11c⁺ и разбивали по экспрессии CD14.

[0071] Эти и другие аспекты и преимущества данного изобретения станут очевидными из следующего подробного описания и формулы изобретения. Должно быть понятно, что одно, несколько или все из свойств различных вариантов реализации изобретения, описанных в данном документе, могут комбинироваться с образованием других вариантов реализации по данному изобретению.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0072] Для целей пояснения в этом описании будут использоваться следующие определения и там, где это уместно, использованные в единственном числе термины также будут включать в себя множественное число и наоборот. В том случае, когда любое определение, представленное ниже, вступает в конфликт с любым документом, вводимым в данное описание посредством ссылки, представленное определение будет главным.

[0073] Следует понимать, что аспекты и варианты реализации изобретения, описанные в данном документе, включают аспекты и варианты реализации изобретения, определяемые терминами «содержащие», «состоящие из» и/или «состоящие по существу из».

[0074] Касательно всех композиций, описанных в данном документе, и всех способов с использованием композиции, описанной в данном документе, композиции могут либо содержать перечисленные компоненты или этапы, либо могут «состоять по существу из» перечисленных компонентов или этапов. Когда композиция описана как «состоящая по существу из» перечисленных компонентов, то данная композиция содержит перечисленные компоненты и может содержать другие компоненты, которые практически не влияют на патологическое состояние, требующее лечения, но не содержит любые другие компоненты, которые практически влияют на патологическое состояние, требующее лечения, отличающиеся от явным образом перечисленных компонентов; или если композиция не содержит дополнительных компонентов, отличающихся от перечисленных, которые практически влияют на патологическое состояние, требующее лечения, то композиция не содержит достаточную концентрацию или количество дополнительных компонентов для практического влияния на патологическое состояние, требующее лечения. Когда способ описан как «включающий по существу» перечисленные этапы, то данный способ содержит перечисленные этапы и может содержать другие этапы, которые практически не влияют на патологическое состояние, требующее лечения, но данный способ не содержит любые другие этапы, которые практически влияют на патологическое состояние, требующее лечения, отличающиеся от явным образом перечисленных этапов. В качестве неограничивающего конкретного примера, когда композиция описана как «состоящая по существу из» компонента, то данная композиция может дополнительно содержать любые количества

фармацевтически приемлемых носителей, плацебо или разбавителей и других таких компонентов, которые практически не влияют на патологическое состояние, требующее лечения.

[0075] Термин «необязательно» при последовательном использовании означает включение от одной до всех пронумерованных комбинаций и подразумевает все подкомбинации.

[0076] «Эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество», как используется в данном документе, относится к количеству терапевтического соединения, такого как антигенсвязывающее средство против NSM или антитело против NSM, вводимое индивиду либо в виде однократной дозы, либо в виде части серии доз, которая является эффективной для создания или содействия требуемому терапевтическому эффекту либо самостоятельно, либо в комбинации с другим терапевтическим воздействием. Примерами требуемого терапевтического эффекта являются усиление иммунного ответа, замедление или задержка развития опухоли; стабилизация заболевания; облегчение одного или более симптомов. Эффективное количество может даваться в одной или более дозировок.

[0077] Термин «лечение», как используется в данном документе, относится к замедлению или реверсии прогрессирования патологического состояния, такого как рак. Термин «лечение», как используется в данном документе, относится к действию по лечению патологического состояния, такого как рак.

[0078] «Индивид» или «субъект», как используется в данном документе, относится к любому животному, относящемуся к классу млекопитающих, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также зоопарковых животных, животных для участия в спортивных мероприятиях или домашних любимцев, таких как собаки, лошади, кролики, крупный рогатый скот, свиньи, хомяки, песчанки, мыши, хорьки, крысы, кошки и тому подобные. В некоторых вариантах реализации изобретения индивид является человеком. В некоторых вариантах реализации индивид представляет собой мышь.

[0079] Термин «около», как используется в данном документе, относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известному специалисту в данной области техники. В данном документе ссылка на «около» в отношении значения или параметра включает (и описывает) варианты реализаций изобретения, которые касаются данного значения или параметра по сути.

[0080] Следует отметить, что при использовании в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, единственное число включает ссылку на множественное число, если из контекста очевидно не следует иное.

[0081] В отношении любой из структурных и функциональных характеристик, описанных в данном документе, способы определения этих характеристик известны в данной области техники.

Нестимулирующие миелоидные клетки (NSM)

[0082] Предложенные в данном документе способы и композиции для блокирования и/или выявления нестимулирующих миелоидных клеток (NSM) включают применение антитела против NSM. В данном документе также предложены способы и композиции для нацеливания и/или выявления нестимулирующих миелоидных клеток, экспрессирующих белок NSM.

[0083] В данном документе также предложены способы и композиции для блокирования и/или выявления нестимулирующих миелоидных клеток, включающие использование антитела, направленного на нечеловеческий гомолог белка NSM человека в организме индивида, не являющегося человеком.

[0084] Как используется в данном документе, нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой миелоидные клетки, которые не являются достаточно эффективными при стимулировании иммунного ответа (например, не так эффективны при стимулировании противоопухолевого ответа в микроокружении опухоли по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками). В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки не так эффективны при презентировании антигена (например опухолевого антигена) Т-клеткам или не так эффективны при стимулировании опухолеспецифических реакций Т-клеток по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки могут отображать уменьшенную способность к поглощению, процессированию и/или презентации опухолеассоциированных антигенов Т-клеткам по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками. Нестимулирующие миелоидные клетки могут обладать сниженной способностью или не обладать способностью к повторному праймингу цитотоксических Т-лимфоцитов или в некоторых случаях не могут стимулировать эффективное уничтожение опухолевых клеток. Нестимулирующие миелоидные клетки могут отображать более низкую экспрессию генов и маркеров клеточной поверхности, задействованных в процессинге антигенов, презентации антигенов и/или коstimуляции антигенов, включая, без ограничения, CD80, CD86, МНСI и МНСII, по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками.

[0085] Нестимулирующие миелоидные клетки, при сравнении со стимулирующими миелоидными клетками, могут отображать более низкую экспрессию генов, ассоциированных с перекрестной презентацией, коstimуляцией и/или стимулирующими цитокинами, включающими, без ограничения,

любой один или более из TAP1, TAP2, PSMB8, PSMB9, TAPBP, PSME2, CD24a, CD274, BTLA, CD40, CD244, ICOSL, ICAM1, TIM3, PDL2, RANK, FLT3, CSF2RB, CSF2RB2, CSF2RA, ИЛ12b, XCR1, CCR7, CCR2, CCL22, CXCL9 и CCL5, и увеличенной экспрессией противовоспалительного цитокина ИЛ-10. В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки являются зависимыми от фактора транскрипции IRF4 и цитокинов GM-CSF или CSF-1 в отношении дифференцировки и выживаемости. В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки могут способствовать опухолевому ангиогенезу путем секретирования фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС) и синтазы оксида азота (NOS) и поддержки опухолевого роста путем секретирования эпидермального фактора роста (ЭФР).

[0086] В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой опухолеассоциированные макрофаги (TAM) или дендритные клетки (DC). В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки не представляют собой дендритные клетки (DC).

[0087] В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой опухолеассоциированные макрофаги (TAM). TAM являются макрофагами, присутствующими возле или внутри злокачественной опухоли, и они происходят из циркулирующих моноцитов или резидентных тканевых макрофагов.

[0088] В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки различают на основе маркеров, которые они экспрессируют, или маркеров, которые они избирательно экспрессируют. Экспрессия маркеров клеточной поверхности может быть описана как «+» или «положительная». Отсутствие маркеров клеточной поверхности может быть описано как «-» или «отрицательное». Экспрессия маркеров клеточной поверхности может быть дополнительно описана как «высокая» (клетки, экспрессирующие высокие уровни маркеров) или «низкая» (клетки, экспрессирующие низкие уровни маркеров), что указывает на относительную экспрессию каждого маркера на клеточной поверхности. Уровень маркеров можно определять с помощью различных методов, известных в данной области техники, например иммуно-окрашивания и анализа FACS или гель-электрофореза и Вестерн-блоттинга.

[0089] В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой дендритные клетки (DC). В некоторых вариантах реализации изобретения дендритные клетки можно различать по их остроконечной или дендритной морфологии. В одном варианте реализации изобретения нестимулирующая дендритная клетка представляет собой по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14-, CD11c+ и BDCA1+ (также называемая клеткой DC1). В одном

варианте реализации изобретения нестимулирующая дендритная клетка не представляет собой CD45+, HLA-DR+, CD14-, CD11c+ и BDCA3+ (также называемая клеткой DC2). В одном варианте реализации изобретения дендритная клетка, которая является CD45+, HLA-DR+, CD14-, CD11c+ и BDCA3+, представляет собой стимулирующую миелоидную клетку.

[0090] В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой опухолеассоциированные макрофаги. В некоторых вариантах реализации изобретения, например, у людей, нестимулирующие опухолеассоциированные макрофаги являются по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+. В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие опухолеассоциированные макрофаги являются по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, CD11b+. В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие опухолеассоциированные макрофаги являются по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, CD11c+. В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие опухолеассоциированные макрофаги являются по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, BDCA3-. В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие опухолеассоциированные макрофаги являются по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, BDCA3-, CD11b+. В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие опухолеассоциированные макрофаги являются по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, BDCA3-, CD11c+. В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие опухолеассоциированные макрофаги являются по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, CD11b+ и CD11c+. В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие опухолеассоциированные макрофаги являются по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, BDCA3-, CD11b+ и CD11c+.

[0091] В некоторых вариантах реализации изобретения способы и композиции по данному изобретению пригодны для нацеливания TAM и DC у других млекопитающих, например у мышей. В таких вариантах реализации изобретения мышинные TAM и DC приводят в контакт с антителом к NSM. В одном варианте реализации изобретения, например у мышей, опухолеассоциированный макрофаг представляет собой по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, CD11b^{высокий} и CD11c^{низкий} (также называется TAM1). В одном варианте реализации изобретения, например у мышей, опухолеассоциированные макрофаги представляют собой по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, CD11b^{низкий} и CD11c^{высокий} (также называются TAM2). Термин «макрофаг CD11b^{высокий}», как используется в данном документе, относится к макрофагам, экспрессирующим высокие уровни CD11b. Термин «макрофаг CD11b^{низкий}», как используется в данном документе, относится к макрофагам, которые экспрессируют на своей поверхности уровень CD11b, который практически ниже, чем уровень у макрофагов CD11b^{высокий}. Термин «CD11c^{высокий}», как используется в данном документе, относится к макрофагам, экспрессирующим высокие уровни CD11c. Термин «макрофаг CD11c^{низкий}», как

используется в данном документе, относится к макрофагам, которые экспрессируют на своей поверхности уровень CD11c, который практически ниже, чем уровень у макрофагов Cd11c^{высокий}.

[0092] В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки по данному изобретению включают одну или более из клеток TAM и DC1.

[0093] В некоторых вариантах реализации изобретения, например у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки по данному изобретению включают одну или более из клеток TAM1, TAM2 и DC1. В таких вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки по данному изобретению приводят в контакт с антителом к NSM.

[0094] В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки локализованы внутри границ опухолевых очагов поражения или в трансформированных опухолевых протоках, где они приводятся в контакт с когнатными Т-клетками. В одном варианте реализации изобретения локализацию нестимулирующих миелоидных клеток модифицируют таким образом, чтобы клетки больше не локализовались внутри опухолей или больше не входили в контакт с Т-клетками.

[0095] В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, содержащей стимулирующие миелоидные клетки и нестимулирующие миелоидные клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, содержащей только нестимулирующие миелоидные клетки. Популяции иммунных клеток по данному изобретению могут быть чистыми, гомогенными, гетерогенными, происходящими из разнообразных источников (например, пораженной ткани, опухолевой ткани, здоровой ткани, банков клеток), поддерживаемые в первичных клеточных культурах, поддерживаемые в иммортализованных культурах и/или поддерживаемые в культурах *ex vivo*.

[0096] В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой опухолеассоциированные макрофаги.

[0097] В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой дендритные клетки.

[0098] В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺ и BDCA1⁺. В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки содержат клетки, которые являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻,

вариантах реализации изобретения, например у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки состоят по существу из клеток, которые являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b^{высокий} и CD11c^{низкий}. В таких вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки мышей приводят в контакт с антителом к NSM.

[00108] В некоторых вариантах реализации изобретения, например у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b^{низкий} и CD11c^{высокий}. В некоторых вариантах реализации изобретения, например у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки содержат клетки, которые являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b^{низкий} и CD11c^{высокий}. В некоторых вариантах реализации изобретения, например у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки состоят из клеток, которые являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b^{низкий} и CD11c^{высокий}. В некоторых вариантах реализации изобретения, например у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки состоят по существу из клеток, которые являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b^{низкий} и CD11c^{высокий}. В таких вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки мышей приводят в контакт с антителом к NSM.

[00109] В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки находятся в раковой ткани.

[00110] В некоторых вариантах реализации изобретения популяция иммунных клеток находится в раковой ткани.

[00111] В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки находятся в раковой ткани.

[00112] В некоторых вариантах реализации изобретения биологический образец содержит популяцию иммунных клеток, содержащую нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки.

[00113] Клетки NSM могут совокупно относиться к клеткам DC1, TAM1 и TAM2, присутствующим в опухолевых тканях, и которые могут отличаться от других типов клеток по их экспрессии маркеров клеток NSM. Например, гены и ассоциированные белки, которые экспрессируются или транслируются в большем избытке в клетках NSM, чем SDC, могут функционировать как маркеры NSM. Типовой маркер NSM представляет собой CD11b. Дополнительные типовые маркеры NSM перечислены в таблице А. Клетки NSM могут экспрессировать на своей клеточной поверхности TREM2, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK и TMEM119. В

некоторых аспектах изобретения клетки NSM не экспрессируют по меньшей мере один из KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, CLEC9A, BDCA3 и XCR1.

[00114] В одном варианте реализации изобретения клетки NSM представляют собой опухолеинфильтрирующие миелоидные клетки, которые экспрессируют один или более маркерных генов NSM, перечисленных в таблице А. В другом варианте реализации изобретения клетки NSM представляют собой опухолевые миелоидные клетки, которые экспрессируют три или более маркеров NSM, перечисленных в таблице А. В другом варианте реализации изобретения клетки NSM представляют собой опухолевые миелоидные клетки, которые экспрессируют большинство или все маркеры NSM, перечисленные в таблице А. В другом варианте реализации изобретения клетки NSM идентифицируют как опухолевые миелоидные клетки, экспрессирующие MRC1, MS4A7, C1QC, APO E, C1QB, C1QA и C5AR1.

ТАБЛИЦА А	
Маркеры SDC	Маркеры NSM

KIT	C5AR1
CCR7	LYVE1
BATF3	ABCC3
FLT3	MRC1
ZBTB46	SIGLEC1
IRF8	STAB1
BTLA	C1QB
MYCL1	C1QA
CLEC9A	TMEM37
BDCA3	MERTK
XCR1	C1QC
	TMEM119
	MS4A7
	APOE
	CYP4F18
	TREM2
	TLR7
	LILRB4

Стимулирующие миелоидные клетки

[00115] Как используется в данном документе, стимулирующие миелоидные клетки (также называемые в определенных аспектах SDC) представляют собой миелоидные клетки, которые являются эффективными при стимулировании иммунного ответа (например, более эффективны при стимулировании противоопухолевого ответа в микроокружении опухоли по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками). В некоторых вариантах реализации изобретения стимулирующие миелоидные клетки являются эффективными при презентировании антигена (например, опухолевого антигена) Т-клеткам или эффективными при стимулировании опухолеспецифических реакций Т-клеток по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения стимулирующие миелоидные клетки могут отображать увеличенную способность к поглощению, процессированию и/или презентации опухолеассоциированных антигенов Т-клеткам по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками. Стимулирующие миелоидные клетки могут обладать увеличенной способностью к повторному праймингу цитотоксических Т-лимфоцитов или в некоторых случаях стимулировать эффективное уничтожение опухолевых клеток относительно нестимулирующих миелоидных клеток.

Нестимулирующие миелоидные клетки могут отображать более высокую экспрессию генов и маркеров клеточной поверхности, задействованных в процессинге антигенов, презентации антигенов и/или костимуляции антигенов, включая, без ограничения, CD80, CD86, MHC I и MHC II по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками.

[00116] Типовые маркеры стимулирующих миелоидных клеток перечислены в таблице А. Например, в SDC человека экспрессия Xcr1, Clec9a и BDCA3 (CD141) является маркером идентичности SDC. Следует отметить, что у мышей CD103 также можно применять как сильный маркер идентичности SDC, хотя он не экспрессируется в SDC человека.

[00117] В одном варианте реализации изобретения SDC представляют собой опухоль-инфильтрирующие миелоидные клетки, имеющие идентичность дендритных клеток, которые также экспрессируют один или более маркеров SDC, перечисленных в таблице А. В другом варианте реализации изобретения SDC представляют собой опухоль-инфильтрирующие миелоидные клетки, имеющие идентичность дендритных клеток, которые также экспрессируют два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или все маркеры SDC, перечисленные в таблице А. В другом варианте реализации изобретения SDC идентифицируют как опухоль-инфильтрирующие миелоидные дендритные клетки, экспрессирующие BDCA3, KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, XCR1 и CLEC9A. Клетки SDC могут экспрессировать по меньшей мере один из KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, CLEC9A, BDCA3 и XCR1. В некоторых вариантах реализации изобретения SDC практически не экспрессируют TREM2, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK и/или TMEM119 на своей клеточной поверхности. В некоторых вариантах реализации изобретения SDC практически не экспрессируют C5AR1, LYVE1, ABCC3, MRC1, SIGLEC1, STAB1, C1QB, C1QA, TMEM37, MERTK, C1QC, TMEM119, MS4A7, APO E, CYP4F18, TREM2, TLR7 и/или LILRB4. Проточная цитометрия и ПЦР, среди прочих признанных в данной области техники анализов, могут применяться для оценки экспрессии маркера, описанного в данном документе.

[00118] Стимулирующие миелоидные клетки могут быть CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺ и BDCA3⁺. Стимулирующие миелоидные клетки могут быть CD45⁺, HLA-DR⁺ и BDCA3⁺. Стимулирующие миелоидные клетки могут быть CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻ и BDCA3⁺. Стимулирующие миелоидные клетки могут быть CD45⁺, HLA-DR⁺, CD11c⁺ и BDCA3⁺.

Антитела

[00119] В данной заявке предложены антитела и композиции, содержащие антитело, которое связывает белок NSM, включая антитела, которые блокируют нестимулирующие миелоидные клетки.

[00120] В данной заявке предложены антитела и композиции, содержащие антитело, которое связывает белок NSM, включая антитела, которые блокируют нестимулирующие миелоидные клетки.

[00121] Как используется в данном документе термин «антитело» или «иммуноглобулин» относится к полипептиду, который практически кодируется геном иммуноглобулина или набором генов иммуноглобулина или их связывающимися с анализируемым веществом фрагментами, которые специфически связывают и распознают анализируемое вещество (например, антиген). Все распознаваемые гены иммуноглобулинов включают константные области генов каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эпсилон и мю, а также множество генов переменного участка иммуноглобулинов. Легкие цепи классифицируются либо как каппа, либо как лямбда цепи. «Класс» антитела или иммуноглобулина относится к типу константного домена или константного участка, содержащихся в его тяжелой цепи. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут дополнительно подразделяться на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно.

[00122] Структурная единица типового иммуноглобулина (антитела) состоит из двух пар полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну «легкую» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). N-концевой домен каждой цепи определяет переменный участок, состоящий из от около 100 до 110 или более аминокислот, главным образом отвечающих за распознавание антигена. Термины переменный участок легкой цепи (VL) и переменный участок тяжелой цепи (VH) относятся, соответственно, к этим доменам легкой и тяжелой цепей. Тяжелая цепь IgG1 состоит из доменов VH, CH1, CH2 и CH3, соответственно, от N- к C-концу. Легкая цепь состоит из доменов VL и CL от N- к C-концу. Тяжелая цепь IgG1 содержит шарнир между доменами CH1 и CH2. В некоторых вариантах реализации иммуноглобулиновые конструкции содержат по меньшей мере один домен иммуноглобулина из IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, связанный с терапевтическим полипептидом. В некоторых вариантах реализации изобретения домен иммуноглобулина, находящийся в предложенном в данном документе антителе, получен из или происходит из конструкции на основе иммуноглобулина, такой как диатело или нанотело. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуноглобулиновые конструкции, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере один домен иммуноглобулина из тяжелой цепи антитела, такого как верблюжье антитело. В некоторых вариантах

реализации изобретения иммуноглобулиновые конструкции, предложенные в данном документе, содержат по меньшей мере один домен иммуноглобулина из антитела млекопитающего, такого как бычье антитело, антитело человека, верблюжье антитело, мышинное антитело или любое химерное антитело.

[00123] Термин «гипервариабельный участок» или «HVR», как используется в данном документе, относится к каждому из участков вариабельного домена антитела, которые имеют гипервариабельную последовательность и/или образуют определенные в структурном плане петли («гипервариабельные петли»). Как правило, нативные четырехцепочечные антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). HVR, как правило, содержат аминокислотные остатки из гипервариабельных петель и/или из определяющих комплементарность участков (CDR), последние характеризуются самой высокой вариабельностью и/или вовлечены в распознавание антигена. За исключением CDR1 в VH, CDR обычно содержат аминокислотные остатки, образующие гипервариабельные петли. Гипервариабельные участки (HVR) также называются «определяющими комплементарность участками» (CDR) и эти термины используются в данном документе взаимозаменяемо в отношении частей вариабельного участка, которые формируют антигенсвязывающие участки. Этот конкретный участок был описан авторами Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (1983) и Chothia et al., *J Mol Biol* 196:901-917 (1987), где определения включают перекрывание или поднаборы аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Несмотря на это, предполагается, что применение любого термина в отношении CDR антитела или его вариантов охватывается данным термином, определенным и используемым в данном документе. Точное число остатков, которые входят в состав конкретного CDR, будет варьировать в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники могут стандартными методиками определить какие остатки содержатся в конкретном CDR, предоставляющем аминокислотную последовательность вариабельного участка антитела.

[00124] Как используется в данном документе, термин «одноцепочечный» относится к молекуле, содержащей аминокислотные мономеры, линейно связанные пептидными связями. В таком конкретном варианте реализации изобретения С-конец легкой цепи Fab соединен с N-концом тяжелой цепи Fab в одноцепочечной молекуле Fab. Как более подробно описано в данном документе, scFv имеет вариабельный домен легкой цепи (VL), соединенный от своего С-конца до N-конца вариабельного домена тяжелой цепи (VH) полипептидной цепью. В альтернативном варианте scFv содержит полипептидную цепь, в которой С-терминальный конец VH соединен с N-терминальным концом VL полипептидной цепью.

[00125] «Fab-фрагмент» (также называется антигенсвязывающим фрагментом) содержит константный домен (CL) легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи наряду с переменными доменами VL и VH, находящимися на легкой и тяжелой цепях, соответственно. Переменные домены содержат определяющие комплементарность петли (CDR, также называется гиперпеременной участком), которые вовлечены в процесс связывания антигена. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов по дополнительным нескольким остаткам на карбоксильном конце домена CH1 тяжелой цепи, включая один или более цистеинов из шарнирного участка антитела.

[00126] «Одноцепочечный Fv» или «scFv» включает домены VH и VL антитела, причем эти домены содержатся в одной полипептидной цепи. В одном варианте реализации изобретения полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, позволяющий scFv образовывать требуемую структуру для связывания антигена. В качестве обзора ScFv см. Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Фрагменты scFv антитела HER2 описаны в WO93/16185; патенте США №5571894 и в патенте США №5587458.

[00127] Форма «однодоменных антител» или «sdAb» представляет собой отдельный иммуноглобулиновый домен. Sdab являются довольно стабильными и без труда экспрессируются как партнеры для слияния с Fc-цепью антитела (Harmsen MM, De Haard HJ (2007). "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments". *Appl. Microbiol Biotechnol.* 77(1):13-22).

[00128] Термин «Fc-домен» или «Fc-участок» в данном документе используется для обозначения C-концевого участка тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константного участка. Этот термин охватывает нативную последовательность Fc-участков и варианты Fc-участков. Если в данном документе не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc-участке или константном участке осуществляется согласно системе нумерации EU, также называемой индекс EU, как описано в Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Используемый в данном документе термин «Fc-полипептид» димерного Fc относится к одному из двух полипептидов, формирующих димерный Fc-домен, т.е. к полипептиду, содержащему C-концевые константные участки тяжелой цепи иммуноглобулина, способные к стабильной самоассоциации. Например, Fc-полипептид димерного Fc IgG содержит последовательность константного домена CH2 IgG и CH3 IgG. Fc может принадлежать к классу IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них могут дополнительно подразделяться на подклассы (изоотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂.

[00129] Термин «Fc-рецептор» и «FcR» применяют для описания рецептора, который связывается с Fc-участком антитела. Например, FcR может быть FcR человека с нативной последовательностью. Как правило, FcR – это рецептор, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII, и FcγRIII, включая аллельные варианты и формы этих рецепторов, образовавшиеся в результате альтернативного сплайсинга. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, что отличаются главным образом по их цитоплазматическим доменам. Иммуноглобулины других изотипов также могут связываться определенными FcR (см., например, Janeway et al., *Immuno Biology: the immune system in health and disease*, (Elsevier Science Ltd., NY) (4th ed., 1999)). Активирующий рецептор FcγRIIA в своем цитоплазматическом домене содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIB в своем цитоплазматическом домене содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) (обзор содержится в Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Обзор по FcR содержится в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994) и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Термином «FcR» по данному описанию охватываются другие FcR, включая те, которые должны быть идентифицированы в будущем. Этот термин также включает неонатальный рецептор, FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

[00130] Модификации в домене CH2 могут влиять на связывание FcR с Fc. В данной области техники известен ряд аминокислотных модификаций в Fc-участке для селективного изменения аффинности Fc к различным Fc-гамма рецепторам. В некоторых аспектах Fc содержит одну или более модификаций для содействия избирательному связыванию Fc-гамма рецепторов.

[00131] Типовые мутации, которые изменяют связывание FcR с Fc перечислены ниже:

[00132] S298A/E333A/K334A, S298A/E333A/K334A/K326A (Lu Y, Vernes JM, Chiang N, et al. *J Immunol Methods.* 2011 Feb 28;365(1-2):132-41);

[00133] F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L (Stavnhagen JB, Gorlatov S, Tuailon N, et al. *Cancer Res.* 2007 Sep 15;67(18):8882-90; Nordstrom JL, Gorlatov S, Zhang W, et al. *Breast Cancer Res.* 2011 Nov 30;13(6):R123);

[00134] F243L (Stewart R, Thom G, Levens M, et al. *Protein Eng Des Sel.* 2011 Sep;24(9):671-8.), S298A/E333A/K334A (Shields RL, Namenuk AK, Hong K, et al. *J Biol Chem.* 2001 Mar 2;276(9):6591-604);

[00135] S239D/I332E/A330L, S239D/I332E (Lazar GA, Dang W, Karki S, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 14;103(11):4005-10);

[00136] S239D/S267E, S267E/L328F (Chu SY, Vostiar I, Karki S, et al. Mol Immunol. 2008 Sep;45(15):3926-33);

[00137] S239D/D265S/S298A/I332E, S239E/S298A/K326A/A327H, G237F/S298A/A330L/I332E, S239D/I332E/S298A, S239D/K326E/A330L/I332E/S298A, G236A/S239D/D270L/I332E, S239E/S267E/H268D, L234F/S267E/N325L, G237F/V266L/S267D и другие мутации, перечисленные в WO2011/120134 и WO2011/120135, включенные в данный документ посредством ссылки. В публикации *Therapeutic Antibody Engineering* (авторов William R. Strohl and Lila M. Strohl, Woodhead Publishing series in Biomedicine No 11, ISBN 1 907568 37 9, Oct 2012) перечислены мутации на с. 283.

[00138] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, описанное в данном документе, включает модификации для улучшения способности опосредовать эффекторную функцию. Такие модификации известны в данной области техники и включают в себя афукозилирование или конструирование аффинности Fc к активирующему рецептору, главным образом FCGR3a для АЗКЦ, и к С1q для КЗЦ. В приведенной ниже таблице В обобщены различные конструкции, описанные в литературе для конструирования эффекторной функции.

[00139] Способы продуцирования антител с незначительным содержанием или без фукозы на сайте гликозилирования Fc (Asn 297 по нумерации EU) без изменения аминокислотной последовательности хорошо известны в данной области техники. Технология GlymaX® (ProBioGen AG) основана на внедрении гена фермента, который нарушает клеточный механизм биосинтеза фукозы в клетках, используемый для продукции антител. Это предотвращает добавление антителопродуцирующими клетками сахара «фукозы» к N-присоединенной углеводной части антитела (von Horsten et al. (2010) *Glycobiology*. 2010 Dec; 20 (12):1607-18. Другой подход для получения антител с пониженным уровнем фукозилирования можно найти в патенте США 8409572, в котором изложен выбор линий клеток для продукции антител по их способности обеспечивать более низкие уровни фукозилирования антител. Антитела могут быть полностью афукозилированными (означает, что они не содержат выявляемой фукозы) или они могут быть частично афукозилированными, что означает, что выделенное антитело содержит менее 95 %, менее 85 %, менее 75 %, менее 65 %, менее 55 %, менее 45 %, менее 35 %, менее 25 %, менее 15 % или менее 5 % от количества фукозы, обычно выявляемой в сходном антителе, продуцируемом системой экспрессии млекопитающих.

[00140] Таким образом, в одном варианте реализации изобретения, описанное в данном документе антитело может содержать димерный Fc, который содержит одну или более аминокислотных модификаций, как указано в таблице В, придающих улучшенную эффекторную функцию. В другом варианте реализации изобретения антитело может быть афукозилированным с целью улучшения эффекторной функции.

Таблица В. Домены CH2 и конструирование эффекторной функции.

Литературный источник	Мутации	Действие
Lu, 2011, Ferrara 2011, Mizushima 2011	Афукозилированный	Увеличенное АЗКЦ
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A	Увеличенное АЗКЦ
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A/K326A	Увеличенное АЗКЦ
Stavenhagen, 2007	F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L	Увеличенное АЗКЦ
Nordstrom, 2011	F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L	Увеличенное АЗКЦ
Stewart, 2011	F243L	Увеличенное АЗКЦ
Shields, 2001	S298A/E333A/K334A	Увеличенное АЗКЦ
Lazar, 2006	S239D/I332E/A330L	Увеличенное АЗКЦ
Lazar, 2006	S239D/I332E	Увеличенное АЗКЦ
Bowles, 2006	AME-D, не указанные мутации	Увеличенное АЗКЦ
Heider, 2011	37. 1, мутации не описаны	Увеличенное АЗКЦ
Moore, 2010	S267E/H268F/S324T	Увеличенное КЗЦ

[00141] В данной области техники известны модификации Fc, снижающие связывание FcγR и/или комплементом, и/или эффекторные функции. В последних публикациях описаны стратегии, которые были использованы для конструирования антител со сниженной или подавленной эффекторной активностью (см. Strohl, WR (2009), Curr Opin Biotech 20:685-691 и Strohl, WR and Strohl LM, “Antibody Fc engineering for optimal antibody performance” в Therapeutic Antibody Engineering, Cambridge:Woodhead Publishing (2012), pp 225-249). Эти стратегии включают снижение эффекторных функций посредством модификации гликозилирования, применения каркасов IgG2/IgG4 или введения мутаций в шарнирную или CH2-области Fc. Например, в публикации заявки на патент США №2011/0212087 (Strohl), публикации международной заявки на патент №WO 2006/105338 (Xencor), публикации заявки на патент США №2012/0225058 (Xencor), публикации заявки на патент США №2012/0251531 (Genentech) и Strop et al ((2012) J. Mol. Biol. 420:204-219) описаны специфические модификации для снижения связывания FcγR или комплемента с Fc.

[00142] Конкретные, неограничивающие примеры известных аминокислотных модификаций для снижения связывания FcγR или комплемента с Fc, включают модификации, указанные в следующей таблице:

Таблица С. Модификации для снижения связывания FcγR или комплемента с Fc.

Компания	Мутации
GSK	N297A
Ortho Biotech	L234A/L235A
Protein Design labs	IGG2 V234A/G237A
Wellcome Labs	IGG4 L235A/G237A/E318A
GSK	IGG4 S228P/L236E
Alexion	IGG2/IGG4combo
Merck	IGG2 H268Q/V309L/A330S/A331S
Bristol-Myers	C220S/C226S/C229S/P238S

Seattle Genetics	C226S/C229S/E3233P/L235V/L235A
Amgen	Продукция в <i>E. coli</i> , без глико
Medimune	L234F/L235E/P331S
Trubion	Шарнирный мутант, вероятно C226S/P230S

[00143] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело обладает активностью антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). АЗКЦ может возникать, когда антитела связываются с антигеном на поверхности патогенных или опухолевых клеток-мишеней. Эффекторные клетки, несущие на своей клеточной поверхности Fc-гамма рецептор (Fc γ R или FCGR), включая цитотоксические Т-клетки, естественные киллеры (NK), макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, дендритные клетки или моноциты, распознают и связывают Fc-участок антител, связанных с клеткой-мишенью. Такое связывание может запускать активацию внутриклеточных сигнальных путей, приводящих к гибели клеток. В конкретных вариантах реализации изобретения подтипы иммуноглобулинового Fc-участка (изотипы) включают IgG1 и IgG3 человека. Как используется в данном документе, АЗКЦ относится к а клеточно-опосредованной реакции, при которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (*например*, естественные киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги) распознают связывание антитела на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис данной клетки-мишени. Первичные клетки для опосредования АЗКЦ, NK-клетки, экспрессируют только Fc γ RIII, тогда как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Данные о экспрессии FcR на гемопоэтических клетках обобщена в таблице 3 на с. 464 публикации Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Для оценки активности АЗКЦ интересующей молекулы может проводиться анализ АЗКЦ *in vitro*, такой как описанный в патенте США №5500362 или 5821337. Эффекторные клетки, пригодные для таких анализов, включают мононуклеары периферической крови (МПК) и естественные киллеры (NK). В альтернативном варианте или дополнительно активность АЗКЦ интересующей молекулы может оцениваться *in vivo*, *например*, в модели на животном, такой как описано в Clynes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998).

[00144] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело обладает активностью комплементзависимой клеточной цитотоксичности (КЗЦ). Антителоиндуцированная КЗЦ опосредуется посредством белков классического пути активации комплемента и запускается связыванием белка системы комплемента C1q с антителом. Связывание Fc-участка антитела с C1q

может индуцировать активацию каскада комплемента. В конкретных вариантах реализации изобретения подтипы иммуноглобулинового Fc-участка (изотипы) включают IgG1 и IgG3 человека. Как используется в данном документе КЗЦ относится к способности молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Активация пути комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (*например*, полипептида, (*например*, антитела)), образовавшей комплекс с распознаваемым антигеном. Для оценки активации комплемента может быть выполнен анализ КЗЦ, *например*, как описано в Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

[00145] Мишенями для антител против NSM могут быть по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или более из TREM2, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK и TMEM119. Мишенью для антитела против NSM может быть TREM2. Мишенью для антитела против NSM может быть MS4A7. В некоторых аспектах изобретения мишенями для антител против NSM не являются один или более из TREM2, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK и/или TMEM119. В некоторых аспектах изобретения мишенью для антител против NSM не является LILRB4. В некоторых аспектах изобретения антитела против NSM не связывают TREM2. В некоторых аспектах изобретения антитела против NSM не связывают MS4A7. В некоторых аспектах изобретения антитела против NSM не связывают C5AR1. В некоторых аспектах изобретения антитела против NSM не связывают LYVE1. В некоторых аспектах изобретения антитела против NSM не связывают ABCC3. В некоторых аспектах изобретения антитела против NSM не связывают LILRB4. В некоторых аспектах изобретения антитела против NSM не связывают MRC1/CD206. В некоторых аспектах изобретения антитела против NSM не связывают SIGLEC1. В некоторых аспектах изобретения антитела против NSM не связывают STAB1. В некоторых аспектах изобретения антитела против NSM не связывают TMEM37. В некоторых аспектах изобретения антитела против NSM не связывают MERTK. В некоторых аспектах изобретения антитела против NSM не связывают TMEM119. В некоторых аспектах изобретения антитела против NSM не связывают TLR7.

[00146] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело обладает активностью антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ). АЗКФ может возникать, когда антитела связываются с антигеном на поверхности патогенных или опухолевых клеток-мишеней. Фагоциты, несущие на своей клеточной поверхности Fc-рецепторы, включая моноциты и макрофаги, распознают и связывают Fc-участок антител, связанных с клетками-мишенями. При связывании Fc-рецептора с клетками-мишенями со связанными антителами, может инициироваться фагоцитоз клетки-мишени. АЗКФ может считаться формой АЗКЦ.

[00147] В некоторых вариантах реализации изобретения антитела способны образовывать иммунный комплекс. Например, иммунный комплекс может представлять собой опухолевую клетку, покрытую антителами.

[00148] В некоторых аспектах изобретения антитело против NSM практически не связывает миелоидные клетки, присутствующие за пределами раковой ткани. В некоторых аспектах изобретения антитело против NSM практически не связывает стимулирующие миелоидные клетки, присутствующие в раковой ткани.

[00149] В некоторых вариантах реализации антитела представляют собой моноклональные антитела.

[00150] В некоторых вариантах реализации антитела представляют собой поликлональные антитела.

[00151] В некоторых вариантах реализации антитела продуцируются гибридомами. В других вариантах реализации изобретения антитела продуцируются рекомбинантными клетками, сконструированными для экспрессии требуемых переменных и константных доменов.

[00152] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело может представлять собой одноцепочечные антитела или другие производные антител, сохраняющие антигенную специфичность и расположенный ниже шарнирный участок или его вариант.

[00153] В некоторых вариантах реализации изобретения антитела могут быть полифункциональными антителами, рекомбинантными антителами, антителами человека, гуманизированными антителами, их фрагментами или вариантами. В конкретных вариантах реализации изобретения фрагмент антитела или его производное выбирают из фрагмента Fab, фрагмента Fab'2, CDR и ScFv.

[00154] Человеческое антитело включает все антитела, имеющие переменные и константные участки, происходящие из последовательностей иммуноглобулина человека. В одном варианте реализации изобретения все из переменных и константных доменов происходят из последовательностей иммуноглобулина человека (полностью человеческое антитело). Эти антитела могут быть получены различными способами, в том числе путем иммунизации интересующим антигеном мыши, которая генетически модифицирована для экспрессии антител, происходящих из человеческих генов, кодирующих тяжелые и/или легкие цепи.

[00155] Гуманизированное антитело имеет последовательность, которая отличается от последовательности антитела, происходящего из нечеловеческого вида, одной или несколькими аминокислотными заменами, делециями и/или вставками, такими что гуманизированное антитело с

меньшей вероятностью вызывает иммунный ответ и/или вызывает менее тяжелый иммунный ответ по сравнению с нечеловеческими видами антитела, когда его вводят человеку. В одном варианте реализации изобретения некоторые аминокислоты в каркасных и константных доменах тяжелой и/или легкой цепей антитела нечеловеческого вида изменяют мутацией для получения гуманизированного антитела. В другом варианте реализации изобретения константный (-е) домен (-ы) из человеческого антитела сливают с переменным (-и) доменом (-ами) нечеловеческого вида. В другом варианте реализации изобретения один или более аминокислотных остатков в одной или более последовательностей CDR нечеловеческого антитела изменяют для снижения вероятной иммуногенности нечеловеческого антитела, когда его вводят человеку, причем измененные аминокислотные остатки либо не являются критическими для иммуноспецифического связывания антитела со своим антигеном, либо созданные изменения в аминокислотной последовательности являются консервативными изменениями, такими, что связывание гуманизированного антитела с антигеном не является значительно хуже связывания нечеловеческого антитела с антигеном. Примеры как создавать гуманизированные антитела могут быть найдены в патенте США №6054297, 5886152 и 5877293.

[00156] Химерное антитело относится к антителу, которое содержит один или более участков из одного антитела и один или более участков из одного или более других отличающихся антител.

[00157] В некоторых вариантах реализации изобретения антитела являются специфическими к поверхностным антигенам, таким как белок NSM. В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтические антитела являются специфическими к опухолевым антигенам (например, молекулам, специфически экспрессируемым опухолевыми клетками). В конкретных вариантах реализации изобретения терапевтические антитела могут иметь Fc-части человеческого или нечеловеческого IgG1 или IgG3 примата.

[00158] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело связывается или конъюгировано с эффекторной молекулой. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело конъюгировано с по меньшей мере одним терапевтическим средством, выбранным из группы, состоящей из радионуклида, цитотоксина, химиотерапевтического средства, лекарственного средства, пролекарства, токсина, фермента, иммуномодулятора, анти-ангиогенного средства, про-апоптического средства, цитокина, гормона, олигонуклеотида, антисмысловой молекулы, миРНК, второго антитела и фрагмента второго антитела.

[00159] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой агонистическое антитело. Агонистическое антитело может индуцировать (например, увеличивать)

одну или более видов активности или функций NSM после того как антитело связывает белок NSM, экспрессированный на клетке. Агонистическое антитело может связываться и активировать NSM, вызывая изменения в пролиферации клетки или модификацию антигенпрезентирующих способностей. Агонистическое антитело может связываться и активировать NSM, запуская внутриклеточные сигнальные пути, которые ведут к модифицированному росту клеток или апоптозу.

[00160] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой антагонистическое антитело. Антагонистическое антитело может блокировать (например, уменьшать) одну или более видов активности или функций NSM после того как антитело связывает белок NSM, экспрессированный на клетке. Например, антагонистическое антитело может связываться и блокировать лиганд, связывающийся с одним или более белков NSM, предотвращая дифференцировку и пролиферацию клетки или модификации антигенпрезентирующих свойств. Антагонистическое антитело может связываться и предотвращать активацию белка NSM через его лиганд, модифицируя внутриклеточные сигнальные механизмы, которые участвуют в процессе роста клеток и выживаемости.

[00161] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой истощающее антитело. Истощающее антитело представляет собой антитело, которое может уничтожать нестимулирующую миелоидную клетку при контакте посредством взаимодействия антитела с другими молекулами иммунных клеток. Например, антитела, при связывании с клетками, несущими белки NSM, могут задействовать белки системы комплемента и вызывать комплементзависимый лизис клеток. Антитела, при связывании с несущими белки NSM клетками, также могут стимулировать соседние клетки, несущие Fc-рецепторы для уничтожения их путем антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ).

[00162] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой нейтрализующее антитело и данное антитело нейтрализует одну или более биологических активностей NSM. В некоторых вариантах реализации изобретения белок NSM экспрессируется на поверхности нестимулирующих миелоидных клеток и данное антитело распознает внеклеточный домен белка NSM.

[00163] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело является избирательным к NSM (предпочтительно связывается с NSM). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, которое селективно связывается с NSM, обладает константой диссоциации (K_d) в диапазоне от 0,0001 нМ до 1 мкМ. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело специфически связывается с эпитопом на белке NSM, который является консервативным среди белков из различных видов. В

другом варианте реализации изобретения избирательное связывание включает, но не требует исключительного связывания.

[00164] В одном варианте реализации изобретения антитело против NSM, связанное со своей мишенью, отвечает за создание истощения *in vivo* нестимулирующих миелоидных клеток, с которыми оно связано. В некоторых вариантах реализации изобретения эффекторные белки, индуцированные кластеризованными антителами, могут запускать множество реакций, включающих высвобождение воспалительных цитокинов, регуляцию продукции антигена, эндоцитоз или уничтожение клеток. В одном варианте реализации изобретения антитело способно к рекрутированию и активации комплемента или опосредованию антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) *in vivo*, или к опосредованию фагоцитоза путем связывания Fc-рецепторов *in vivo*. Антитело также может истощать нестимулирующие миелоидные клетки путем индуцирования апоптоза или некроза нестимулирующих миелоидных клеток при связывании.

[00165] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой антитело IgG1.

[00166] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой антитело IgG3.

[00167] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело не является антителом IgG2.

[00168] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело не является антителом IgG4.

[00169] В некоторых вариантах реализации изобретения блокирование нестимулирующих миелоидных клеток происходит *in vitro* и достигается: а) уничтожением нестимулирующих миелоидных клеток; б) истощением с помощью магнитных гранул нестимулирующих миелоидных клеток или в) сортировкой нестимулирующих миелоидных клеток методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

[00170] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, предложенное в данном документе, обладает константой диссоциации (Kd) в диапазоне от 0,0001 нМ до 1 мкМ. Например, Kd антитела может составлять около 1 мкМ, около 100 нМ, около 50 нМ, около 10 нМ, около 1 нМ, около 500 пМ, около 100 пМ или от около 50 пМ до любого значения из около 2 пМ, около 5 пМ, около 10 пМ, около 15 пМ, около 20 пМ или около 40 пМ.

[00171] В некоторых вариантах реализации изобретения для введения *in vivo* антител против NSM, описанных в данном документе, размеры нормальной дозировки могут варьировать от около 10 нг/кг вплоть до около 100 мг/кг массы тела индивида или более в сутки, предпочтительно от около 1

мг/кг/сутки до 10 мг/кг/сутки, в зависимости от пути введения. При повторном введении в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от тяжести заболевания или нарушения, требующего лечения, лечение продолжают до достижения требуемого подавления симптомов. Типовой режим дозирования включает введение начальной дозы антитела против NSM около 2 мг/кг с последующей еженедельной поддерживающей дозой около 1 мг/кг через неделю. Могут использоваться другие режимы дозирования в зависимости от шаблона фармакокинетического разрушения, которое врач желает достичь. Например, в данном документе предполагается дозирование индивиду от одного до двадцати одного раза в неделю. В некоторых вариантах реализации изобретения может применяться диапазон дозирования, составляющий от около 3 мкг/кг до около 2 мг/кг (такой как около 3 мкг/кг, около 10 мкг/кг, около 30 мкг/кг, около 100 мкг/кг, около 300 мкг/кг, около 1 мг/кг и около 2 мкг/кг). В некоторых вариантах реализации изобретения частота дозирования составляет три раза в сутки, два раза в сутки, раз в сутки, один раз в двое суток, раз в неделю, раз в две недели, раз в четыре недели, раз в пять недель, раз в шесть недель, раз в семь недель, раз в восемь недель, раз в девять недель, раз в десять недель или раз в месяц, раз в два месяца, раз в три месяца или дольше. Ход терапии легко контролировать с помощью традиционных методик и анализов. Режим дозирования, включая введенное антитело против NSM, может варьировать со временем независимо от примененной дозы.

[00172] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело конъюгируют с лекарственным средством, например, токсином, химиотерапевтическим средством, иммуномодулятором или радиоизотопом. Некоторые способы получения ADC (конъюгатов антитела и лекарственного средства) известны в данной области техники и описаны, например, в патентах США 8624003 (способ rot), 8163888 (одностадийный) и 5208020 (двухстадийный способ). Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть конъюгирован с по меньшей мере одним средством, включающим радионуклид, цитотоксин, химиотерапевтическое средство, лекарственное средство, пролекарство, токсин, фермент, иммуномодулятор, анти-ангиогенное средство, про-апоптическое средство, цитокин, гормон, олигонуклеотид, антисмысловую молекулу, миРНК, второе антитело и фрагмент второго антитела, который является антигенсвязывающим.

Белки, нуклеотиды и гомологи

[00173] В данном документе предложены способы и композиции для блокирования и/или выявления нестимулирующих миелоидных клеток, которые экспрессируют белки NSM. В некоторых вариантах реализации изобретение направлено на блокирование и/или выявление нестимулирующих миелоидных клеток из нечеловеческих клеток млекопитающих, которые экспрессируют гомолог белка NSM. Например, белки NSM в организме мыши могут экспрессировать сравнимый ограниченный паттерн

экспрессии, как у его человеческого гомолога. Таким образом, в данном документе предложены способы и композиции для блокирования и/или выявления нестимулирующих миелоидных клеток, которые экспрессируют белок NSM. В данном документе также предложены сходные способы и композиции для блокирования и/или выявления нестимулирующих клеток из организма любого индивида, которые экспрессируют гомолог белка NSM со сходным паттерном экспрессии, при котором клетки проявляют сравнимый паттерн экспрессии как для белка NSM.

[00174] Белки или нуклеотиды NSM могут включать по меньшей мере один или более из C5AR1, LYVE1, ABCC3, MRC1, SIGLEC1, STAB1, C1QB, C1QA, TMEM37, MERTK, C1QC, TMEM119, MS4A7, APO E, CYP4F18, TREM2, TLR7 и LILRB4, и их гомологи. Белки или нуклеотиды SDC могут включать по меньшей мере один или более из KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, CLEC9A, BDCA3 и XCR1, и их гомологи. Белки клеточной поверхности NSM могут включать по меньшей мере один или более из TREM2, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK и TMEM119. Белки клеточной поверхности NSM могут быть мишенями для одного или более антител против NSM, одного или в комбинации. В целом NSM являются положительными по белкам или нуклеотидам NSM и отрицательными по белкам или нуклеотидам SDC; напротив SDC в целом являются положительными по белкам или нуклеотидам SDC и отрицательными по белкам или нуклеотидам NSM.

[00175] Антигенсвязывающие конструкции, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере один полипептид. Также описаны полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, описанные в данном документе. Антигенсвязывающие конструкции как правило являются выделенными.

[00176] Как используется в данном документе, термин «выделенный» означает средство (например, полипептид или полинуклеотид), которое было идентифицировано и отделено и/или выделено из компонента его природной среды культуры клеток. Загрязняющие компоненты его природной среды представляют собой вещества, которые могут мешать диагностическим или терапевтическим применениям антигенсвязывающей конструкции, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Термин «выделенный» также относится к средству, которое было получено синтетическим путем, например, с помощью вмешательства человека.

[00177] В данном контексте термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются взаимозаменяемо по отношению к полимеру из аминокислотных остатков. А именно, описание, касающееся полипептида, в равной степени относится к описанию пептида и описанию белка, и наоборот. Эти термины применяются к аминокислотным полимерам природного происхождения, а также к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков

представляют собой некодируемую в природе аминокислоту. Используемые в данном документе термины охватывают аминокислотные цепи любой длины, включая полноразмерные белки, причем аминокислотные остатки соединены ковалентными пептидными связями.

[00178] Термин «аминокислота» относится к аминокислотам природного происхождения и неприродного происхождения, а также аминокислотным аналогам и аминокислотным миметикам, которые функционируют образом, подобным аминокислотам природного происхождения. Природными аминокислотами являются 20 общепринятых аминокислот (аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутамин, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин) и пирролизин и селеноцистеин. Аминокислотные аналоги относятся к соединениям, которые имеют основную химическую структуру, идентичную с аминокислотой природного происхождения, т.е. углерод, который связан с водородом, карбоксильную группу, аминогруппу и R-группу, например, гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги могут иметь модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют такую же основную химическую структуру, что и аминокислота природного происхождения. Ссылка на аминокислоты включает, например, протеогенные L-аминокислоты природного происхождения; D-аминокислоты, химически модифицированные аминокислоты, такие как варианты и производные аминокислот; непротеогенные аминокислоты природного происхождения, такие как β -аланин, орнитин и т. д., и химически синтезированные соединения, имеющие свойства, известные в данной области техники как характерные для аминокислот. Примеры аминокислот неприродного происхождения включают, без ограничений, α -метиламинокислоты (например, α -метилаланин), D-аминокислоты, гистидинподобные аминокислоты (например, 2-аминогистидин, β -гидроксигистидин, гомогистидин), аминокислоты, имеющие дополнительную метильную группу в боковой цепи («гомо» аминокислоты) и аминокислоты, в которых функциональная группа в боковой цепи карбоновой кислоты, заменяется на функциональную группу сульфоновой кислоты (например, цистеиновая кислота). Включение неприродных аминокислот, включая синтетические ненативные аминокислоты, замещенные аминокислоты или одну или более D-аминокислот, в белки по настоящему изобретению может иметь преимущество в ряде различных направлений. Пептиды, содержащие D-аминокислоты, проявляют повышенную стабильность *in vitro* или *in vivo* по сравнению с аналогами, содержащими L-аминокислоты. Таким образом, конструирование пептидов и т. п., включение D-аминокислот может быть в частности полезным, в случае, если желаемой или требуемой является большая внутриклеточная стабильность. Конкретнее, D-пептиды и т. п. резистентны к эндогенным пептидазам и протеазам, в связи с чем обеспечивается

улучшенная биодоступность молекулы и увеличенное время жизни *in vivo*, в случае если такие свойства являются желаемыми. Дополнительно, D-пептиды и т. п. не могут эффективно процессироваться для рестриктированной презентации на главном комплексе гистосовместимости II класса клеткам Т-хелперам, и поэтому с меньшей вероятностью индуцируют гуморальный иммунный ответ в целом организме.

[00179] Аминокислоты могут обозначаться в настоящем документе с помощью своих общеизвестных трехбуквенных символов или однобуквенных символов, рекомендованных Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Аналогичным образом, нуклеотиды могут быть представлены своими общепринятыми однобуквенными кодами.

[00180] Также в данном документе описаны полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антигенсвязывающих конструкций. Термин «полинуклеотид» или «нуклеотидная последовательность» подразумевает обозначение последовательного отрезка из двух или более нуклеотидных молекул. Нуклеотидная последовательность может быть геномной, кДНК, РНК, полусинтетического или синтетического происхождения или любой их комбинации.

[00181] Термин «нуклеиновая кислота» относится к дезоксирибонуклеотидам, дезоксирибонуклеозидам, рибонуклеозидам или рибонуклеотидам и их полимерам в либо одно- либо двухцепочечной форме. Не считая специальные ограничения, данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержит известные аналоги природных нуклеотидов, которые имеют похожие свойства связывания, как у эталонной нуклеиновой кислоты, и метаболизируются сходным образом с нуклеотидами природного происхождения. Не считая иные специальные ограничения, данный термин также относится к аналогам олигонуклеотидов, включая ПНК (пептидонуклеиновая кислота), аналоги ДНК, используемые в антисмысловой технологии (фосфоротиоаты, фосфоамидаты и тому подобные). Если не указано иное, конкретная нуклеотидная последовательность также косвенно охватывает ее консервативно модифицированные варианты (включая в том числе замещения с вырожденными кодонами) и комплементарные последовательности, а также явно обозначает данную последовательность. В частности, замещение вырожденными кодонами может достигаться созданием последовательностей, в которых третье положение одного или более (или всех) выбранных кодонов замещено остатками смешанных оснований и/или дезоксиинозиновыми остатками (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

[00182] Термин «консервативно модифицированные варианты» применяются как к аминокислотным последовательностям, так и к нуклеотидным последовательностям. Что касается конкретных

нуклеотидных последовательностей, то «консервативно модифицированные варианты» относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности или, в случае если нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, к по существу идентичным последовательностям. Из-за вырожденности генетического кода большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот кодируют любой данный белок. Например, кодоны GCA, GCC, GCG и GCU – все кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором аланин определяется кодоном, данный кодон может быть изменен на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения данного кодируемого полипептида. Такие вариации нуклеиновых кислот являются «молчащими вариациями», которые представляют собой один вид консервативно модифицированных вариаций. Каждая нуклеотидная последовательность, которая кодирует полипептид, также описывает каждую возможную молчащую вариацию нуклеиновой кислоты. Среднему специалисту в данной области техники будет понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно представляет собой единственный кодон для метионина, и TGG, который обычно представляет собой единственный кодон для триптофана) может быть модифицирован с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно, в каждой описанной последовательности подразумевается каждая молчащая вариация нуклеиновой кислоты, которая кодирует пептид.

[00183] Что касается аминокислотных последовательностей, то среднему специалисту в данной области техники будет понятно, что отдельные замены, делеции или вставки в последовательность нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, которые приводят к изменению, вставке или делеции одной аминокислоты или небольшого процентного содержания аминокислот в кодируемой последовательности, относятся к «консервативно модифицированному варианту», в котором указанное изменение приводит к делеции аминокислоты, вставке аминокислоты или замене аминокислоты на аминокислоту со сходными химическими свойствами. Таблицы консервативных замен, в которых приведены аминокислоты с подобными функциональными свойствами, известны среднему специалисту в данной области техники. Такие консервативно модифицированные варианты дополнительно включают, а не исключают, полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели, описанные в данном документе.

[00184] Таблицы консервативных замен, в которых приведены аминокислоты с подобными функциональными свойствами, известны среднему специалисту в данной области техники. Каждая из следующих восьми групп содержит аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг друга: 1) Аланин (A), Глицин (G); 2) Аспарагиновая кислота (D), Глутаминовая кислота (E); 3) Аспарагин (N), Глутамин (Q); 4) Аргинин (R), Лизин (K); 5) Изолейцин (I), Лейцин (L), Метионин (M),

Валин (V); 6) Фенилаланин (F), Тирозин (Y), Триптофан (W); 7) Серин (S), Треонин (T) и [0139] 8) Цистеин (C), Метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co. ;2nd edition (December 1993).

[00185] Термины «идентичный» или процент «идентичности» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям, или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми. Последовательности являются «практически идентичными», если они содержат определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т.е. идентичными на около 60 %, около 65 %, около 70 %, около 75 %, около 80 %, около 85 %, около 90 % или около 95 % в пределах конкретного участка) при сравнении и выравнивании на предмет максимального соответствия в окне сравнения или обозначенного участка при оценке с использованием одного из алгоритмов сравнения последовательности (или других алгоритмов, доступных средним специалистам в данной области техники) или путем выравнивания вручную и визуального просмотра. Данное определение также относится к последовательности, комплементарной исследуемой последовательности. Идентичность может распространяться на участок, длина которого составляет по меньшей мере около 50 аминокислот или нуклеотидов, или на участок, длина которого составляет 75-100 аминокислот или нуклеотидов или, если не указано иное, на всю последовательность полинуклеотида или полипептида. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по данному изобретению, включая гомологи, принадлежащие другим видам, отличным от человека, может быть получен способом, включающем стадии скрининга библиотеки в жестких условиях гибридизации с использованием меченого зонда, содержащего полинуклеотидную последовательность, описанную в данном документе, или ее фрагмент, и выделения полноразмерной кДНК и геномных клонов, содержащих указанную полинуклеотидную последовательность. Такие технологии гибридизации хорошо известны специалисту в данной области техники.

[00186] Для сравнения последовательностей обычно одну последовательность рассматривают как эталонную, с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма для сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости обозначают координаты подпоследовательностей и устанавливают программные параметры алгоритма сравнения последовательностей. Можно использовать параметры программы по умолчанию или можно устанавливать альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности для исследуемых последовательностей относительно эталонной последовательности на основе параметров программы.

[00187] Термин «окно сравнения», как используется в данном документе, включает ссылку на сегмент, любой из множества смежных положений, выбираемых из группы, состоящей из от 20 до 600, обычно от около 50 до около 200, более часто от около 100 до около 150 положений, в которых последовательность можно сравнивать с эталонной последовательностью из того же количества смежных положений после того как две последовательности оптимально выровнены. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны средним специалистам в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, включая, без ограничения, использование алгоритма локальных гомологий из Smith and Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482с, алгоритма выравнивания гомологий из Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443,), метода поиска сходства из Pearson and Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) или с помощью выравнивания вручную и визуального просмотра (см., например, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 supplement)).

[00188] Одним из примеров алгоритма, который пригоден для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей являются алгоритмы BLAST и BLAST 2. 0, которые описаны в работах Altschul et al. (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 и Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST находится в открытом доступе в Национальном центре биотехнологической информации (the National Center for Biotechnology Information) во всемирной компьютерной сети на веб-сайте ncbi.nlm.nih.gov. Параметры алгоритма BLAST W, T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) используются в качестве параметров по умолчанию длина слова (W), равная 11, ожидаемое значение (E), равное 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих нитей. Для аминокислотных последовательностей в программе BLASTP используются в качестве параметров по умолчанию длина слова, равная 3, ожидаемое значение (E), равное 10, и матрица подсчета баллов BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) выравниваний (B), равная 50, ожидаемое значение (E), равное 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей. Алгоритм BLAST, как правило, осуществляется с выключенным фильтром «низкая сложность».

[00189] Алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877). Одно значение сходства, предоставляемый алгоритмом BLAST, представляет собой наименьшую сумму вероятностей (P(N)), которая является показателем вероятности, с которой

случайным образом будет возникать совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями. Например, нуклеиновую кислоту считают сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая сумма вероятностей при сравнении исследуемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее около 0,2 или менее около 0,01, или менее около 0,001.

[00190] Фраза «избирательно (или специфически) гибридизуется с» относится к связыванию, образованию дуплексов или гибридизации молекулы только с конкретной нуклеотидной последовательностью в жестких условиях гидридизации, когда эта последовательность содержится в сложной смеси (включая без ограничения общую клеточную ДНК или РНК, или ДНК или РНК библиотек).

[00191] Фраза «жесткие условия гидридизации» относится к гибридизации последовательностей ДНК, РНК или других нуклеиновых кислот, или их комбинаций в условиях низкой ионной силы и высокой температуры, как известно в данной области техники. Как правило, в жестких условиях гибридизации зонд будет гибридизироваться со своей целевой последовательностью в сложной смеси нуклеиновых кислот (включая без ограничения общую клеточную ДНК или РНК, или ДНК или РНК библиотек), но не гибридизуется с другими последовательностями, содержащимися в сложной смеси. Жесткие условия зависят от последовательностей и будут различаться при разных обстоятельствах. Специфическая гибридизация более длинных последовательностей происходит при более высоких температурах. Исчерпывающее руководство по гибридизации нуклеиновых кислот представлено в публикации Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993).

[00192] Считается, что используемые в данном документе термины «конструировать, сконструированный, конструирование», включают любую манипуляцию с пептидным остовом или посттрансляционные модификации полипептида природного происхождения или рекомбинантного полипептида, или его фрагмента. Конструирование включает модификации аминокислотной последовательности, профиля гликозилирования или группы боковой цепи отдельных аминокислот, а также комбинации этих подходов. Экспрессия и получение сконструированных белков осуществляется стандартными методами молекулярной биологии.

[00193] Под «выделенной молекулой нуклеиновой кислоты или полинуклеотидом» подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которая была выделена из своей природной среды. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащийся в векторе,

считается выделенным. Дополнительные примеры выделенного полинуклеотида включают рекомбинантные полинуклеотиды, поддерживаемые в гетерологичных клетках-хозяевах, или очищенные (частично или существенно) полинуклеотиды в растворе. Выделенный полинуклеотид включает полинуклеотидную молекулу, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат данную полинуклеотидную молекулу, но полинуклеотидная молекула находится вне хромосомы или в таком положении в хромосоме, которое отличается от своего природного положения в хромосоме. Выделенные молекулы РНК включают РНК-транскрипты, полученные *in vivo* или *in vitro*, а также формы положительной и отрицательных цепей и двухцепочечные формы. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты, в данном документе, дополнительно включают такие молекулы, полученные синтетическим путем, например, посредством ПЦР или химического синтеза. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота в определенных вариантах реализации изобретения включают регуляторный элемент, такой как промотор, участок связывания рибосом или терминатор транскрипции.

[00194] Термин «полимеразная цепная реакция» или «ПЦР», как правило, относится к способу амплификации требуемой нуклеотидной последовательности *in vitro*, как описано, например, в патенте США №4683195. В общем, метод ПЦР заключается в многократном повторении циклов синтеза с удлинением праймера с использованием олигонуклеотидных праймеров, способных предпочтительно гибридизироваться с матричной нуклеиновой кислотой.

[00195] Под нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом, который имеет нуклеотидную последовательность, что по меньшей мере, например, на 95 % «идентична» эталонной нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению, подразумевается, что нуклеотидная последовательность полинуклеотида идентична эталонной последовательности, за исключением того, что данная полинуклеотидная последовательность может включать вплоть до пяти точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов эталонной нуклеотидной последовательности. Другими словами, для получения полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность на по меньшей мере на 95 % идентичную эталонной нуклеотидной последовательности, в эталонной последовательности могут быть удалены или замещены на другой нуклеотид вплоть до 5 % нуклеотидов, или в эталонную последовательность может быть вставлен ряд нуклеотидов вплоть до 5 % от общего количества нуклеотидов, содержащихся в эталонной последовательности. Эти изменения эталонной последовательности могут происходить в 5'- или 3'-концевых положениях эталонной нуклеотидной последовательности или в любом месте между этими концевыми положениями, диспергированные либо отдельно находящиеся между остатками в эталонной последовательности, либо находящиеся в составе одной или более последовательных групп в пределах эталонной последовательности. На

практике, для того чтобы определить идентична ли любая конкретная полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % нуклеотидной последовательности данного изобретения можно использовать традиционные способы с использованием известных компьютерных программ, таких как программы, которые обсуждали выше для полипептидов (например, ALIGN-2).

[00196] Считается, что производное или вариант полипептида характеризуется «гомологичностью» или является «гомологичным» пептиду, если аминокислотные последовательности производного или варианта по меньшей мере на 50 % идентичны аминокислотной последовательности размером 100 аминокислот из оригинального пептида. В некоторых вариантах реализации изобретение производное или вариант характеризуется сходством по меньшей мере на 75 % либо с пептидом, либо фрагментом пептида, имеющим такое же количество аминокислотных остатков, что и производное. В некоторых вариантах реализации изобретение производное или вариант характеризуется сходством по меньшей мере на 85 % либо с пептидом, либо фрагментом пептида, имеющим такое же количество аминокислотных остатков, что и производное. В некоторых вариантах реализации изобретение аминокислотная последовательность представляет собой производное, характеризующееся сходством по меньшей мере на 90 % с пептидом или фрагментом пептида, имеющим такое же количество аминокислотных остатков, что и производное. В некоторых вариантах реализации изобретение аминокислотная последовательность представляет собой производное, характеризующееся сходством по меньшей мере на 95 % с пептидом или фрагментом пептида, имеющим такое же количество аминокислотных остатков, что и производное. В некоторых вариантах реализации изобретение производное или вариант характеризуется сходством по меньшей мере на 99 % либо с пептидом, либо фрагментом пептида, имеющим такое же количество аминокислотных остатков, что и производное.

[00197] Термин «модифицированный», как используется в данном документе, относится к любым изменениям, вносимым в данный полипептид, таким как изменения длины полипептида, аминокислотной последовательности, химической структуры, котрансляционная модификация или посттрансляционная модификация полипептида. Формулировка термина «(модифицированный)» означает, что полипептиды, о которых идет речь, необязательно модифицированы, а именно, рассматриваемые полипептиды могут быть модифицированными или немодифицированными.

[00198] В некоторых аспектах изобретения антитело или белок, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 % идентична соответствующей аминокислотной последовательности или ее фрагменту, которые изложены в таблице (-ах) или используются под номером (-ами) доступа,

описанными в данном документе. В некоторых аспектах выделенное антитело или белок, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом, который по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 % идентичен соответствующей нуклеотидной последовательности или ее фрагменту, которые изложены в таблице (-ах) или используются под номером (-ами) доступа, описанными в данном документе.

Фармацевтические композиции

[00199] В настоящей заявке предложены композиции, содержащие антитела, включающие фармацевтические композиции, содержащие любое одно или более антител, описанных в данном документе, с одним или более фармацевтически приемлемыми наполнителями. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция является стерильной. Фармацевтические композиции обычно содержат терапевтически эффективное количество антитела.

[00200] Помимо одного или более антител, описанных в данном документе, эти композиции могут содержать фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель, буферное вещество, стабилизатор или другие вещества, хорошо известные специалистам в данной области техники. Такие вещества должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Точный характер носителя или другого вещества может зависеть от пути его введения в организм, например, пероральный, внутривенный, кожный или подкожный, назальный, внутримышечный и внутрибрюшинный.

[00201] Фармацевтические композиции для перорального применения могут быть приготовлены в форме таблетки, капсулы, порошка или форме жидкости. Таблетка может включать твердый носитель, такой как желатин или адъювант. Жидкие фармацевтические композиции обычно включают жидкий носитель, такой как вода, вазелин, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Также в их состав могут быть включены физиологический солевой раствор, декстроза или другой раствор сахаридов, или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

[00202] Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции, или инъекции в очаг поражения активный ингредиент должен находиться в форме парентерально приемлемого водного раствора с апирогенными свойствами, и иметь подходящие рН, изотоничность и стабильность. Специалисты соответствующей области техники вполне способны приготовить подходящие растворы с использованием, например, изотонических носителей, таких как раствор натрия хлорида для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор Рингера с лактатом для инъекций. Также при необходимости в

состав могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферные вещества, антиоксиданты и/или другие добавки.

[00203] В случае, когда индивиду необходимо давать полипептид, антитело, нуклеиновую кислоту, низкомолекулярное вещество или другое фармацевтически используемое соединение, то введение предпочтительно дают в «терапевтически эффективном количестве» или «профилактически эффективном количестве» (как вариант, хотя профилактика может считаться терапией), которое является достаточным для обеспечения пользы для индивида. Фактическое количество для введения, а также скорость и динамика введения будут зависеть от природы и тяжести заболевания из-за агрегирования белков, требующего лечения. Назначение лечения, например, решений относительно дозировки и т. п., находятся в пределах компетенции врачей общей практики и врачей другого профиля и, как правило, при этом учитывается характер нарушения, подлежащего лечению, состояние здоровья конкретного субъекта, место и способ введения, а также другие факторы, известные практикующим врачам. Примеры методик и протоколов, упомянутых выше, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed., (ed), 1980.

[00204] Композицию можно вводить самостоятельно или в комбинации с другими способами лечения, либо одновременно, либо последовательно, в зависимости от патологического состояния, подлежащего лечению.

Способы

Способы применения

[00205] В одном аспекте изобретения в настоящей заявке предлагаются способы приведения в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом против NSM, таким как человеческое антитело, которое приводит к блокированию нестимулирующих миелоидных клеток.

[00206] В другом аспекте в настоящей заявке предлагаются способы приведения в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с мышинным антителом против NSM, которое приводит к блокированию нестимулирующих миелоидных клеток.

[00207] В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие клетки представляют собой одну или более из клеток DC1 и клеток TAM.

[00208] В некоторых вариантах реализации в настоящей заявке предлагаются способы блокирования нестимулирующих миелоидных клеток, включающие приведение в контакт нестимулирующих

миелоидных клеток с антителом к NSM, тем самым обеспечивая уничтожение нестимулирующих миелоидных клеток. Блокирование относится к оказанию воздействия, приводящего к частичной или полной потере функциональности клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к индуцированию у клеток остановки роста. В некоторых вариантах реализации изобретения блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит клетки к апоптозу. В некоторых вариантах реализации изобретения блокирование нестимулирующих клеток приводит к лизису клеток, как например путем комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) или антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). В некоторых вариантах реализации изобретения блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит клетки к некрозу. В некоторых вариантах реализации изобретения блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к индуцированию у клеток остановки роста. В некоторых вариантах реализации изобретения блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к инактивации клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к нейтрализации активности в клетках белка NSM. В некоторых вариантах реализации изобретения блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит клетки к снижению пролиферации. В некоторых вариантах реализации изобретения блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к дифференцировке клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к уменьшению способности клеток действовать как ингибирующие антигенпрезентирующие клетки или приводит к увеличению способности клеток действовать как активирующие антигенпрезентирующие клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к нарушенной локализации клеток внутри опухолевой ткани или опухолевого микроокружения (ТМЕ). В некоторых вариантах реализации изобретения блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к измененной частичной пространственной организации клеток внутри опухолевой ткани или опухолевого микроокружения. В некоторых вариантах реализации изобретения блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к измененной временной экспрессии клеток внутри опухолевой ткани или ТМЕ. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает удаление нестимулирующих миелоидных клеток.

[00209] В любом и во всех аспектах блокирования нестимулирующих миелоидных клеток, как описано в данном документе, любое увеличение или уменьшение, или изменение аспекта свойств (-а) или функций (-и) сравнивают с клеткой, неконтактировавшей с антителом против NSM.

[00210] В другом аспекте в настоящей заявке предлагаются способы приведения в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом против NSM, которое приводит к модуляции функционирования нестимулирующих миелоидных клеток. Модуляция может представлять собой любую одну или более из следующего. В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие клетки представляют собой одну или более из клеток DC1, клеток TAM1 и клеток TAM2. В некоторых вариантах реализации изобретения модуляция функционирования приводит к блокированию нестимулирующих миелоидных клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения модуляция функционирования нестимулирующих миелоидных клеток приводит к увеличению способности клеток стимулировать как нативные, так и активированные CD8+ Т-клетки, например, путем увеличения способности нестимулирующих клеток к перекрестной презентации опухолевого антигена на молекулах MHC1 наивным CD8+ Т-клеткам. В некоторых вариантах реализации изобретения модуляция увеличивает Т-клеточную стимулирующую функцию нестимулирующих миелоидных клеток, включая, например, способность клеток запускать передачу сигнала от Т-клеточного рецептора (TCR), пролиферацию Т-клеток или продукцию цитокинов Т-клетками. В одном варианте реализации изобретения уменьшается выживаемость нестимулирующей клетки или уменьшается пролиферация нестимулирующей клетки. В одном варианте реализации изобретения увеличивается соотношение стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам.

[00211] В любом и во всех аспектах уменьшения функционирования нестимулирующих миелоидных клеток, как описано в данном документе, любое увеличение или уменьшение, или изменение аспекта свойств (-а) или функций (-и) сравнивают с клеткой, неконтактировавшей с антителом против NSM.

[00212] В некоторых вариантах реализации в настоящей заявке предлагаются способы уничтожения (также называемые индуцированием гибели клеток) нестимулирующих миелоидных клеток, включающие приведение в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом против NSM, тем самым обеспечивая уничтожение нестимулирующих миелоидных клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения уничтожение возрастает в отношении нестимулирующих миелоидных клеток, которых не приводили в контакт с антителом против NSM. В некоторых вариантах реализации изобретения приведение в контакт индуцирует у нестимулирующих миелоидных клеток апоптоз. В некоторых вариантах реализации изобретения приведение в контакт индуцирует у нестимулирующих миелоидных клеток апоптоз. В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, содержащей нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает удаление нестимулирующих миелоидных клеток. В

некоторых вариантах реализации изобретения гибнет 10 %-80 % клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения гибнет по меньшей мере 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % или 80 % клеток.

[00213] В некоторых вариантах реализации изобретения в настоящей заявке предлагаются способы увеличения соотношения стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам в популяции иммунных клеток, содержащей стимулирующие миелоидные клетки и нестимулирующие миелоидные клетки, включающие приведение в контакт популяции иммунных клеток с антителом против NSM. В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение увеличивается в отношении популяции клеток, которых не приводили в контакт с антителом против NSM. В некоторых вариантах реализации изобретения увеличивается соотношение клеток DC2 к клеткам DC1. В некоторых вариантах реализации изобретения увеличивается соотношение клеток DC2 к клеткам TAM1. В некоторых вариантах реализации изобретения увеличивается соотношение клеток DC2 к клеткам TAM2. В некоторых вариантах реализации изобретения увеличивается соотношение клеток DC2 к клеткам TAM1 + TAM2. В некоторых вариантах реализации изобретения увеличивается соотношение клеток DC2 к клеткам TAM1 + DC1. В некоторых вариантах реализации изобретения увеличивается соотношение клеток DC2 к клеткам DC1 + TAM2. В некоторых вариантах реализации изобретения увеличивается соотношение клеток DC2 к клеткам DC1 + TAM1 + TAM2. В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение увеличивается по меньшей мере на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % или 100 %.

[00214] В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам перед приведением в контакт находится в диапазонах 0,001:1 – 0,1:1. В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам после приведения в контакт находится в диапазонах 0, 1:1-0,100:1.

[00215] В некоторых вариантах реализации изобретения количество нестимулирующих миелоидных клеток уменьшается. В некоторых вариантах реализации изобретения стимулирующие миелоидные клетки представляют собой клетки DC2. В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки уничтожаются, например, путем некроза или апоптоза. В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки индуцируются для возникновения остановки роста. В некоторых вариантах реализации изобретения нестимулирующие миелоидные клетки больше не пролиферируют. В некоторых вариантах реализации изобретения пространственная локализация нестимулирующих миелоидных клеток изменяется, а

соотношение увеличивается в конкретном участке ТМЕ. В некоторых вариантах реализации изобретения пространственная локализация нестимулирующих миелоидных клеток изменяется, а соотношение увеличивается в течение конкретного периода времени в процессе развития опухоли.

[00216] В некоторых вариантах реализации изобретения приведение в контакт происходит *in vitro*. В некоторых вариантах реализации изобретения приведение в контакт происходит *in vivo*. В некоторых конкретных вариантах реализации изобретения приведение в контакт происходит *in vivo* в организме человека. В некоторых вариантах реализации изобретения приведение в контакт осуществляется введением антитела против NSM. В некоторых вариантах реализации изобретения индивид, получающий антитело (такой как человек), болеет раком.

[00217] В другом аспекте в изобретении предлагаются способы лечения связанного с иммунной системой патологического состояния (например, рака) у индивида, включающие введение индивиду эффективного количества композиции, содержащей антитело против NSM. В другом аспекте в изобретении предлагаются способы усиления иммунного ответа у индивида, включающие введение индивиду эффективного количества композиции, содержащей антитело против NSM. В некоторых вариантах реализации изобретения в этих способах дополнительно предложены в комбинации с другими сопутствующими видами терапии, такими как терапия с блокадой PDL, терапия с блокадой CTLA4, терапия с генерализованной блокадой контрольных точек, при которой блокируются ингибирующие молекулы на Т-клетках, адаптивная терапия Т-клетками, терапия CAR Т-клетками, дендритными клетками или другие клеточные терапии, а также традиционные химиотерапии.

[00218] В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает определение уровня экспрессии белка NSM в биологическом образце, взятом у индивида. В некоторых вариантах реализации изобретения биологический образец включает, но не ограничивается, биологической жидкостью организма, образцом ткани, образцом органа, мочой, калом, кровью, слюной, CSF и любой их комбинацией. В некоторых вариантах реализации биологический образец происходит из опухолевой ткани. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень экспрессии включает уровень экспрессии мРНК кодирующей белок NSM мРНК. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень экспрессии белка NSM включает белковый уровень экспрессии NSM. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень экспрессии белка NSM выявляют в образце с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из FACS, Вестерн блота, ELISA, иммунопреципитации, иммуногистохимического анализа, иммунофлуоресценции, радиоиммуноанализа, дот-блоттинга, методов иммунодетекции, ВЭЖХ, поверхностного плазмонного резонанса, оптической спектроскопии, масс-спектрометрии, ВЭЖХ, кПЦР, кПЦР РВ, мультиплексной

кПЦР или кПЦР ОТ, секвенирования РНК, анализа на микрочипах, SAGE, технологии MassARRAY и FISH, и их комбинаций.

[00219] В другом аспекте изобретения в настоящей заявке предлагаются способы определения присутствия или отсутствия нестимулирующих миелоидных клеток в целом, или определения присутствия или отсутствия конкретных нестимулирующих миелоидных клеток (например, клеток DC1, клеток TAM1 и/или клеток TAM2), включающие: приведение в контакт популяции клеток, содержащей нестимулирующие миелоидные клетки, с антителом против NSM, и определение количества нестимулирующих миелоидных клеток. В другом аспекте изобретения в настоящей заявке предлагаются способы определения присутствия или отсутствия нестимулирующих миелоидных клеток, включающие: приведение в контакт популяции иммунных клеток, содержащей нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки с антителом против NSM; выявление комплекса или фрагмента, показывающего связывание антитела клеткой и необязательно определение количества нестимулирующих миелоидных клеток в популяции. В другом аспекте изобретения предлагаются способы определения относительного соотношения нестимулирующих миелоидных клеток к стимулирующим миелоидным клеткам, включающие: приведение в контакт популяции иммунных клеток, содержащей нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки, с антителом против NSM; определение количества стимулирующих миелоидных клеток и нестимулирующих миелоидных клеток и определение относительного соотношения нестимулирующих миелоидных клеток к стимулирующим миелоидным клеткам.

[00220] В вариантах реализации изобретения, описанных в данном документе, для выявления и/или количественного определения антитело против NSM связывается с белком NSM, но не обязательно должно влиять на биологический ответ, такой как АЗКЦ, хотя это может оказывать воздействие на биологический ответ.

[00221] В другом аспекте в настоящем изобретении предлагаются способы идентификации индивида, который может отвечать на иммунотерапию (например, с помощью антитела против NSM) касательно лечения связанного с иммунной системой патологического состояния (например, ракового заболевания), включающие: выявление уровня экспрессии белка NSM в биологическом образце, взятом у индивида, и определение на основе уровня экспрессии белка NSM того, может ли индивид отвечать на иммунотерапию, причем повышенный уровень белка NSM у индивида относительно здорового индивида указывает на то, что данный индивид может отвечать на иммунотерапию. В некоторых вариантах реализации изобретения эти способы также могут применяться для диагностики у индивида

связанного с иммунной системой патологического состояния (например, ракового заболевания) и основаны на уровне экспрессии белка NSM, причем повышенный уровень белка NSM у индивида относительно здорового индивида указывает на то, что данный индивид страдает от ракового заболевания. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень экспрессии включает уровень экспрессии мРНК кодирующей белок NSM мРНК. В других вариантах реализации изобретения уровень экспрессии белка NSM включает белковый уровень экспрессии белка NSM. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень экспрессии белка NSM выявляют в образце с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из FACS, Вестерн блота, ELISA, иммунопреципитации, иммуногистохимического анализа, иммунофлуоресценции, радиоиммуноанализа, дот-блоттинга, методов иммунодетекции, ВЭЖХ, поверхностного плазмонного резонанса, оптической спектроскопии, масс-спектрометрии, ВЭЖХ, кПЦР, кПЦР РВ, мультиплексной кПЦР или кПЦР ОТ, секвенирования РНК, анализа на микрочипах, SAGE, технологии MassARRAY и FISH, и их комбинаций. В этих вариантах реализации изобретения антитело против NSM связывается с белком NSM, но не обязательно должно оказывать воздействие на биологический ответ, такой как АЗКЦ. В некоторых вариантах реализации биологический образец происходит из опухолевой ткани. В некоторых вариантах реализации изобретения биологический образец включает, но не ограничивается, биологической жидкостью организма, образцом ткани, образцом органа, мочой, калом, кровью, слюной, CSF и любой их комбинацией.

[00222] В данном документе также описан способ усиления у субъекта иммунного ответа на опухоли или усиления эффективности иммунотерапевтических видов лечения. В общем, лечение, которое увеличивает избыток SDC, будет улучшать исход для субъекта, такой как продолжительность выживания без повторного проявления, и будет усиливать эффективность противораковых иммунотерапевтических видов лечения. Лечение может увеличивать относительный или абсолютный избыток клеток SDC в опухоли субъекта. Лечение может уменьшать относительный или абсолютный избыток клеток NSM в опухоли субъекта.

[00223] Типовые способы общей стратегии лечения включают увеличение количества SDC путем системного введения Flt3L. Другой способ представляет собой лечение аутологических клеток костного мозга или клеток крови субъекта с помощью Flt3L при одновременном блокировании CSF1. Экспрессия, например, с помощью ретровируса, факторов транскрипции SDC, таких как IRF8, Myc11 или BATF3, или ZBTB46, в популяциях предшественников клеток костного мозга или крови также могут применяться для управления развитием SDC. Другая стратегия лечения включает системное удаление клеток NSM при избирательном сохранении SDC. Данной действие может создавать общее благоприятное изменение в соотношении этих популяций. Удаление клеток NSM может проводиться

любыми способами, включая введение (системное или локализованное в опухоль) антител против поверхностных белков NSM.

[00224] В некоторых вариантах реализации изобретения улучшающие SDC виды лечения применяют как терапевтическое лечение для того, чтобы дать возможность нативной иммунной системе субъекта лучше бороться или избавляться от рака. В другом варианте реализации изобретения улучшающие SDC виды лечения по данному изобретению применяют в комбинации с терапевтическим лечением, таким как иммунотерапевтическое лечение (такое применение осуществляется перед, одновременно или после иммунотерапевтического лечения), причем улучшающие SDC виды лечения действуют как вспомогательное или адъювантное лечение для увеличения эффективности данного терапевтического лечения.

Способы введения

[00225] В некоторых вариантах реализации изобретения способ, предложенный в данном документе, пригоден для лечения у индивида связанного с иммунной системой патологического состояния. В одном варианте реализации изобретения индивид является человеком, а антитело представляет собой антитело к NSM. В другом варианте реализации изобретения индивидом является мышь, а антитело представляет собой антитело к NSM.

[00226] В некоторых вариантах реализации изобретения способы, предложенные в данном документе (такие как способы усиления иммунного ответа или влияния на блокирование нестимулирующих миелоидных клеток), пригодны для лечения рака и по сути индивид, получающий антитело NSM или антитело против NSM, болен раком. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой солидный рак. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах реализации рак избегает распознавания иммунной системой. В некоторых вариантах реализации рак является иммунореактивным. В конкретных вариантах реализации изобретения рак выбирают из группы, состоящей из меланомы, рака почки, гепатобилиарного рака, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКГШ), рака поджелудочной железы, толстой кишки, мочевого пузыря, простаты, легкого, глиобластомы и рака молочной железы.

[00227] В некоторых вариантах реализации изобретения связанное с иммунной системой патологическое состояние представляет собой связанное с иммунной системой патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией белка NSM на нестимулирующих миелоидных клетках (у людей) или экспрессией гомолога белка NSM у видов, отличных от человека. В некоторых вариантах реализации изобретения связанное с иммунной системой патологическое состояние представляет

собой связанное с иммунной системой патологическое состояние, ассоциированное со сверхэкспрессией белка NSM на нестимулирующих миелоидных клетках по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения сверхэкспрессия мРНК NSM или белка NSM составляет около по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 25 раз, 50 раз или 100 раз выше по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками.

[00228] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело вводят внутривенно, внутримышечно, подкожно, местно, перорально, трансдермально, внутрибрюшинно, интраорбитально, путем имплантации, путем ингаляции, интратекально, интравентрикулярно или интраназально. Для лечения рака можно вводить эффективное количество антитела против NSM. Соответствующую дозировку антитела против NSM можно определять на основе типа ракового заболевания, подлежащего лечению, типа антитела против NSM, тяжести и течения ракового заболевания, клинического состояния индивида, истории болезни индивида и ответной реакции на лечение и усмотрения лечащего врача.

Выявление и количественное определение клеток SDC и NSM

[00229] Изобретение охватывает любую методологию количественного определения клеток SDC и/или NSM. Различные варианты реализации изобретения направлены на идентификацию и количественное определение клеток SDC и/или NSM, например, в образце опухоли. Образец опухоли может представлять собой любую ткань, содержащую опухолевые клетки, полученные из организма пациента, как известно в данной области техники, например, часть опухоли, удаленной при биопсии (например, игольчатой биопсии или штанцевой биопсии, например, штанцевая биопсия с пробойником 4 мм) или практически целые опухоли, которые удаляют хирургическим путем, включая первичные или метастатические клетки. Необходимо отметить, что избыток SDC больше в дистальных участках опухоли, чем в маргинальных участках. В типовом образце эту разницу нужно усреднять, чтобы она не влияла на результаты. Однако, если в образец включено избыточное количество маргинального материала, то это может сместить результат в сторону недостаточного учета избытка SDC.

[00230] В варианте реализации изобретения количество клеток SDC и NSM в образце непосредственно количественно определяют методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS), сходными методиками проточной цитометрии, сортировкой клеток с магнитными гранулами, сортировкой micrograft, методами разделения на основе аффинности клеток и другими способами выделения специфических типов клеток из смешанной популяции клеток. Например, образец опухоли можно дезагрегировать с помощью ферментов для образования суспензии из единичных клеток, как известно в данной области техники. Затем клетки можно метить антителами,

специфическими к белковым или углеводным маркерам, уникальным для каждого типа клеток. Далее можно использовать различные протоколы распределения по гейтам на основе различных меток для разделения фракций клеток методом FACS, или сходные методологии, как известно в данной области техники. Например, как описано в примерах, нанесение меток в суспензии из единичных клеток из дезагрегированных опухолей с помощью флуоресцентно маркированных антител позволяет провести FACS-отделение фракции дендритных клеток от других типов клеток внутри образца и отделение пулов клеток SDC и NSM. Как известно в данной области техники, в таких методологиях может использоваться маркирование либо внеклеточных, либо внутриклеточных маркерных белков.

[00231] Например, в одном протоколе FACS различные типы клеток миелоидного компартмента опухоли могут быть отсортированы следующим образом. Те клетки, которые экспрессируют CD11b и Ly6C, представляют моноциты и нейтрофилы и их можно удалять на основе такой экспрессии. Высокая экспрессия CD24 и низкая экспрессия F4/80 может применяться для различения дендритных клеток (клетки SDC и DC1) от опухолевых макрофагов (TAM1 и TAM2). Две популяции опухолевых макрофагов можно отделять друг от друга по их дифференциальной экспрессии CD11b и CD11c, получая клетки TAM1, являющиеся «CD11b высокими», «MHC класса II низкими» и «CD11c низкими», тогда как клетки TAM2 являются «CD11b низкими», «MHC класса II высокими» и «CD11c высокими». Опухолевым макрофагам у людей свойственно экспрессировать CD14, тогда как DC, как правило, – нет. Примеры отличающихся поверхностных маркеров, которые содействуют различению двух дендритных популяций одной от другой и от макрофагов, включают CD103, XCR1, Clec9a и CD11b у мыши или CD14, BDCA3, XCR1 и Clec9a у человека. Например, в опухолях мышей две популяции дендритных клеток можно отделять по их дифференциальной экспрессии CD11b (отсутствует у SDC, присутствует в клетках NSM) и CD103 (отсутствует в клетках NSM, присутствует в SDC). Сходным образом, SDC в организме человека экспрессируют BDCA3, XCR1 и Clec9a, в то время как нестимулирующие DC экспрессируют BDCA1, а макрофаги экспрессируют CD14.

[00232] В другом варианте реализации изобретения используют прямой гистологический анализ образцов ткани для определения присутствия, частоты распространения и относительного избытка SDC по сравнению с другими типами клеток. Например, можно окрашивать срезы тканей с помощью меченых антител против маркеров SDC и содержащихся в них антигенов, и меченых антител против маркеров NSM и содержащихся в них антигенов. Затем для количественного определения клеток SDC и NSM в образце может применяться анализ срезов меченых тканей методом количественной флуоресцентной микроскопии, а также визуализация относительного физического распределения и локализации таких клеток в образце.

[00233] В другом варианте реализации изобретения избыток SDC и/или избыток клеток NSM в образце определяется косвенно путем отслеживания паттернов экспрессии генов в объеме образца опухоли, исключая необходимость разделять образец на фракции клеток. Количественный анализ генетических маркеров SDC и NSM в объеме опухолевой ткани используют как заменяющее измерение соотношения SDC к клеткам NSM, присутствующим в опухоли. Например, в одном варианте реализации изобретения анализируют целый транскриптом клеток внутри образца опухоли для определения соотношения экспрессии маркерных генов SDC к экспрессии маркерных генов NSM. Должно быть понятно, что такие количественные определения экспрессии маркерных генов можно выполнять используя любое количество инструментов, известных в данной области техники для анализа экспрессии генов.

[00234] В одном варианте реализации изобретения оценку экспрессии маркерных генов в образце опухоли проводят с использованием методик количественной ПЦР, как известно в данной области техники. Такие методики можно выполнять с использованием протоколов для целой транскриптомы из опухоли, как известно в данной области техники, и парами праймеров, способных исключительно к амплификации последовательностей маркерных генов. Имея известные последовательности маркерных генов, в пределах знания специалиста в данной области техники легко создавать для этого праймеры. Должно быть понятно что, как известно в данной области техники, ссылка на «последовательность гена» конкретного гена в контексте количественного определения экспрессии будет относиться к целой или части нуклеотидной последовательности, соответствующей или комплементарной мРНК (или кДНК, полученной из нее), продуцируемой таким геном при экспрессии.

[00235] В другом варианте реализации изобретения экспрессию маркерных генов можно измерять с использованием технологии ДНК-чипов, как известно в данной области техники. Зонды, которые связывают транскрипты маркерных генов, может легко создавать специалист в данной области техники, используя известные последовательности маркерных генов, и они могут использоваться в любом количестве чипов для оценки экспрессии генов и аналитических платформ.

[00236] В другом варианте реализации изобретения количественное определение клеток SDC и NSM выполняется путем мониторинга присутствия или активности генов по ходу транскрипции и белков, определенных как гены и белки, которые регулируются маркерным геном или его продуктом трансляции, и такая активность предсказуемо варьирует в ответ на экспрессию маркерного гена. В другом варианте реализации изобретения функциональные анализы используют для идентификации или количественного определения клеток SDC и NSM, например, благодаря отличающейся иммунологической активности. Например, SDC эффективны при перекрестной презентации

опухолевых антигенов и являются сильными активаторами CD8 Т-клеток, тогда как клетки NSM таковыми не являются. Сходным образом, в то время как клетки NSM демонстрируют высокую степень фагоцитозного поведения, SDC являются сравнительно менее стойкими фагоцитами.

Определение избытка и проведение скрининга

[00237] Различные варианты реализации по данному изобретению направлены на определение в опухоли избытка SDC. Избыток таких клеток можно оценивать различными способами. Такие измерения могут включать относительные измерения или абсолютные измерения и могут включать прямое или косвенное измерение. Например, относительный избыток можно определять путем измерения в образце соотношения SDC к клеткам NSM; измерения в образце соотношения SDC к количеству клеток DC1 или измерения внутри образца соотношения SDC ко всем типам клеток, измерения в образце соотношения SDC к общему количеству миелоидных клеток или измерения в образце соотношения SDC к клеткам HLA-DR⁺. В некоторых вариантах реализации изобретения абсолютный избыток SDC определяют, например, путем измерения общего количества SDC в мл опухолевой ткани или на микрограмм опухолевой ткани. Косвенные измерения включают оценку уровней экспрессии маркерных генов SDC, самостоятельно или в сравнении с уровнями экспрессии маркеров с другими типами клеток, такими как клетки NSM.

[00238] В различных вариантах реализации изобретения избыток SDC в опухоли субъекта представляет собой прогностический показатель, диагностический показатель или показатель для выбора лечения.

[00239] Различные варианты реализации изобретения направлены на сравнительные измерения, такие как «повышенный» или «увеличенный» избыток SDC. Такие сравнительные измерения могут выполняться путем сравнения образца, взятого у субъекта, с репрезентативными образцами. Репрезентативные образцы могут включать, например, образцы, полученные у того же субъекта в более ранний момент времени, образцы, полученные у подобных субъектов (например совпадающих по возрасту, полу, показателям здоровья, прогрессирования рака, типа рака и т. п.) или образцы, полученные из подобных опухолей (например, совпадающих по типу опухоли, стадии развития опухоли и другим параметрам прогрессирования опухоли). В некоторых вариантах реализации изобретения, например, в которых оценивается эффективность лечения, повышенный избыток определяют как избыток больше наблюдаемого в репрезентативных образцах, взятых у не получавших лечение субъектов. В некоторых вариантах реализации изобретения измерение типичного или среднего избытка SDC применяют как исходный уровень для определения того, в чем заключается повышенный или увеличенный избыток, например, может применяться среднее значение, медианное или сходное

статистическое значение SDC в репрезентативных образцах. Для определения количеств, которые значимо повышены или увеличены могут применять различные статистические методологии, известные в данной области техники.

[00240] В одном варианте реализации изобретения избыток SDC в опухоли субъекта включает прогностический показатель, при котором исход для субъекта ожидается на основании избытка SDC в опухоли субъекта, причем повышенный избыток является показателем большей вероятности положительного исхода. Типовые показатели исхода включают вероятность выживаемости без повторного проявления, предполагаемая продолжительность выживаемости без повторного проявления, предполагаемая продолжительность общей выживаемости, риск рецидива, качество показателей жизни и т. п. Например, в одном варианте реализации изобретения соотношение SDC к клеткам NSM в образце опухоли, измеренное либо прямо, либо косвенно, используют как показатель избытка SDC и предполагаемую продолжительность выживаемости без повторного проявления, являющуюся показателем исхода для субъекта. Например, среднее или медианное соотношение экспрессии маркерных генов SDC к экспрессии маркерных генов NSM, наблюдаемое в пуле подобных образцов опухоли может служить пороговым значением и, если измеренное соотношение для отдельного субъекта превышает указанный порог, то субъект считается имеющим увеличенную вероятность выживаемости без повторного проявления.

[00241] В одном варианте реализации изобретения избыток SDC в опухоли субъекта является показателем вероятности того, что субъект положительно отвечает на иммунотерапевтическое лечение, причем повышенный избыток SDC в образце опухоли, полученной у субъекта, является показателем большей вероятности положительного исхода иммунотерапии. Например, в одном варианте реализации изобретения соотношение SDC к клеткам NSM в образце опухоли, измеренное прямо или косвенно, используют как показатель избытка SDC. Например, среднее или медианное соотношение экспрессии маркерных генов SDC к экспрессии маркерных генов NSM, наблюдаемое в пуле подобных образцов опухоли может служить пороговым значением и, если измеренное соотношение для отдельного субъекта составляет ниже указанного порога, то субъект считается имеющим уменьшенную вероятность положительного ответа на иммунотерапию.

[00242] Предвидение того, какие субъекты будут с большей вероятностью поддаваться лечению с помощью иммунотерапевтического способа, предпочтительно позволяет выбирать надлежащее терапевтическое вмешательство. Субъекты, считающиеся с меньшей вероятностью отвечающими на иммунотерапевтическое лечение, могут направляться на другие способы лечения, тогда как субъект с большей вероятностью отвечающий на иммунотерапию может подвергаться лечению

соответствующим образом. Показатели выбора лечения по данному изобретению применяются для предвидения восприимчивости или невосприимчивости к любой противораковой иммунотерапии, известной в данной области техники. Например, один класс противораковых видов иммунотерапии известен как лечение с «блокадой контрольных точек». Иммунная система млекопитающих включает различные «контрольные точки», которые являются самолимитирующими ингибирующими механизмами, которые в обычном состоянии действуют в направлении ослабления иммунных реакций и предотвращения аутоиммунных реакций. Было показано, что опухоли обходят эти механизмы таким образом, что иммунный ответ против опухоли подавляется. В различных терапевтических стратегиях, известных как блокады контрольных точек, задействуется применение лигандов, таких как антитела, для блокирования этих контрольных точек и ингибирования иммунных реакций для супрессии опухоли и для избегания иммунного ответа против опухоли. Другой класс видов иммунотерапии охватывает стратегии на основе использования клеток, например, удаления клеток, таких как дендритные клетки, из организма субъекта и пролиферации и активации ex-vivo таких клеток против опухолевых антигенов. Активированные клетки затем повторно вводят в организм для усиления иммунного ответа субъекта против опухоли.

[00243] В данном описании, содержащемся в данном документе, представлена область техники с новыми взаимосвязями между избытком SDC и исходом для субъекта и/или восприимчивости субъекта к иммунотерапевтическому лечению. В данном изобретении широко охватываются любые применения этих концепций. В пределах знаний специалиста в данной области техники находится осуществление идей изобретения путем развития предсказуемых взаимосвязей между конкретными показателями избытка SDC и конкретными показателями исхода для субъекта или восприимчивости к конкретным видам иммунотерапевтического лечения, для любого конкретного типа или подтипа рака. Такие предсказуемые взаимосвязи могут охватывать любую статистическую схему, которая воплощает феномен, благодаря которому увеличенный избыток SDC является показателем улучшенного исхода для субъекта или увеличенной восприимчивости к иммунотерапевтическому лечению.

[00244] В одном варианте реализации изобретение включает предсказуемую взаимосвязь, при которой соотношение экспрессии маркерных генов SDC к экспрессии маркерных генов NSM применяется как показатель избытка SDC относительно избытка иммунных клеток NSM, а повышенная пропорция SDC является прогностическим фактором большей вероятности выживаемости субъекта. Например, как описано в примерах, проанализировали большой пул данных экспрессии генов из 3602 образцов опухолей, представляющих 12 различных типов рака (данные из проекта TCGA pan-cancer), в котором для каждого образца опухоли были получены связанные с субъектом данные о выживаемости. Для каждого образца рассчитывали средние наблюдаемые уровни экспрессии

(измеренные в относительных единицах интенсивности по нормализованному набору данных) всех маркерных генов SDC в таблице А и брали их как показатель избытка дендритных иммунных клеток SDC. Аналогичным образом, для каждого образца рассчитывали наблюдаемые средние уровни экспрессии всех маркерных генов NSM в таблице А и брали их как показатель избытка дендритных иммунных клеток NSM. Соотношение сигналов избытка клеток SDC и NSM для каждого образца затем рассчитывали, преобразовывали в логарифмические, а Z-оценку нормализовали для превращения медианы в 0, а стандартного отклонения в 1 по всему массиву данных. Для каждого типа рака рассчитывали медианное значение соотношения генной экспрессии маркерных генов SDC к NSM. Для каждого типа рака пул образцов делили на «высокое» соотношение SDC к NSM или «низкое» соотношение SDC к NSM, где высокий пул охватывает все образцы со стандартизированным соотношением выше медианного значения для всей популяции подобных образцов (совпадающих на основе типа рака), а низкий пул охватывает все образцы со стандартизированным соотношением ниже медианного значения. Для оценки связи между общей выживаемостью и соотношением сигнатур SDC/NSM, как дихотомической переменной (разбивающей медиану по типу рака) использовали метод Каплана-Мейера. Как изображено на фигурах, данные ясно показывают, что частоты общей выживаемости существенно увеличены в высоком пуле по сравнению с низким пулом.

[00245] Соответственно, соотношение экспрессии маркерных генов SDC к экспрессии маркерных генов NSM в образце является предсказуемым для общего времени выживаемости для субъекта, от которого получен образец, причем повышенное соотношение является показателем увеличенной общей выживаемости. В этом случае «повышенное» определяют как соотношение, превышающее медианное значение соотношения для такого типа рака. Соответственно, в одном варианте реализации в изобретении содержится способ предвидения большего общего времени выживаемости субъекта (относительно субъектов с низким соотношением сигнатур SDC/NSM) путем: (1) расчета прошедшего z-оценку и log-преобразование соотношения средней экспрессии маркерных генов SDC к средней экспрессии маркерных генов NSM в образце опухоли, полученной из организма субъекта; и последующего сравнения наблюдаемого для субъекта соотношения с пороговым значением, представляющим значение соотношения медианной экспрессии маркерных генов SDC к экспрессии генов NSM для данного типа рака образца опухоли; причем указывается большая средняя общая продолжительность выживаемости, если значение соотношения для образца превышает пороговое значение.

[00246] Следует учитывать, что типовые способы расчета избытка SDC, представленные в данном документе, являются иллюстративными и могут быть модифицированы различными путями. Например, можно использовать поднаборы генов из таблицы А. Например, в одном варианте

реализации изобретения применяют SDC-маркеры BDCA3, KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, и CLEC9A, и NSM-маркеры MRC1, MS4A7, C1QC, APO E, C1QB, C1QA и C5AR1. Аналогичным образом, можно изменять конкретные математические операции, используемые для расчета соотношений экспрессии генов, например, log-преобразованные значения лучше суммировать и усреднять, чем проводить log-преобразование усредненных значений и т. п. Поскольку конкретная методология представляет соотношение уровня экспрессии маркерных генов SDC к уровню экспрессии маркерных генов NSM в образце, то точный характер и последовательность математических операций, используемых для расчета данного соотношения, не являются существенными.

[00247] В альтернативных вариантах реализации изобретения избыток NSM можно измерять как количество клеток NSM на общее количество живых опухолевых клеток, количество клеток NSM на общее количество опухолевых иммунных клеток, количество клеток NSM на единицу объема образца опухоли или количество клеток NSM на единицу массы (например, мг) образца опухоли. Аналогичным образом избыток SDC можно измерять как количество клеток SDC на общее количество живых опухолевых клеток, количество клеток SDC на общее количество опухолевых иммунных клеток, количество клеток SDC на единицу объема образца опухоли или количество клеток SDC на единицу массы (например, мг) образца опухоли.

[00248] Общее содержание миелоидных клеток в образце можно оценивать как общее количество клеток CD11b+ в образце. Общее содержание миелоидных клеток в образце можно определять как все клетки, экспрессирующие CD14, плюс все клетки, экспрессирующие CD16, плюс все клетки, экспрессирующие HLA.

[00249] В одном варианте реализации изобретения избыток клеток SDC оценивают как процентное содержание HLA-DR положительных миелоидных клеток в образце, экспрессирующих маркер SDC, проточными цитометрическими методами. Например, маркер SDC может представлять собой BDCA3 или XCR1, или Clec9a.

[00250] Авторами изобретения было предпочтительно открыто настоящим описанием, что избыток CD14, экспрессируемого (CD14+) макрофагами и моноцитами, может использоваться как показатель избытка нестимулирующих клеток либо для стратификации пулов субъектов с целью более точного прогнозирования исхода ракового заболевания, либо оценки эффективности лечения. Макрофаги CD14+ могут конкурировать со стимулирующими дендритными клетками и, таким образом, достижение равновесия клеток CD14+ и клеток SDC в миелоидном пуле может быть важной детерминантой исхода ракового заболевания. Пропорция клеток CD14+ может модулировать влияния избытка SDC. В одном варианте осуществления альтернативный показатель избытка NSM определяют

как избыток в образце миелоидных клеток CD14+. В одном варианте реализации изобретения избыток миелоидных клеток CD14+ измеряют как процентное содержание от общего количества миелоидных клеток CD11b+, экспрессирующих CD14. В другом варианте реализации изобретения процентное содержание HLA-DR положительных клеток, которые экспрессируют CD14, применяют как показатель избытка клеток CD14+. В другом варианте реализации изобретения избыток миелоидных клеток CD14+ измеряют как процентное содержание от общего количества иммунных клеток, экспрессирующих CD45. В другом варианте реализации изобретения избыток миелоидных клеток CD14+ измеряют как количество клеток CD14+ на грамм образца ткани или на подобный показатель.

[00251] В одном варианте осуществления по данному изобретению избыток SDC измеряют как процентное содержание миелоидных клеток, экспрессирующих HLA-DR+, которые также экспрессируют маркер SDC, например, BDCA3 или XCR1. В одном варианте реализации изобретения таким образом измеренный избыток SDC используют как прогностический показатель, показатель эффективности лечения или показатель восприимчивости субъекта к конкретному лечению, причем повышенный избыток SDC является показателем положительного прогноза, положительного ответа на лечение или большей вероятности восприимчивости к конкретному лечению, а меньший избыток SDC является показателем плохого прогноза, неэффективного лечения или более низкой вероятности восприимчивости к конкретному лечению. Например, избыток SDC (например, клеток BDCA3+) на 1-4, 1-2, 1, 2, 3, 4, 5 или 1,37 % или больше клеток HLA-DR+ может считаться повышенным избытком SDC. Например, субъекты, имеющие опухоли с 1-5, 1-4, 1-2, 1, 2, 3, 4, 5 или 1,37 % или больше содержащих HLA-DR+ клеток SDC, имеют более чем 50 % вероятность положительного ответа на иммунотерапевтическое лечение, такое как применение антител против PD1, например, более чем 85 % вероятность положительного ответа.

[00252] В одном варианте реализации изобретения лечение оценивается как иммуностимулирующее или иммунотерапевтическое лечение. Например, лечение может включать лечение, которое нацелено на белок 1 программируемой гибели клеток (PD1) или лиганд 1 программируемой гибели клеток (PD-L1). Например, виды лечения с применением антител против PD1 включают ниволумаб (Opdivo™), пембролизумаб (Keytruda™). Другое сходное лечение нацелено на CTLA-4, например, с помощью ипилимумаба (Yervoy™). В одном варианте реализации изобретения вероятность того, что субъект ответит на терапию против PD1, оценивают путем измерения избытка клеток SDC в опухоли субъекта, например, при этом избыток клеток SDC оценивают как процентное содержание HLA-DR+ миелоидных клеток, которые экспрессируют маркер SDC (например, BDCA3), причем повышенный избыток клеток SDC является показателем того, что субъект благоприятно ответит на лечение с применением антител против PD1, а меньший избыток клеток SDC в опухоли является показателем,

что субъект плохо ответит на лечение с применением антител против PD1. В одном примере повышенный избыток клеток SDC определяют как 4 % или больше HLA-DR+ миелоидных клеток, а меньший избыток клеток SDC определяют как менее 4 % миелоидных клеток HLA-DR+ в образце опухоли. В одном варианте реализации изобретения субъектом является субъект с меланомой. Вышеуказанная методология может использоваться сходным образом для оценки эффективности лечения с применением антител против PD1, наблюдаемое увеличение избытка клеток SDC после лечения является показателем того, что лечение эффективное. Аналогичным образом, могут быть идентифицированы предполагаемые ингибиторы PD1 как средства, которые увеличивают избыток клеток SDC, например, путем измерения в виде процентного содержания клеток HLA-DR+, которые являются клетками BDCA3+.

[00253] В одном варианте реализации в изобретении содержится способ скрининга для идентификации композиции (или другого типа способа лечения), который усиливает избыток SDC. Например, животное, имеющее опухоль, можно подвергать воздействию предполагаемого усилителя избытка SDC, а затем, с использованием средств и способов по данному изобретению, можно оценивать избыток SDC, причем усиление избытка SDC по сравнению, например, с нелеченными контролями или образцами, полученными у того же субъекта перед лечением, является показателем того, что лечение проведено эффективным усилителем избытка SDC. Такой избыток SDC может включать любой показатель избытка SDC, включая относительные и абсолютные показатели SDC, например, соотношение SDC к клеткам NSM, или их косвенные показатели.

Наборы и изделия

[00254] В настоящей заявке предлагаются наборы, содержащие одно или более композиций антител, описанных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения наборы дополнительно содержат компонент, выбранный из любого вторичного антитела, реактивы для иммуногистохимического анализа, фармацевтически приемлемый наполнитель и инструкцию по применению, и любые их комбинации. В одном конкретном варианте реализации изобретения набор содержит фармацевтическую композицию, содержащую любую одну или более композиций антител, описанных в данном документе, с одним или более фармацевтически приемлемых наполнителей.

[00255] В одном аспекте изобретения набор может быть составлен из реактивов, биологических материалов и других компонентов для облегчения измерения количества клеток SDC и NSM. Например, в одном варианте реализации изобретения набор может включать антитела, включая флуоресцентно меченные антитела, которые направлены на миелоидные клетки, общие маркеры дендритных клеток, маркеры клеток SDC и маркеры клеток NSM для облегчения проведения FACS или

других методик сортировки клеток или проточной цитометрии для количественного определения клеток SDC и/или NSM внутри образца. Например, для облегчения FACS-отделения фракций SDC и NSM для мышей может применяться набор, содержащий различным образом меченные антитела к CD45, CD11c, Ly6C, MHCII, CD24, F4/80, CD11b и CD103 мыши, тогда как для человека могут применяться антитела к CD45, CD11c, CD14, HLA-DR, BDCA1 и BDCA3.

[00256] В другом варианте реализации изобретения в наборе может содержаться ряд праймеров ПЦР для амплификации одного или более генных маркеров SDC или одного или более генных маркеров NSM. В одном варианте реализации изобретения набор праймеров ПЦР содержит ряд праймеров, способных к исключительной амплификации одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или всех маркеров SDC, перечисленных в таблице А, и одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или больше девяти маркеров NSM, перечисленных в таблице А. В другом варианте реализации изобретения набор праймеров ПЦР содержит ряд праймеров, исключительно способных амплифицировать BDCA3, KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, VTLA, MYCL1, CLEC9A, MRC1, MS4A7, C1QC, APO E, C1QB, C1QA и C5AR1.

[00257] Набор может включать два или более зондов, содержащих субпоследовательности генных маркеров SDC или NSM для связывания и/или введения метки в транскрипты или кДНК SDC или NSM. В другом варианте реализации изобретения набор содержит микрочип или другой твердый субстрат, несущий на себе иммобилизованные зонды, содержащие одну или более последовательностей маркерных генов SDC или NSM, для связывания и количественного определения опухолевых инфильтрирующих транскриптов SDC или NSM, или полученной из них кДНК. В одном варианте реализации изобретения чип содержит ряд зондов, соответствующих одному, двум, трем, четырем, пяти, шести, семи, восьми, девяти или всем маркерам SDC, перечисленным в таблице А, и одному, двум, трем, четырем, пяти, шести, семи, восьми, девяти или больше девяти маркерам NSM, перечисленным в таблице А. В другом варианте реализации изобретения чип содержит ряд зондов, соответствующих BDCA3, KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, VTLA, MYCL1, CLEC9A, MRC1, MS4A7, C1QC, APO E, C1QB, C1QA и C5AR1.

[00258] Набор может содержать ряд праймеров ПЦР, исключительно амплифицирующих в образце генные последовательности KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, VTLA, MYCL1 и CLEC9A. Набор может содержать ряд праймеров ПЦР, способных исключительно амплифицировать в образце генные последовательности C5AR1, LYVE1, ABCC3, MRC1, SIGLEC1, STAB1, C1QB, C1QA, TMEM37, MERTK, C1QC, TMEM119, MS4A7, APO E, CYP4F18, TREM2 и TLR7. Набор может содержать ряд праймеров ПЦР, способных исключительно амплифицировать в образце генные

последовательности MRC1, MS4A7, C1QC, APO E, C1QB, C1QA и C5AR1. Олигонуклеотидный чип может содержать иммобилизированные зонды, способные к связыванию генных последовательностей KIT, CCR7, BAF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, BDC3A, XRC1 и CLEC9A. Олигонуклеотидный чип может содержать иммобилизированные зонды, способные к связыванию генных последовательностей C5AR1, LYVE1, ABCC3, MRC1, SIGLEC1, STAB1, C1QB, C1QA, TMEM37, MERTK, C1QC, TMEM119, MS4A7, APO E, CYP4F18, TREM2 и TLR7. Олигонуклеотидный чип может содержать иммобилизированные зонды, способные к связыванию генных последовательностей MRC1, MS4A7, C1QC, APOE, C1QB, C1QA и C5AR1.

[00259] В настоящей заявке также предлагаются изделия, содержащие одну или более композиций антител или наборов, описанных в данном документе. Примеры изделий включают флакон (включая герметично закупоренные флаконы).

ПРИМЕРЫ

[00260] Ниже приведены примеры конкретных вариантов реализации для осуществления настоящего изобретения. Примеры представлены только с иллюстративными целями и никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Были предприняты усилия, чтобы обеспечить точность в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т. д.), но, конечно, следует допускать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения.

[00261] При практической реализации настоящего изобретения должны применяться, если не указано иное, традиционные методы химии белков, биохимии, технологии рекомбинантных ДНК и фармакологии, соответствующих данной области техники. Такие технологии подробно описаны в литературе. См., например, Т. Е. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and Company, 1993); А. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry 3rd Ed.* (Plenum Press) Vols A and B(1992).

Пример 1. Материалы и методы для примеров 1-9.

[00262] Опухоли мышей

[00263] Трансгенных мышей-основателей C57BL/6 *PyMT-ChOVA*, как описано (Engelhardt et al., 2012), и их потомков подвергали скринингу на наличие трансгена *PyMT-ChOVA* методом ПЦР, отслеживали на появление опухолей и использовали в возрасте 20-30 недель. B78ChOVA, представляющий собой вариант B78 (Graf et al., 1984), создавали как описано в дополнительных методах. Вся дополнительная информация по линиям может быть найдена в дополнительных методах. Всех мышей содержали в условиях SPF (свободных от патогенной микрофлоры) в соответствии с NIH и стандартами Американской ассоциации по уходу за лабораторными животными, и согласно с правилами по уходу UCSF.

[00264] Проточная цитометрия

[00265] Все антитела приобретали в компаниях BD Pharmingen, eBioscience, Invitrogen, Biolegend, UCSF hybridoma core или получали в лаборатории Krummel Lab. Для поверхностного окрашивания клетки инкубировали с антителом против Fc-рецептора (клон 2. 4G2) и окрашивали антителами в ФСБ + 2 % FCS в течение 30 мин на льду. Жизнеспособность оценивали окрашиванием устранимым красителем для живых/мертвых клеток Zombie (Biolegend) или DAPI. Для внутриклеточного окрашивания мышам за 6 часов до сбора инъекцией вводили 10 мкг/грамм массы тела брефельдина А (Cauman), клетки окрашивали антителами против поверхностных маркеров, затем фиксировали 2 % PFA в течение 10 мин при 25°C и пропитывали 0,2 % сапонином, затем окрашивали целевым антителом. Все анализы проточной цитометрии выполняли на проточном цитометре BD Fortessa. Анализ данных проточной цитометрии делали с использованием Flowjo (Treestar). Сортировку клеток выполняли с использованием BD FACS Aria II.

[00266] Биоинформационный анализ TCGA

[00267] В клинических анализах экспрессии применяются уровни мРНК с широтой охвата генома (секвенирование мРНК от Illumina), полученные из 3602 образцов опухолей пациентов, представляющих 12 типов рака (845 – молочной железы, 265 – яичника, 303 – плоскоклеточного рака головы и шеи, 122 – мочевого пузыря, 168 – глиобластомы, 190 – толстой кишки, 173 AML, 72 – прямой кишки, 355 – аденокарциномы легкого, 259 – плоскоклеточного рака легкого, 480 – почки и 370 рака матки), нормализованные и скомбинированные в один набор данных рабочей группой TCGA PanCancer, как опубликовано (Cancer Genome Atlas Research et al., 2013; Hoadley et al., 2014) (данные находятся на портале данных TCGA <https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/> и доступны как syn1715755 на сайте <https://www.synapse.org/>). Соотношение сигнатуры CD103⁺/CD103⁻ рассчитывают как log средней величины экспрессии генов CD103⁺DC, деленное на среднюю экспрессию гена CD103⁻DC, с последующей стандартизацией по z-оценке (среднее значение=0, со=1; перечень генов на Фиг. 8С).

Авторы также оценивали опубликованные данные для сигнатур Т-клеток (Palmer et al., 2006), пролиферации (Wolf et al., 2014), CSR/закрепления (Chang et al., 2005) и интерферона гамма (Viigimaa et al., 2010) согласно публикаций вместе с соотношением экспрессии CD8/CD68 (DeNardo et al., 2011). Данные по общей выживаемости получены из портала TCGA (скачаны 6/2013) (Cancer Genome Atlas Research et al., 2013), а анализ выживаемости выполняли с использованием моделирования с пропорциональными рисками по Коксу в многовариантной модели, корректирующей тип ракового заболевания. Log-ранги р-значений использовали для оценки значимости после корректировки для сравнения множественных сравнений с использованием метода Бенджамини-Хохберга (Benjamini and Hochberg, 1995). Графики выживания Каплана-Мейера получают с использованием Пакета для определения выживаемости в R. В КМ-графике со всеми данными (Фиг. 8E), авторы «скорректировали» тип ракового заболевания путем классификации каждого образца как «высокого» или «низкого» с использованием медианного значения таких типов рака по соотношению сигнатуры CD103⁺/CD103⁻.

[00268] Информация о линиях мышей

[00269] Мышей OT-I, специфических по пептиду овальбумина SIINFEKL (SL8) в контексте H-2Kb (Hoquist et al., 1994), скрещивали с мышами CD45.1 *Nur77-eGFP* (Moran et al., 2011) и мышами *Cd2-RFP* (Veiga-Fernandes et al., 2007) или с мышами *актин-CFP* (Hadjantonakis et al., 2002) для получения закодированными по геному, флуоресцентно или конгенно меченых Т-клеток для адоптивного переноса, экспериментов по визуализации и активации.

[00270] Для модуляции популяций миелоидных клеток в опухолях использовали следующие линии мышей: C57BL/6, приобретенную у Simonsen, *Irf4^{flx}* x CD11c-Cre (Klein et al., 2006), (Williams et al., 2013), любезно предоставленную Anne Sperling из Чикагского университета, *Irf8^{-/-}* FVBN (Ouyang et al., 2011), любезно предоставленную Scott Kogan из UCSF, *Zbtb46* –DTR (Meredith et al., 2012), *Csf2rb^{-/-}* (Robb et al., 1995) и *Csf3r^{-/-}* (Liu et al., 1996).

[00271] Для визуализации APC внутри опухолей, *PyMT-ChOVA* трансгенных мышей скрещивали с мышами *Cx3cr1-eGFP* (Jung et al., 2000) и *Cd11c-mCherry* (Khanna et al., 2010) и для экспериментов по визуализации использовали получаемое поколение F1, несущее оба трансгена.

[00272] Линии клеток, культивирование клеток, плазмиды и трансфекция

[00273] Перед инъекцией в организм мышей следующие линии опухолевых клеток культивировали в стандартных условиях. B16-F10 (Fidler, 1975), B16-GMCSF (Dranoff et al., 1993), B16-

FLT3L (Curran and Allison, 2009), любезно переданная Larry Fong, B78-исходная (Graf et al., 1984), B78chOVA, исходная B78, трансфицированная гибридной конструкцией Ch-OVA, идентичной использованной в PyMTChOVA (Engelhardt et al) путем использования стандартных методов, EL4 (Hyman et al., 1972), EG7 (Moore et al., 1988), EG7-chOVA, Vo-PyMT-люцифераза-FVB, любезно предоставленная Zena Werb из UCSF (Halpern et al., 2006) и LLC, любезно предоставленная Lewis Lanier из UCSF (Bertram and Janik, 1980). B78p-mCherry-pHlourin получали путем трансфекции исходных клеток B78 с помощью липофектамина в соответствии с инструкциями производителя из конструкции N1-mCherry-pHlourin (Koivusalo et al., 2010; Webb et al., 2011; Choi et al., 2013).

[00274] Вкратце, прикрепленные клетки культивировали при 37°C/5 % CO₂ в среде DMEM плюс 10 % FCS с пен/стреп/глут на обработанных для тканевой культуры пластиковых планшетах и пересевали через день. Суспензионные клетки культивировали в RPMI-1640 плюс 10 % FCS и пен/стреп/глут в колбах и пересевали через день.

[00275] Инъекции эктопических опухолей

[00276] Собирали линии опухолевых клеток и промывали 3 раза ФСБ, затем смешивали в соотношении 1:1 с матрицей Matrigel с пониженным содержанием факторов роста (BD Biosciences) до получения конечного объема инъекции 50 мкл. Инъекции 100000 опухолевых клеток (если не указано иное) в правый бок выбритых мышей подкожно и перед использованием давали возможность расти в течение 14-21 суток.

[00277] Дезагрегация опухолей

[00278] Из организма мышей вырезали опухоли *PyMT-chOVA* и эктопические опухоли B78chOVA и определяли общую массу удаленной опухолевой ткани. Затем опухоли измельчали с использованием скальпелей и дезагрегировали с помощью 500 Ед/мл коллагеназы IV (Sigma), 100 Ед/мл коллагеназы I (Worthington) и 200 мг/мл ДНКазы I (Roche) на 0,3 грамма массы опухоли в течение 3х интервалов по 30 минут в колбе Эрленмейера на 25 мл с магнитной мешалкой и помещенной на перемешивающее устройство в инкубатор на 37°C с 5 % CO₂. Затем через интервалы каждые 30 минут опухоли пропускали через сито для клеток размером 70 мкм для удаления больших кусков недезагрегированной опухоли, а оставшиеся хлопья повторно вносили на дезагрегирование, тогда как выделенные клетки хранили на льду. Затем при 4°C выполняли положительный отбор на CD45-биотин с магнитными гранулами (StemSep) для обогащения общего опухолевого иммунного инфильтрата.

[00279] Образцы из организма человека

[00280] Ткань интенсивно измельчали хирургическими ножницами и переносили в колбу Эрленмейера на 25 мл с магнитной мешалкой, с 3 мг/мл коллагеназы А (Roche) и 50 Ед/мл ДНКазы I (Roche) на 0,3 г ткани в течение 1 часа при 37°C/5 % CO₂ при постоянной перемешивании. Затем образцы фильтровали через фильтр с размером пор 70 мкм, центрифугировали и ресуспендировали для окрашивания (Ruffell et al., 2012). При получении всех образцов из организма людей у всех субъектов получали проинформированное согласие и выполняли работу в соответствии с разрешением IRB (номер IRB 13-12246, 12/06/2013- 12/05/2014).

[00281] Выделение клеток

[00282] ОТ-I наивные CD8⁺ Т-клетки выделяли из лимфатических узлов и селезенки мышей от 6- до 12-недельного возраста. Отбор проводили с помощью набора для выделения отрицательных по CD8 клеток (Stemcell Technologies), следуя инструкциям производителя. KMDC получали культивированием клеток костного мозга в течение 8–11 суток, высаживая на планшеты по 1-2x10⁶ клеток/мл в IMDM с 10 % FCS и GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор). В последние 2 суток культивирования добавляли ИЛ-4, а за 12 часов перед использованием полностью созревших клеток KMDC добавляли LPS.

[00283] Нанесение меток eFluor670 на Т-клетки

[00284] ОТ-I CD8⁺ Т-клетки инкубировали в RPMI без FCS с 2 мкМ eFluor670 (eBioscience) в течение 15 минут при 37°C. Краситель eFluor670 затем гасили 2 мл FCS и промывали в RPMI с 10 % FCS 3 раза перед применением.

[00285] Общая активация Т-клеток (получение CTL)

[00286] Трансгенные клетки ОТ-I TCR лимфатических узлов стимулировали с помощью спленоцитов В6, активированных с помощью 100 нг/мл пептида SL8 в течение 30 минут, затем промывали 3X. Клетки размножали в присутствии 2 Ед/мл рекомбинантного ИЛ-2 человека через двое суток после стимуляции и снова через четверо суток после стимуляции, и использовали для экспериментов через 2-3 суток.

[00287] Анализы пролиферации Т-клеток

[00288] Клетки лимфатических узлов выделяли из трансгенных мышей ОТ-I TCR и обогащали по наивным CD8⁺ Т-клеткам методом обогащения по CD8 StemSep (Stemcell technologies) или, и/или применяли общую активацию культур CTL. Клетки лимфатических узлов выделяли из трансгенных

мышей OT-II TCR и обогащали по наивным CD4⁺ Т-клеткам методом обогащения по CD4 StemSep (Stemcell technologies). 20000 обогащенных наивных клеток CD8 или 5-суточные предварительно активированные OT-I Т-клетки, или наивные клетки CD4, меченые с помощью 2 мкМ eFluor670, смешивали либо с 4000 KMDC, активированными или нет с помощью 25 нг/мл пептида SL8 (OT-I) или 1 мкг/мл пептида pOVA 323-339 (OT-II), либо с 4000 неактивированных опухолевых APC (если не указано иное), в 96-луночных планшетах с V-образным дном в любой момент из 12, 48 или 72 часов при 37°C/5 % CO₂, при этом момент активации измеряли путем повышения экспрессии CD69/Nur77 и разведением eFluor670 посредством проточной цитометрии.

[00289] Анализ связывания

[00290] Анализы связывания выполняли по описанию (Friedman et al., 2006). Вкратце, меченые Т-клетки смешивали с суспензией из единичных окрашенных клеток из дезагрегатов опухолей в течение 30 мин - 1 часа, а затем фиксировали с помощью 2 % PFA для проточной цитометрии. Процентные значения связывания рассчитывали как число агрегатов Т-клеток к общему количеству Т-клеток.

[00291] Визуализация методом многофотонной микроскопии *in vivo* и хирургическое вмешательство

[00292] Животных поддерживали под анестезией с использованием изофлурана на подогретом столике для микроскопии и глубину анестезии отслеживали через равные интервалы в соответствии с институционными руководствами. Перед хирургическим вмешательством животным в. в. инъецировали 100 мкг красителя Evans Blue в ФСБ и 1 мл раствора Рингера с лактатом в. б. Хирургическим путем раскрывали молочные железы и визуализировали опухоли посредством модифицированной версии окна поглощения, описанной авторами ранее (Thornton et al.). Прижизненную визуализацию выполняли с использованием специально изготовленной двухфотонной приставки, оборудованной двумя инфракрасными лазерами (MaiTai:Spectra Physics, Chameleon:Coherent). Лазер MaiTai настраивали на длину волны 870 нм или 910 нм для одновременного возбуждения CFP и GFP или, соответственно, одного GFP. Возбуждение лазера Chameleon настраивали на 1030 нм для возбуждения mCherry. Излучаемый свет детектировали с использованием 25x 1.2NA водяных линз (Zeiss), соединенных с 6-цветной решеткой детектора (специальной; используя детекторы Hamamatsu H9433MOD), для получения 12 каналов детектирования использовали чередующееся лазерное возбуждение. Использовали эмиссионные фильтры: фиолетовый 417/50, синий 475/23, зеленый 510/42, желтый 542/27, красный 607/70, инфракрасный 675/67. Микроскоп управлялся программным пакетом MicroManager, изображения срезов по z-оси получали с помощью 4-кратного усреднения, а интенсивности по z-оси составляли 3 мкМ. Анализ данных проводили с использованием программного пакета Imaris (Bitplane).

[00293] Окрашивание срезов опухолей *ex vivo* и многофотонная визуализация

[00294] Животных умервщляли и собирали опухоли. Удаляли закрывающий жир и опухоли заливали в 2 % легкоплавкую агарозу в ФСБ (SeaPlaque, Lonza). Готовили срезы толщиной 300 мкм с использованием микротомы для тканей Compresstome VF-200, Precisionary Instruments Inc. Срезы прикрепляли к пластиковым покровным стеклам с использованием Vetbond (3M) и окрашивали с помощью Alexa647-меченого крысиного антитела против CD11b в RPMI с добавкой 5 % сыворотки крысы в течение 2 часов при 37°C/5 % CO₂. Срезы промывали в RPMI и визуализировали с использованием конфокального микроскопа Nikon A1R.

[00295] Выделение РНК, анализ Fluidigm и секвенирование РНК

[00296] Непосредственно в 300 мкл тризола LS сортировали 4000-20000 клеток, быстро замораживали и немедленно помещали на хранение при -80°C до проведения выделения. РНК выделяли фенол-хлороформным методом и осаждением этанолом. Затем образцы обрабатывали ДНКазой I и синтезировали кДНК с использованием Superscript III (Invitrogen). Для анализа Fluidigm с использованием кПЦР в нанолитровом диапазоне предварительно амплифицировали кДНК (12 циклов) посредством специфической к мишени амплификации с 2X мастер-китом Taqman PreAmp (Applied Biosystems), а затем обрабатывали экзонуклеазой I для удаления невключенных праймеров. Затем образцы и праймеры (целевые праймеры разрабатывали с использованием банка праймеров Гарварда: <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) наносили на динамический чип Dynamic Array 48.48 с 2X смесью SsoFast EvaGreen Super Mix (Bio-Rad) и проводили анализ на BioMark HD. Для секвенирования РНК выделяли образцы с использованием набора для выделения РНК Arcturus PicoPure (Life Technologies), проводили биоанализ и передавали их в компанию UCSF Genomics Core. Библиотеку готовили с использованием набора Nugen Ovation и далее секвенировали на машине Illumina HiSeq 2500. С одного конца получали чтения размером 50 оснований, что давало ~405 миллионов чтений со средней глубиной 33,7 миллионов чтений/образец. Чтения выравнивали по геномам мышей (USCS mm10) и те, которые были картированы исключительно по известным мРНК, использовали для оценки дифференциальной экспрессии. Для анализа и оценки дифференциальной экспрессии использовали метод Tophat (Trapnell et al., 2009) для выполнения выравниваний, а секвенирование DESeq (Anders and Huber, 2010) использовали для выполнения анализа дифференциальной экспрессии.

[00297] Рост опухоли

[00298] Для получения кривых роста опухолей в течение указанных периодов времени измеряли площадь опухолей (мм^2) с помощью штангенциркуля как ширина опухоли \times высоту опухоли.

[00299] Обработка дифтерийным токсином, FTY-720 и aCSF-1

[00300] Приобретали D. Т. в компании Sigma-Aldrich. Для определения быстротечного удаления D. Т. мышам DTR в. б. инъецировали 20 нг D. Т. на грамм массы тела и для проведения анализа мышей умерщвляли через 24 ч после инъекции D. Т. Для определения долговременного удаления мышам сначала в. б. инъецировали 20 нг/грамм DT, а затем после этого поддерживали введение на уровне 4 нг/грамм через каждые трое суток.

[00301] FTY720 приобретали в Cayman, растворяли в солевом растворе и хранили в виде аликвот по 1 мг/мл при -20°C . На каждые следующие сутки после указанных периодов времени в. б. инъецировали 200 мкл FTY в конечной концентрации 100 мкг/мл в солевом растворе.

[00302] Нейтрализующее aCSF-1 антитело, клон 5A1 и изотип крысиного IgG2a приобретали очищенным в UCSF Antibody Core. Первоначально животных лечили с помощью 1 мг антитела путем в. б. инъекции и анализировали через 3 суток. После этого для поддержания истощения длительное время мышам впоследствии давали в. б. дозы 0,5 мг каждые 5 суток.

[00303] Получение предшественников GMP и адоптивный перенос

[00304] Все кости (включая бедренные, большие берцовые, плечевые, локтевые, лучевые и кости таза) собирали в буферный раствор для сортировки (ФСБ + 2 % FCS), разрушали с помощью ступки и пестика и повторно промывали HBSS, а затем пропускали через фильтр с размером пор 70 мкм. Затем среди клеток лизировали RBC с помощью 175 мМ раствора хлорида аммония в течение 5 минут при 37°C и потом промывали и разделяли на фикколе с 3 мл подложки из Histopaque-1110 (Sigma) для отбора живых клеток и отделения дебриса костей. Клетки костного мозга обогащали по CD117-положительным клеткам с использованием CD117-микрогранул (Miltenyi Biotec) и отбирали по положительному признаку на AutoMACS. Затем клетки окрашивали коктейлем на линии дифференцировки из неконъюгированных крысиных антител (CD4, CD8, Mac1, Gr-1, CD5, Ter119 и CD3) в течение 30 минут на льду с последующей промывкой и окрашиванием с помощью флуоресцентно конъюгированного вторичного антитела против антител крысы в течение 30 минут на льду. Затем клетки промывали и окрашивали с помощью мастер-кита для предшественников (Skit-APC-cy7, Sca1-PB, CD34-FITC и FcgR-PerCPCy5. 5) в течение 30 минут на льду, промывали и сортировали для GMP на живые, cKit+ Sca1-, CD34+ FcgR с использованием BD FACs AriaII.

[00305] Анализ поглощения декстрана

[00306] Опухоли дезагрегировали и отбирали CD45-положительные клетки, как описано выше, и затем высаживали по 1×10^6 клеток на лунку в 96-луночные планшеты с круглым дном и инкубировали с или без 1 мг/мл раствора декстран-краситель Pacific Blue (MM 10000) либо при 4°C, либо при 37°C в течение 30 мин в трех повторах. Планшеты встряхивали каждые 5 минут. Затем планшеты промывали 3 раза, окрашивали антителами к поверхности и сразу анализировали методом проточной цитометрии. Поглощение декстрана измеряли как среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции для поглощения декстрана при 4°C, которое вычитали из среднего геометрического значения интенсивности флуоресценции для поглощения декстрана при 37°C.

[00307] Отслеживание клеток и анализ визуализации

[00308] Данные визуализировали и анализировали с использованием программного обеспечения Imaris (Bitplane). Идентифицировали отдельные Т-клетки и отслеживали их с помощью Imaris. DC CD11c mcherry рассчитывали с использованием изоповерхностей маскированных DC по сегментации MATLAB. Длительность контакта определяли путем рассчитанной длительности пути маскированных агрегатов Т-клеток-DC, которые отслеживали с использованием Imaris.

[00309] Клоны антител

[00310] Клоны Ab мыши: CD45 клон 30-F11, CD45. 1 клон A20, CD45. 2 клон 104, CD11b клон M1/70, CD11c клон N418, CD103 клон 2E7, CD24 клон M1/69, CD90. 2 клон 30-H12, Ly6C клон HK1. 4, MHCII клон N22, F4/80 клон BM8, CD69 клон H1. 2F3, CD135 clone A2F10, CD117 клон 2B8, CD26 клон H194-112, CD206 клон C068C2, CD64 клон X54-5/7. 1, MerTK клон Y323, CD301b клон 11A10-B7-2, любезно предоставленный Akiko Iwasaki из Йельского университета, PDL2 клон TY25, IRF4 клон M17 и IRF8 клон T14, любезно предоставленный Roger Sciammas из Чикагского университета, IL12 клон C17. 8, CD80 клон 16-10A1, CD86 клон GL1, 2B4 клон m2B4 и PDL1 клон 10F. 9G2.

[00311] Клоны Ab человека: CD45 клон H130, CD3e клон OKT3, HLADR клон L243, CD56 клон CMSSB, CD19 клон H1B19, CD14 клон 61D3, CD16 клон CB16, CD11c клон 3,9, BDCA1 клон L161 и BDCA3 клон AD5-14H12.

[00312] Статистический анализ

[00313] Статистические анализы выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Если конкретно не указано иное, то все данные являются репрезентативными из >3 отдельных

экспериментов. Величины ошибок представлены в виде SEM, рассчитанной с использованием Prism, и полученные в условиях экспериментов с тремя повторами. Конкретные статистические испытания были с односторонними и двухсторонними Т-критериями, а все р-значения менее 0,05 считались статистически значимыми.

Пример 2. Поверхностные маркеры разграничивают редкие опухолевые субпопуляции DC и избыточные макрофаги.

[00314] Для вычленения опухоль-инфильтрирующих миелоидных популяций разрабатывали 11-цветную панель для проточной цитометрии и прогрессивную стратегию разделения на гейты с использованием модели спонтанной опухоли молочной железы, PуMTChOVA (Engelhardt et al., 2012), сконструированной вместе с иницирующим онкогеном для независимой коэкспрессии флуоресцентного белка mCherry и овальбумина. Авторами разработан профиль опухолевого компартмента клеток CD45⁺, многие из которых имели поглощаемый фагоцитами опухолевый антиген и таким образом проявляли флуоресценцию mCherry (**Фиг. 1А**). Разделение на субгейты всех гемопоэтических клеток по миелоидспецифическому маркеру CD11b и моноцитному маркеру Ly6C позволяло удалять нейтрофилы и моноциты (данные не показаны). Среди клеток МНСII⁺, DC отличали от макрофагов на основе экспрессии CD24^{выс} и F4/80^{низ}, как правило, использование самостоятельно одного из этих параметров не было достаточным для обеспечения такого различия. Впоследствии было обнаружено, что DC разбиваются на две популяции на основе дифференциальной экспрессии CD11b и CD103, как наблюдали для здоровых периферических тканей (Hashimoto et al., 2011). Авторами обнаружены эти популяции в двух мышиных моделях меланомы (B78ChOVA (вариант B16, экспрессирующий mCherry и OVA), **Фиг. 1В** и BRAF V600E, данные не показаны), среди линий мышей (например, FVB PуMT; данные не показаны) и в эктопических опухолях (карциномы легкого Льюиса; данные не показаны). Авторы в дальнейшем называют эти популяции DC «CD11b⁺DC1» и «CD103⁺DC2» для облегчения разграничения и обсуждения.

[00315] Разделение компартмента F4/80^{высо} CD24^{низ} также выявило два типа макрофагов, идентифицированных по дифференциальной экспрессии CD11c и CD11b. Клетки CD11c^{низ} CD11b^{выс} (до этого «TAM1») и CD11c^{выс} CD11b^{низ} («TAM2»), как выяснилось, в широком диапазоне соответствуют сходным образом разграниченным популяциям МНСII^{выс} и МНСII^{низ} (Movahedi et al., 2010) (см. также **Фиг. 5с**). В то время как CD11c, иначе «прототипный» маркер DC, имел наибольший показатель на DC, он в высокой степени экспрессировался в TAM2 и в меньшей степени в TAM1 (данные не показаны). Эти популяции существовали среди всех исследованных моделей, хотя частота распространения каждой и их способность однозначно различаться слегка варьировала (**Фиг. 1А-В** и

данные не показаны). Таким образом авторы применяли исследования своей линии дифференцировки и функционирования к одному примеру модели спонтанной опухоли (PyMTChOVA) и эктопической опухоли (B78ChOVA), за исключением указанных случаев.

[00316] Нагрузку mCherry, происходящим из опухолей, и его удержание оценивали для каждой из этих популяций. Эти анализы выявили, что захватывающие клетки ^{выс}, которые локализовались на границе опухоли, что показано в предыдущем отчете авторов, и затем идентифицировались только по CD11c (Engelhardt et al., 2012), лучше всего захватывались в гейты TAM1 и TAM2 (**Фиг. 1с** и данные не показаны). CD11b⁺DC1 и CD103⁺DC2 поглощали или удерживали относительно меньше mCherry, тогда как некоторые моноциты и отдельные нейтрофилы проявляли признаки средней нагрузки антигеном.

[00317] Субпопуляции CD11b⁺ и CD103⁺DC обнаружены во многих периферических тканях мыши, а их аналоги идентифицированы в периферических тканях человека, что определяли по экспрессии BDCA1 и BDCA3, соответственно (Dzionek et al., 2000; Haniffa et al., 2012). Авторами изобретения обнаружено, что эквивалентное различие TAM/DC также доступно в образцах метастатической меланомы человека с использованием данных маркеров (**Фиг. 1D**). Клетки CD16⁻HLADR⁺ CD11c⁺CD14⁺, репрезентующие все TAM, отличались от CD16⁻HLADR⁺ CD11c⁺CD14⁻ популяций DC, которые в свою очередь разбивались по дифференциальной экспрессии BDCA1 («DC1») и BDCA3 («DC2»). Общим среди мышинных моделей (**Фиг. 1E**) и биоптатов меланом человека (**Фиг. 1F**) является присутствие и малая распространенность популяций CD11b⁺/BDCA1 DC1 и CD103⁺/BDCA3 DC2, при этом DC2 является особенной редкой.

Пример 3. Белковое и транскрипционное разграничение опухолевых DC и макрофагов.

[00318] Для валидации стратегий разделения по гейтам авторы применяли наборы, определенные консорциумом ImmGen (Gautier et al., 2012; Miller et al., 2012). В соответствии с определением авторами «DC» CD103⁺DC2 экспрессировали CD135 (Flt3), CD117 (cKit) и CD26, в то время как обе популяции TAM не находили в моделях B78chOVA и PyMTchOVA. (**Фиг. 2A** и данные не показаны). Неожиданно обнаружилось, что CD11b⁺DC1 не экспрессировали выявляемые уровни маркеров DC и в действительности сегрегировались больше с TAM1 и TAM2 благодаря экспрессии нескольких «макрофагальных» маркеров, включающих CD206, CD64 и MerTK (**Фиг. 2B** и данные не показаны). Однако CD11b⁺DC1 слабо экспрессировали CD301b и PDL2, оба из которых использовали для определения IRF4-зависимых популяций «DC_{Th2}», обнаруженных в коже (**Фиг. 2C** и данные не показаны) (Gao et al., 2013; Kumamoto et al., 2013).

[00319] Для дополнительного разграничения этих APC, авторы использовали профили генной экспрессии сортированных клеток из опухоли B78chOVA с использованием секвенирования РНК. Как показано на **Фиг. 2D**, блоки генов четко сегрегируют на четыре популяции, причем TAM1, TAM2 и CD11b⁺DC1 были наиболее сходными по анализу PCA (**Фиг. 2E**), а CD103⁺DC2 наиболее отличалась. Среди генов с наибольшей дифференциальной экспрессией, определяющие линию дифференцировки DC факторы транскрипции *Irf8* (Tamura et al., 2005) и *Zbtb46* (zDC) (Meredith et al., 2012) были специфическими только для CD103⁺DC2 или обеих DC, соответственно, в то время как *Irf4* умеренно обогащал CD11b⁺DC1 и все из них прошли валидацию методом РВ-кПЦР (**Фиг. 2F**). Это также подтверждено по уровню белка методом внутриклеточной проточной цитометрии для IRF4/8 (**Фиг. 2G** и данные не показаны). Все популяции, экспрессировавшие *Mylb*, которые указывали на происхождение из гемопоэтических стволовых клеток, что противоположно происхождению из предшественников тканей, отобранных из желточного мешка (Schulz et al., 2012). В модели РумТchOVA реплицировались уникальные поверхностные фенотипы и проходила экспрессия ключевых факторов транскрипции (данные не показаны).

[00320] Так как эти внутриопухолевые популяции могут возникать посредством различных опухолеспецифических механизмов и не обусловлены этими факторами транскрипции, как происходит в некоторых традиционных тканях, авторы исследовали зависимость *Irf8*, *Irf4*, *Batf3* и *zDC* с использованием нокаута или управляемого фактором транскрипции рецептора дифтерийного токсина (DTR) мышей. Авторы воспользовались преимуществом различных эктопических опухолей, благодаря искажениям при скрещивании этих аллелей в спонтанной модели. Используя модель эктопической опухоли РумТ молочной железы, авторы обнаруживали, что потеря *Irf8* исключительно удаляет CD103⁺DC2, но не влияет на TAM1 или TAM2 и она слегка обогащается процентным содержанием CD11b⁺DC1, вероятно в результате компенсации (**Фиг. 3A**). Наоборот, условная делеция *Irf4*, управляемая *CD11c-Cre* (Williams et al., 2013) приводила к специфическому снижению по CD11b⁺DC1 с незначительным изменением по другим в модели B78chOVA (**Фиг. 3B**). В соответствии с данными секвенирования РНК у животных, дефицитных по *Batf3*, также отсутствуют опухолевые популяции CD103⁺DC2 в модели B78chOVA без влияния на пропорции CD11b⁺DC1, TAM1 или TAM2 (**Фиг. 3C**). Наконец, когда применяли *zDC*-управляемую аллель DTR, авторы несколько неожиданно обнаружили специфическое и значительное снижение по CD103⁺DC2 с незначительными или без изменений по популяциям CD11b⁺DC1 или TAM1/TAM2 в опухоли B78chOVA (**Фиг. 3D**). Это может представлять искажения аллели DTR или незаметные, но значимые вариации в экспрессии *zDC*. Из взятых в совокупности фактов, авторы заключают, что CD103⁺DC2 представляют отличающуюся линию дифференцировки APC, по сравнению с CD11b⁺DC1, и в высокой степени избыточными в опухоли являются TAM1/TAM2.

Пример 4. CD103⁺DC2, запрограммированные различными цитокинами.

[00321] APC получают из предшественников костного мозга (КМ), а их дифференцировка зависит от специфических цитокинов. Для определения управляемой цитокинами дифференцировки в этих популяциях авторы методом кПЦР выясняли экспрессию рецептора колониестимулирующего фактора (CSF) среди моделей. Принимая во внимание, что *Csf1r* (M-CSFR) обнаружен исключительно в TAM1, TAM2 и CD11b⁺ DC1, то *Csf2rb* (GM-CSFR) исключительно экспрессировался в субпопуляциях DC1 и DC2, а *Csf3r* (G-CSF) отсутствовал во всех (Фиг. 4А). Используя либо обработку нейтрализующими антителами, либо дефицитных по рецепторам цитокинов мышей с эктопическими опухолями, авторы функционально исследовали CSF-цитоклиновую зависимость APC в опухоли.

[00322] Поскольку клетки TAM1 и TAM2 для своего поддержания критически зависели от CSF-1, как было показано ранее (Wyskoff et al., 2004), популяции CD11b⁺DC1 и CD103⁺DC2 были исключительно независимы от CSF1 (Фиг. 4В). Для применения дефицитных по цитокиновым рецепторам мышей, авторы разработали конгенную адоптивную модель переноса, благодаря которой предшественники гранулоцитарных макрофагов (GMP) переносили в эктопических опухоль-несущих хозяев и отслеживали репопуляцию в КМ, селезенке и опухоли (Фиг. 4С). В опухолевых происходящих из GMP клетках размножались все миелоидные компартменты, подтверждая GMP-происхождение CD11b⁺DC1, CD103⁺DC2, TAM1 и TAM2 (Фиг. 4D). Путем применения GMP-адоптивной системы с конкурентным переносом, авторы обнаружили избирательную неспособность клеток *Csf2rb*^{-/-} восстанавливать DC в опухоли, здесь это определено как сумма DC1/DC2 с использованием попадания в гейт CD24⁺ CD11c⁺. Авторы не обнаружили влияния на репопуляцию TAM1 и TAM2, предполагая единственное требование CSF2 (GM-CSF) для опухолевого развития DC (Фиг. 4Е), в тоже время не обнаружено требований для CSF-3 для любой из четырех APC (данные не показаны).

[00323] Так как DC прототипно управляются GM-CSF или FLT3-лигандом (FLT3L), авторы оценивали достаточность цитокинов для управления популяциями DC в опухоли с использованием опухолевых моделей меланомы B16, сконструированных для экспрессии GMCSF или FLT3L. Поскольку экспрессия GMCSF опухолью коренным образом сдвигает пропорцию CD11b⁺ DC1, то экспрессирующие FLT3L опухоли управляют исключительно распространением редких CD103⁺ DC2 в опухоли (Фиг. 4F).

Пример 5. Уникальный процессинг антигенов и характеристики презентирования CD103⁺ DC2.

[00324] Установив требования к линии дифференцировки различных APC, авторы затем оценивали их способность к иницированию, вовлечению и поддержанию реакций Т-клеток. Для разделения клеток относительно процессинга антигенов, презентации и костимуляции авторы анализировали уровни транскриптов и белков генов, вовлеченных в эти механизмы с использованием данных секвенирования РНК из Фиг. 2. Величины разницы были значимыми среди широкого диапазона охватов потенциального функционирования APC (Фиг. 5A). Примечательно, что поверхностные уровни молекул, вовлеченных в регулирование реакций Т-клеток, включая CD80, CD86 и 2B4, были сравнимыми между популяциями, CD103⁺ DC2 показали различные транскрипционные сигнатуры, согласующиеся с повышенной перекрестной презентацией, усиленной костимуляцией и увеличенной экспрессией хемокинов, которые, как можно было ожидать, усиливали взаимодействия Т-клеток (Фиг. 5A, B и данные не показаны). Не существует основных отличий в экспрессии МНСI и МНСII между APC, за исключением слегка сниженного МНСI на CD103⁺DC2 (Фиг. 5C). Однако, значимые различия фагоцитарной способности наблюдали в CD103⁺DC2 по сравнению с TAM1/TAM2, измеренные экзогенно анализом *ex vivo* поглощения декстрана эктопическими опухолями (Фиг. 5D).

[00325] Так как созревание DC и фагоцитарная способность часто коррелируют обратно пропорционально, авторы выдвинули гипотезу, что увеличенная фагоцитарная способность CD103⁺ DC2 может соответствовать более зрелой DC с увеличенной перекрестной презентацией антигена (Guernonprez et al., 2002). Эффективная перекрестная презентация антигена в DC обуславливается *Nox2* в отношении регулирования фagosомального pH, которое тем самым предотвращает разрушение пептидов Т-клеток. Перед данной работой предварительно определили с использованием анализа измерения соотношений сравнительной интенсивности внутриклеточной флуоресценции pH-чувствительного и pH-нечувствительного флуорофора после фагоцитоза (Savina et al., 2006). Таким образом авторы создали опухолевую линию B78 (меланома), экспрессирующую слияние pH-чувствительного GFP (pHluoGin, гасимый при значении pH ниже 6,5) нечувствительного к pH флуорофора (mCherry). Путем анализа самостоятельной интенсивности для pHluoGin внутри компартмента mCherry⁺ каждой популяции, авторами обнаружено, что только популяции «DC» поддерживают pHluoGin в щелочном (флуоресцентном) окружении; сравнение соотношения сигналов pHluoGin к mCherry показало, что CD103⁺ DC2 поддерживала наиболее основной эндоцитарный компартмент, тогда как популяции TAM1 и TAM2 отображали высокую кислотность и, поэтому, разрушительные фагоцитарные механизмы (Фиг. 5E). В дополнение к увеличенному щелочному фagosомальному световому потоку CD103⁺DC2, эти клетки демонстрировали дифференциальные

экспрессии провоспалительного цитокина ИЛ-12 и отсутствие противовоспалительного ИЛ-10 (Фиг. 5F, G и данные не показаны). Вместе все из этих признаков дают основание предположить, что CD103⁺DC2 является в высшей степени готовой для эффективной перекрестной презентации антигена CD8⁺ Т-клеткам.

Пример 6. CD103⁺ DC2 являются самыми лучшими стимуляторами наивных и активированных CD8⁺ Т-клеток.

[00326] Ранее авторами обнаружено, что поглощающий агрегаты антигенов миелоидный компартмент мог стимулировать наивные, но ранее не активированные CD8⁺ Т-клетки, при попадании непосредственно в опухоль (Engelhardt et al., 2012). Однако, на основании уникального фенотипа перекрестной презентации f CD103⁺ DC2, авторы стремились исследовать стимулирующую способность Т-клеток из каждой популяции, недавно выделенной из опухолей. Через 12 часов совместного культивирования с овалбумин-специфическими ОТ-I CD8⁺ Т-клетками, популяция CD103⁺ DC2 была единственной популяцией способной устойчиво индуцировать передачу сигнала TCR, как подтверждено повышением экспрессии маркеров ранней активации Т-клеток *Nur77* и CD69 как в наивных, так и в ранее активированных ОТ-I CD8⁺ Т-клетках. Важно, что это согласовывалось как с эктопическими, так и спонтанными мышинными моделями (Фиг. 6A и данные не показаны). Расширенное совместное культивирование меченых красителем ОТ-I CD8⁺ Т-клеток выявило, что CD11b⁺DC1 и CD103⁺DC2 популяции были наиболее устойчивыми стимуляторами пролиферации наивных CD8⁺ Т-клеток, и продемонстрировало, что почти вся стимулирующая способность, ранее идентифицированная у фагоцитирующих опухолевых миелоидных клеток, находится исключительно в этих DC (Фиг. 6B-C, и данные не показаны). Интересно, что CD103⁺ DC2 была исключительно способна к индуцированию сильной пролиферации сформированных CTL, которые не стимулировались другими популяциями, указывая на то, что CD103⁺ DC2 были превосходными перекрестно презентующими стимуляторами CTL в опухоли (Фиг. 6D-E и данные не показаны, соответственно).

[00327] Наконец, при своей обычной низкой частоте встречаемости в общем изоляте опухоли, CD103⁺DC2 остается неспособной управлять пролиферацией CTL (данные не показаны (Engelhardt et al., 2012)). В дополнение к этому ни одна из субпопуляций APC не индуцировала пролиферацию CD4⁺ Т-клеток прямо из опухоли (Фиг. 6F-G и данные не показаны). Однако, экзогенный пептид не восстанавливал способность DC1 и DC2 к стимулированию пролиферации, что дает основание предположить, что эти DC не могут быть сами по себе неспособными к стимуляции CD4 Т-клеток (данные не показаны). Немаловажно, что это определяет уникальную способность CD103⁺ DC2 внутри

опухоли поглощать, процессировать и перекрестно презентировать опухолевый антиген для стойкого стимулирования CTL. Это ставит под вопрос простую концепцию, что опухоли содержат только слабые или супрессорные миелоидные популяции.

Пример 7. CD103⁺ DC2 локализация и взаимодействие Т-клеток, выявленные методом прижизненной визуализации.

[00328] Имея уникальную возможность редких CD103⁺DC2 стимулировать Т-клетки, авторы стремились понять пространственную организацию этих клеток внутри опухоли и их динамику взаимодействия с Т-клетками как *in vivo*, так и *in vitro*. Для дифференцирования этих популяций в живых спонтанных опухолях *in vivo*, аллель *PuMTchOVA* скрещивали с аллелями *Cx3cr1-eGFP* и *Cd11c-mCherry*, создавая три уникальные флуоресцентные популяции в миелоидном компартменте (данные не показаны). Обе субпопуляции DC (DC1/DC2) специфически маркировали красным красителем (CD11c-только mCherry), тогда как популяции TAM1 и TAM2 были зелеными (*Cx3cr1*-только eGFP) и желтыми (CD11c-mCherry и *Cx3cr1-eGFP*), соответственно. Используя этот флуоресцентный подход с 2-фотонной прижизненной визуализацией, авторы наблюдали, что популяции TAM1 и TAM2 предпочтительно слегка граничили с опухолевыми очагами. Эта зона является зоной, в которой авторы ранее обнаружили предпочтительный захват Т-клеток (Engelhardt et al., 2012). В противоположность этому, красные субпопуляции DC, как правило, обнаруживали в отдельных свободных от коллагена зонах дистально от очагов опухолей, что составляло почти до 70 % всех дистально локализованных APC (Фиг. 7А и данные не показаны).

[00329] Этот подход не полностью дифференцирует клетки CD11b⁺DC1 и CD103⁺DC2 среди клеток, находящихся на границах фокусов опухолей, авторы стремились определить могут ли новые красные DC предпочтительно представлять исключительно одну или другую субпопуляцию. Для разграничения данных субпопуляций *in situ* авторы использовали визуализацию срезов живых опухолей с помощью окрашивания антителом против CD11b. Используя этот подход, авторы могли различать субпопуляции CD11b⁺DC1 и CD103⁺DC2 *in situ* в присутствии красных/зеленых флуоресцентных репортеров и обнаружили, что в этих местах присутствовали как CD11b⁺, так и CD11b⁻ DC (данные не показаны). Авторы заключают, что поскольку TAM обычно представляют доминирующий тип клеток на границе опухоли, то несмотря на это там могут быть найдены про-CTL стимулирующие APC, хоть и в очень малых количествах.

[00330] Предыдущие данные авторов продемонстрировали, что поступающие CTL задействованы в угнетении состояния на границе опухолей, и авторы стремились определить могли ли они располагаться с DC или TAM, или с ними всеми. Анализировали *in vivo* динамику Т-клеток в системе

красного/зеленого репортеров путем адоптивного переноса меченых *актином*-CFP Т-клеток OT-I CD8⁺ у несущих спонтанные опухоли молочной железы мышей при либо прижизненной визуализации, либо визуализации живых срезов. Авторы наблюдали стабильные Т-клеточные взаимодействия, в значительной степени ограниченные границами опухолей, как ранее описано (Boissonnas et al., 2013; Engelhardt et al., 2012) (Фиг. 7В и данные не показаны). Хотя взаимодействия TAM1 доминировали во всех отмеченных взаимодействиях, DC и TAM2 также были хорошо представлены при угнетении Т-клеток. Этот факт демонстрирует, что DC1/2 в проксимальных для опухолей участках не способны физически исключаться от задействования Т-клеток внутри опухолей, но он поднял фундаментальный вопрос: что из перечисленного способно больше задействовать Т-клетки.

[00331] Для ответа на этот вопрос авторы отвергли отбор APC из-за физических ограничений ткани и дезагрегирования опухоли для получения суспензии из одиночных клеток, ввели *in vitro* активированные OT-I CTL и дали им возможность сформировать антигенспецифические пары. Затем авторы определили процентное содержание каждой популяции APC, которая связалась с Т-клетками методом проточной цитометрии. Эта методика выявила, что OT-I Т-клетки спариваются предпочтительно с субпопуляциями CD103⁺DC2 и TAM1/2 (Фиг. 7С, левое изображение). Однако, благодаря высокой частоте встречаемости TAM1/2, большинство пар Т-клеток-APC образуются с клетками TAM1/2 (Фиг. 7С, правое изображение). Авторы заключают, что DC2 принимают участие в Т-клеточных взаимодействиях в опухолях и, когда присутствуют около границы, способны конкурировать за захватывание Т-клеток.

Пример 8. Редкие опухолевые CD103⁺ DC2 дают возможность проводить эффективную адоптивную Т-клеточную терапию.

[00332] Авторы с удивлением обнаружили, что пропорции CD11b⁺DC1 и CD103⁺DC2 были почти противоположными в спонтанно регрессирующей линии опухолевых клеток EG7, в настоящем документе далее называемая EG7. 2, по сравнению с очень агрессивной и разрастающейся линией EG7. 1. Поскольку агрессивно растущая линия поддерживала относительные пропорции DC, которые авторы наблюдали во всех других агрессивных опухолях (данные не показаны), спонтанно регрессирующая модель содержала необычно большие количества CD103⁺DC2 (данные не показаны). Авторы также наблюдали увеличенный рост опухоли в модели опухоли *Irf8* KO, в которой отсутствовали CD103⁺DC2, но не в условной модели *Irf4* KO (данные не показаны). Все вместе дало основание предположить, что опухолевый избыток DC2 может играть важную роль в контроле опухолей, впрочем отличия в разрастании может представлять много вариаций в этих линиях, выходящих за пределы своих популяций миелоидных клеток и их способности стимулировать CTL. Поэтому для формального

испытания того, являются ли CD103⁺DC2 необходимыми для эффективной CTL-опосредованной регрессии опухолей, авторы перешли к модели разрастающейся опухоли EG7. 1 и выполнили адоптивную T-клеточную терапию активированными опухолеспецифическими T-клетками для анализа регрессии (Helmich and Dutton, 2001). Авторы выполняли эти эксперименты на мышах *zDC-DTR*, которые позволили специфически удалять в опухоли CD103⁺DC2 (Фиг. 3D). Для того, чтобы выделить влияние CD103⁺DC2 на место существования опухоли, и исключить любое влияние прайминга LN, авторы специально спланировали эксперимент, чтобы он включал две стратегии: (1) применение активированных бластных клеток OT-I CD8⁺ CTL, которые не требовали прайминга в LN и обычно не перемещались там, и (2) лечение животных с помощью R-антагониста SIP₁, FTY-720, который предотвращал выход LN из редких перенесенных CTL T-клеток, которые перемещались к LN. Влияние одного FTY-720 оказывало минимальное воздействие на перенесенные CTL, чтобы опосредовать регрессию опухоли (данные не показаны). Однако, авторы обнаружили, что удаление CD103⁺ DC2 в контексте FTY-720, оказало значительное воздействие на способность CTL опосредовать эффективную регрессию опухолей, массово замедляя опосредованную T-клетками регрессию опухолей (Фиг. 8A).

Пример 9. Сигнатуры внутриопухолевых избыточных CD103⁺DC2 определяют исход ракового заболевания человека.

[00333] Для определения того, переносится ли критическая роль избытка CD103⁺DC2 на опухоли человека, авторы воспользовались преимуществом массивом данных TCGA (Cancer Genome Atlas Research et al., 2013; Hoadley et al., 2014), который количественно определяет относительную генную экспрессию многочисленных типов раковых опухолей человека, которые соответствовали полученным данным. Авторы применяли свои данные по секвенированию РНК для отбора транскриптов с высоким уровнем, которые характеризовали CD103⁺DC2, а также выбирали поднабор генов, которые характеризовали клетки TAM1/TAM2/CD11b⁺DC1, но были дефицитны по CD103⁺DC2 (на Фиг. 8B верхние и нижние гены, соответственно). Авторы идентифицировали человеческие гомологи этих мышинных генов и анализировали экспрессию данных «сигнатур» среди данных пациентов TCGA во всех типах раковых опухолей для оценки прогнозируемых ассоциаций. При анализе выживаемости с пропорциональными рисками, корректируя модели по типу рака как ковариаты, авторы наблюдали, что отдельные гены из этих популяций обладали лишь умеренными прогностическими преимуществами (выраженными как соотношение рисков (HR)). Однако, ассоциация с высокой значимостью с увеличенной выживаемостью (ВН $p=0,00019$) наблюдалась, когда авторы определили соотношение данных генной экспрессии CD103⁺ к CD103⁻ и использовали их как непрерывно варьируемые в пределах анализа Кокса (Фиг. 8B).

[00334] Данный анализ показал, что тип клеток, идентифицированный авторами при определении соотношения с его функциональной противоположностью, обеспечивает очень сильное прогностическое значение для исхода среди раковых заболеваний человека. Сравнение этой «сигнатуры» с другими ранее описанными «иммунными оценками» показывает, что соотношение генов CD103⁺/CD103⁻ обеспечивает самый сильный сигнал проиммунной выживаемости по сравнению с другими существующими анализами по данным TCGA, включая основанные на общем избытке Т-клеток (Palmer et al., 2006) и полученные по общему соотношению CD8 Т-клеток к макрофагам (CD8/CD68 DeNardo et al., 2011) (Фиг. 8С). Оценка авторов также благоприятна для сравнения по противоположному прогнозированию для тех иммунных оценок, которые связаны с плохим исходом. Примечательно также, что экспрессия CSF-1 в опухолях у этих пациентов также противоположным образом коррелирует с показателем соотношения генов CD103/BDCA3, хотя он аналогично противоположным образом коррелирует с общими уровнями опухолевых Flt3L (данные не показаны).

[00335] Наконец, авторы стремились проанализировать данные TCGA в пределах отдельных типов раковых опухолей. Скорректированный по типу рака, график Каплана-Мейера (К-М) для всех 12 раковых заболеваний в этом наборе данных показывает общее преимущество в опухолях с высоким профилем генной экспрессии CD103⁺/CD103⁻ (Фиг. 8D и данные не показаны). Степень этой ассоциации в частности значительна при раке молочной железы, плоскоклеточной карциноме головы-шеи и аденокарциноме легкого (Фиг. 8E-G). В итоге, это факт представляет неожиданно сильную иммунную сигнатуру, тем большую по значению, поскольку она полностью происходит из эмпирического получения иммунных профилей на мышиных моделях опухолей.

Пример 10. Материалы и методы для примера 11.

[00336] Биоинформационный анализ меланом

[00337] Набор данных для меланом GSE19234 (n =44) предварительно обрабатывали путем квантильной нормализации в среде R перед оценкой сигнатуры и оценки ассоциаций с выживаемостью (пропорциональные риски Кокса). Vogunovic, D., et al. Иммунный профиль и митотический индекс метастатических очагов меланомы усиливают уровень клинической стадии при предвидении выживаемости пациента. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20429-20434 (2009). Соотношение сигнатур SDC/NSM рассчитывают как log средней величины экспрессии генов SDC, деленную на среднюю экспрессию генов NSM, с последующей стандартизацией по z-оценке (среднее значение=0, со=1; перечень генов на Фиг. 1A). Анализ выживаемости выполняли с использованием моделирования Кокса с пропорциональными рисками. Log-ранги p-значений использовали для оценки значимости после корректировки для сравнения множественных сравнений с использованием метода Бенджамини-

Хохберга.²⁰ Графики выживаемости Каплана-Мейера строили с использованием пакета для расчета выживаемости в R и авторы классифицировали каждый образец как «высокий» или «низкий» с использованием 33 %, 50 % (медиана) или 66 % значения SDC или соотношения сигнатур SDC/NSM.

[00338] Пациенты и образцы

[00339] В это исследование включали пациентов, если у них была гистологически подтвержденная стадия IV или III неоперабельной метастатической меланомы. Пациенты давали согласие на сбор тканей в соответствии с утвержденным протоколом UCSF IRB (UCSF CHR № 13-12246). Период включения в исследование длился с декабря 2012 г. по февраль 2015 г. Пациентов лечили следующими блокирующими ось PD-1/PDL-1 моноклональными антителами: пембролизумабом (Keynote 001, 002, 006 либо расширенная программа доступа, либо коммерческая поставка) или ниволумабом (коммерческая поставка). Проводили биопсию кожных/подкожных опухолей с любым пробойником (4 мм или 6 мм), хирургическим удалением (образец K10), а все прочие биоптаты опухолей отбирали исключительно кор-биопсией (16g или 18g). Дополнительный образец отправляли на патологическое исследование. Биоптаты собирали (n=21) перед инфузией антител против PD1. Свежие образцы биопсии немедленно помещали в стерильный контейнер на пропитанную солевым раствором марлю, размещали в контейнере тающий лед и транспортировали в лабораторию для оценки. Все оценки ответной реакции проводили с помощью радиологической визуализации с использованием критериев оценки ответа в программе Solid Tumors, версия 1.1 (RECIST). Полный ответ определяли как полную регрессию всех целевых и нецелевых очагов, частичный ответ определяли как регрессию целевых очагов на >30 % без появления новых очагов, стабильное заболевание определяли как ≤30 % снижение или ≤20 % уменьшение размера целевых очагов. Прогрессирующее заболевание определяли как увеличение целевых очагов на ≥20 % или появление новых очагов размером >1 см. Пациенты с полным или частичным ответом классифицировали как «отвечающие», тогда как пациентов со стабильным заболеванием или прогрессирующим заболеванием классифицировали как «неотвечающие». В случаях, когда прогрессирование определяли клинически (например, новые очаги) без преимущества последующего сканирования, пациента определяли в категорию как отвечающего, а в RECIST его отмечали «х».

[00340] Дезагрегация тканей человека

[00341] Ткань интенсивно измельчали хирургическими ножницами и переносили в колбу Эрленмейера на 25 мл с магнитной мешалкой и с 3 мг/мл коллагеназы А (Roche) и 50 Ед/мл ДНКазы I (Roche) на 0,3 г ткани в течение 1 часа при 37° С с 5 % CO₂ при постоянном перемешивании. Затем образцы фильтровали через фильтр с размером пор 70 мкм, центрифугировали и ресуспендировали для

окрашивания Ruffell, B., *et al.* Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 2796-2801 (2012).

[00342] Проточная цитометрия и клоны Ab

[00343] Все антитела приобретали в компаниях BD Pharmingen, eBioscience, Invitrogen, BioLegend, UCSF hybridoma core или получали в лаборатории Krummel Lab. Для поверхностного окрашивания клетки инкубировали с коктейлем антител против Fc-рецептора человека (клоны 3G8, FUN-2 и 10. 1, BioLegend) и окрашивали антителами в ФСБ + 2 % FCS + 2 мМ ЭДТК в течение 30 мин на льду. Жизнеспособность оценивали окрашиванием устранимым красителем для живых/мертвых клеток Zombie NIR или Aqua (Biolegend). Все анализы проточной цитометрии выполняли на проточном цитометре BD Fortessa. Анализ данных проточной цитометрии делали с использованием программного обеспечения FlowJo (Treestar). Сортировку клеток выполняли с использованием BD FACS Aria II.

[00344] Мышиные антитела против антигенов человека: CD45 клон HI30, CD3e клон OKT3, HLA-DR клон L243, CD56 клон CMSSB, CD19 клон H1B19, CD14 клон 61D3, CD16 клон CB16, CD11c клон 3,9, BDCA1 клон L161 и BDCA3 клон AD5-14H12.

[00345] Линии клеток и культивирование клеток

[00346] B78ChOVA представляет собой вариантную линию B78, созданную стандартными процедурами трансфекции с конструкцией слияния Ch-OVA, идентичной применяемой для создания линии клеток PyMTchOVA. Graf, L. H., Jr., Kaplan, P. & Silagi, S. Efficient DNA-mediated transfer of selectable genes and unselected sequences into differentiated and undifferentiated mouse melanoma clones. *Somatic cell and molecular genetics* **10**, 139-151 (1984) и Engelhardt, J. J., *et al.* Marginating dendritic cells of the tumor microenvironment cross-present tumor antigens and stably engage tumor-specific T cells. *Cancer Cell* **21**, 402-417 (2012). Вкратце, прикрепленные клетки культивировали при 37°C с 5 % CO₂ в DMEM плюс 10 % FCS с пенициллином, стрептомицином и глутамином на обработанных для тканевой культуры пластиковых планшетах и пересевали через день. Суспензионные клетки культивировали в RPMI-1640 плюс 10 % FCS и пен/стреп/глут в колбах T25 и T75 для тканевых культур и пересевали через день.

[00347] Опухоли мышей

[00348] Всех мышей содержали в условиях SPF (свободных от патогенной микрофлоры) в соответствии с NIH и стандартами Американской ассоциации по уходу за лабораторными животными, и согласно протоколам UCSF IACUC.

[00349] Собирали линии опухолевых клеток и промывали 3 раза ФСБ, затем смешивали в соотношении 1:1 с матрицей Matrigel с пониженным содержанием факторов роста (BD Biosciences) до получения конечного объема 50 мкл. Инъекцировали сто пятьдесят тысяч опухолевых клеток подкожно в правый выбритый бок и давали возможность расти в течение 14-21 суток.

[00350] Линии мышей

[00351] Для модуляции популяций миелоидных клеток в опухолях приобретали мышей C57BL/6 дикого типа в компании Simonsen и получали у Simonsen мышей *Zbtb46* –DTR C57BL/6. Meredith, M. M., *et al.* Expression of the zinc finger transcription factor zDC (*Zbtb46*, *Btbd4*) defines the classical dendritic cell lineage. *J Exp Med* **209**, 1153-1165 (2012). Химер *Zbtb46*-DTR КМ создавали согласно следующим стандартным процедурам с использованием самцов-реципиентов C57BL/6 возрастом 8 недель, получавших летальное облучение (2 дозы 5,5 Gy) и $2-5 \times 10^6$ клеток *Zbtb46*-DTR КМ. Мышей содержали на воде с антибиотиками в течение 4 недель и применяли для экспериментов на 8 неделю после восстановления.

[00352] Рост опухоли

[00353] Для получения кривых роста опухолей в течение указанных периодов времени измеряли площадь опухолей (мм²) с помощью электронного штангенциркуля как ширина опухоли x высоту опухоли.

[00354] Лечение дифтерийным токсином, антителом против PD-1 и антителом против CTLA-4

[00355] DT приобретали в компании Sigma-Aldrich. Для определения быстротечного удаления DT мышам DTR в. б. инъекцировали 20 нг DT на грамм массы тела и для проведения анализа мышей умерщвляли через 24 часов после инъекции DT. Для определения долговременного удаления мышам сначала в. б. инъекцировали 20 нг/грамм DT, а затем после этого поддерживали введение на уровне 4 нг/грамм через каждые трое суток в течение до 15 суток.

[00356] Очищенные антитела против PD-1 (клон RMP1-14) и против CTLA-4 (клон 9H10) приобретали в BioXcell и инъекцировали в. б. с помощью 100 мкг каждого антитела в виде комбинированной терапии с тремя этапами лечения на сутки 5, 8 и 11 роста опухоли.

[00357] Статистический анализ

[00358] Статистические анализы выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Если конкретно не указано иное, то все данные являются репрезентативными из >3 независимых

экспериментов. Величины ошибок представлены в виде S. E. M., рассчитанной с использованием Prism, и получены из условий экспериментов с тремя повторами. Конкретные статистические испытания были с односторонними и двухсторонними Т-критериями, а все р-значения < 0,05 считались статистически значимыми.

Пример 11. Внутриопухолевые BDC3+ DC определяют исход к терапии контрольной точки против PD1 для меланомы человека.

[00359] Внутриопухолевые APC крайне разнообразны по своему фенотипу, а миелоидная система обеспечивает множественными популяциями, похожими как на макрофаги, так и на дендритные клетки. Однако, долго время подозревали, что поскольку «макрофаги» являются ингибирующими по отношению к прогрессированию опухоли (DeNardo et al. и Hanada et al.), то предположительно внутриопухолевые дендритные клетки являются стимулирующими (Sandel et al.). Усилия по пониманию этого утверждения в явном виде в значительной степени затруднялись недостатком четкого различия между этими типами клеток. Недавно, авторы провели проточную цитометрию высокого разрешения вместе с секвенированием РНК для того, чтобы дифференцировать внутриопухолевые миелоидные клетки. Авторами обнаружено, на самом деле малая популяция перекрестно презентующих дендритных клеток была в высшей степени стимулирующей для CTL, но другие субпопуляции настоящих «дендритных клеток», а также находящаяся в большом избытке популяция макрофагов, не могли стимулировать реактивные к опухолевому антигену CD8 Т-клетки. Редкие стимулирующие дендритные клетки (SDC) определяли в организме мыши экспрессией интегрина CD103, а в организме человека экспрессией CD141/BDC3 (Broz et al.).

[00360] Исключительно для выяснения роли этих редких иммунностимулирующих популяций DC в меланоме человека, авторы сначала использовали преимущество двух наборов «сигнатурных» генов, РНК каждого из которых существенно обогащали SDC мыши по сравнению с остальными нестимулирующими миелоидными (NSM, содержащие макрофаги и нестимулирующие DC) субпопуляциями антигенпрезентирующих клеток или наоборот набор генов, который преимущественно экспрессировался в NSM (Фиг. 9А). Затем авторы запросили хорошо документированный набор данных 44 пациентов с местатической миеломой, который охватывал как анализ экспрессии РНК, митотический индекс опухолей, определение клинической стадии заболевания и выживаемости пациентов с местатической миеломой (Bogunovic et al). Авторы предприняли анализ избытка РНК, анализируя либо отдельные гены SDC, среднее значение всех генов SDC или соотношение генов SDC/NSM. Два последние могли считаться показателями общего избытка SDC и относительного избытка SDC/NSM, соответственно (Broz et al.).

[00361] Из 9 сигнатур генов SDC 7 обладали значимым прогностическим преимуществом, выраженным как соотношение рисков (HR) (таблица 1, ниже) и обе сигнатуры SDC и соотношение сигнатур SDC/NSM обладали в высшей степени предсказующим значением.

Ген/сигнатура	Коэффициент	p-значение	ВН p-знач.
MYCL	-1.763	6.20E-05	0.0008519
Все гены SDC	-1.379	8.52E-05	0.0008519
BTLA	-1.114	0.0002445	0.001834
Соотн. SDC/NSM	-3.26	0.0005485	0.002742
FLT3	-1.176	0.0008321	0.003492
CCR7	-0.4115	0.0009313	0.003492
IRF8	-0.373	0.005329	0.01776
BATF3	-0.6643	0.02956	0.08062
XCR1	-0.732	0.0372	0.093

[00362] Для лучшей визуализации этих прогностических ассоциаций строили графики Каплана-Мейера (К-М) либо для генов SDC, либо для соотношения SDC/NSM, при котором пациентов разбивали на «высокую» или «низкую» экспрессию сигнатур с увеличением жесткости точек отсечения при любых из 33 %, 50 % или 66 % сгруппированных пороговых значений экспрессии (Фиг. 9B, C). Данные анализы продемонстрировали увеличение шансов выживания при выборе наибольших уровней экспрессии; верхние 33 % опухолей SDC или SDC/NSM имеют наибольшее статистически значимое увеличение выживаемости с момента возникновения метастазов. Этот факт подкрепляет гипотезу о том, что увеличенный избыток стимулирующих BDC3⁺ DC в опухоли лучше обеспечивает выживаемость даже при отсутствии терапии.

[00363] При рассмотрении взаимосвязи между данной связью и Т-клеточным иммунитетом, авторы дополнительно воспользовались преимуществом отобранной информации об избытке TIL в опухолях с определенным профилем относительно сигнатур SDC и SDC/NSM для разбивки данных по инфильтрации TIL. Данный анализ выявил (Фиг. 9D-G), что показатели на основе классов категории TIL и показатели количеств периопухолевых CD3⁺ Т-клеток все в высшей степени коррелировали с генной сигнатурой SDC и в меньше степени, но все же в очень значительной степени, с соотношением SDC/NSM.

[00364] Эти взаимосвязи дали основание предположить взаимозависимость между избытком SDC, функционированием Т-клеток и общей выживаемостью. Авторы стремились выяснить эту взаимосвязь, как возможно имеющую отношение к блокаде контрольных точек. Но поскольку сигнатуры SDC и SDC/NSM являются всего лишь имитациями самих популяций, то авторы пытались непосредственно измерять эти популяции из биоптатов меланом в контексте клинических исследований терапий на основе использования контрольных точек, чтобы увидеть насколько они связаны.

[00365] Для исследования этого момента, авторы анализировали биоптаты опухолей из 21 образца биопсии метастатических меланом пациентов с использованием проточной цитометрии, а затем отслеживали их ход лечения в ответ на терапию против PD-1. Среди 21 пациента 5 были женщинами, а 16 – мужчинами со средним возрастом 61,6 лет, а биоптаты отбирали из различных мест и тканей (Фиг. 10А). Для каждого из этих пациентов биоптаты дезагрегировали ферментативно и анализировали методом проточной цитометрии для количественного определения пропорции инфильтратов иммунных клеток в опухоль. Авторами разработана исчерпывающая проточная панель для вычленения миелоидных инфильтратов человека с использованием маркеров CD45, HLA-DR, CD3, CD19, CD56, CD11c, CD11b, CD85g, CD14, BDCA1 и BDCA3. С использованием этих маркеров авторы получили возможность последовательно определять гейт иммунного компартмента этих опухолей, идентифицируя субпопуляции BDCA3⁺ DC, BDCA1⁺ DC, CD14⁺ TAM и CD14⁻ TAM (Фиг. 10В, С). И авторы обнаружили пациентов со значительными популяциями BDCA3⁺ SDC (Фиг. 10В), а также пациентов со значительно более малочисленными популяциями (Фиг. 10С). Опухоли также в значительной степени варьировали по общему количеству инфильтрации клеток CD45⁺ и по пропорции клеток, экспрессирующих HLA-DR (Фиг. 10D). Большинство меланом были в высшей степени обогащены общим избытком лимфоцитов («линия дифференцировки») (Фиг. 10Е). И когда клетки HLA-DR⁺ разделяли, как на Фиг. 10С/D, на миелоидные субпопуляции, то они также демонстрировали достаточно значимую гетерогенность среди биоптатов пациентов (Фиг. 10Е).

[00366] Для исследования ассоциации этих иммунных миелоидных инфильтратов с ответами пациентов, авторы разделяли пациентов на группы либо как «неотвечающие», определенные как пациенты со стабильным или прогрессирующим заболеванием, либо «отвечающие», определенные как частичные или полные ответы на терапию против PD-1 (см. Фиг. 10А и методы). Согласно этого подхода не существовало значимой разницы по процентному содержанию общих CD45⁺ иммунных клеточных инфильтратов между отвечающими и неотвечающими пациентами, и обе группы фактически имели сходное среднее процентное содержание клеток CD45⁺ со сходной вариабельностью около среднего значения (Фиг. 11А, В и данные не показаны). Аналогично, не существовало очевидной взаимосвязи между общей частотой встречаемости лимфоцитарных клеток и исходом (данные не

показаны). При проведении сравнения, когда количественно определяли BDCA3^+ DC среди отвечающей группы как либо пропорцию от общего количества иммунных клеток (гейт для клеток CD45^+ , Фиг. 11C-D), либо общее количество APC (гейт для клеток HLA-DR^+ , данные не показаны), отвечающие на терапию против PD-1 пациенты имели статистически значимые более высокие частоты BDCA3^+ DC в своих опухолях. Все вместе эти результаты дали основание предположить, что поскольку общая инфильтрация иммунных клеток опухоли не предсказывает восприимчивость к иммунотерапии, возможно из-за того, что общая популяция CD45^+ содержит в TME оба типа противоопухолевых участников, играющих за и против, то пропорция стимулирующих BDCA3^+ DC может, фактически предсказывать эффективность иммунотерапии против PD-1. Поскольку существуют явные примеры отвечающих с относительно низкими количествами BDCA3 , то абсолютное отсечение более 2 % HLA-DR^+ обеспечивает 95 % уверенность для статуса отвечающего с использованием этого размера образца.

[00367] Авторы пытались дополнительно исследовать эти данные, чтобы понять может ли положительная взаимосвязь дополнительно улучшаться учетом точной идентичности оставшихся миелоидных популяций; для этого специально маркировали избыток либо CD14^+ TAM, либо альтернативных популяций DC по BDCA1 или CD14^- TAM. Авторы упорядочили отдельных пациентов по их процентному содержанию клеток BDCA3^+ в зависимости от каждой из популяций и кодировали каждого в соответствии со статусом отвечающего. Поскольку отвечающие все еще оставались разделенными на этом графике на участки с высоким BDCA3^+ , авторы не обнаружили очевидных закономерностей с другими популяциями (Фиг. 11 E-G). Вновь, эти результаты указывают, что присутствие BDCA3 является сильным индикатором возможности поднять противоопухолевый ответ на солидные опухоли, но другие факторы также могут играть роль в обеспечении возможности отдельных пациентов отвечать несмотря на наличие низких уровней. Будущие исследования следует фокусировать на внутриопухолевой локализации клеток BDCA3^+ как возможном объяснении; в настоящее время антитела для них плохо работали в случае авторов и поэтому данный факт необходимо развить в будущих исследованиях.

[00368] Установив сильную ассоциацию между избытком BDCA3^+ DC и восприимчивостью к иммунотерапии, авторы задались вопросом, представляет ли эта ассоциация функциональное требование наличия этой стимулирующей популяции DC для видов терапии на основе блокады контрольных точек или же просто представляет «сигнатуру» восприимчивости. Для исследования этого вопроса, авторы применили управляемую мышиную модель меланомы, линию клеток B78chOVA ⁷, которая представляет собой модифицированный вариант меланомы B16, которая экспрессирует флуоресцентный белок mCherry и овальбумин. В сочетании с этой опухолевой моделью авторы использовали химерные мыши *Zbtb46-DTR* KM, которые ранее показаны как

преимущественно удаляющие (CD103⁺) SDC (Broz et al.). В случае авторов в мышинных моделях монотерапия только с помощью антител против PD1 для меланомы была неэффективной. Таким образом авторы применяли абляционную модель для исследования того, могла бы делеция CD103⁺ SDC предотвращать эффективность комбинированного режима иммунотерапии с антителом против PD-1 и антителом против CTLA-4 (Фиг. 12А). Химерных мышей *Zbtb46-DTR* КМ либо лечили с помощью антитела против PD-1, либо антитела против CTLA-4 или совпадающими по изотипам контрольными антителами с использованием режимов лечения тремя дозами на сутки 5, 8 и 11, и с инъекциями либо DT, либо ФСБ, начиная с суток, и авторы подтвердили, что лечение одним DT не оказывало воздействия на рост опухолей в этой модели (данные не показаны). Авторы обнаружили, что пока нелеченные опухоли меланомы постепенно росли, опухоли, леченные с помощью комбинированных видов иммунотерапии быстро регрессировали через 7-8 суток и почти полностью уничтожались до суток 15 (Фиг. 12В, С). В сравнении, когда у мышей истощали CD103⁺ DC в контексте этой активной иммунотерапии, то быстрая регрессия опухоли была утрачена, а эффективность двойной терапии нейтрализовалась, что дает основание предположить, что существование функционального требования CD103⁺ DC для иммунотерапевтического эффекта (Фиг. 12D).

[00369] Таким образом, авторы установили сильное предсказывающее и прогностическое преимущество специфической популяции SDC (CD103⁺ или BDCA3⁺) как для опухолевых тканей мыши, так и человека. В общем, эти результаты дополнительно подчеркнули важность полного понимания иммунного ландшафта опухолевых тканей, выявленного в предыдущих исследованиях (DeNardo et al и Fridman et al). «Иммунооценка» (Ascierto et al) стала приниматься как новый диагностический маркер для некоторых видов рака; однако, выходя за ее пределы, исследование авторов выявило необходимость все возрастающей детализации определения иммуннопрофилей опухолей человека для идентификации редких популяций иммунных клеток, которые могут модулировать Т-клетки в микроокружении. Для применения постоянных уточнений сигнатур, выявленных предварительными исследованиями потребуется стратификация с последующим усовершенствованием испытаний, восприимчивых к биоптатам, и исследование авторов высветит это в будущем, один такой метод может быть представлен визуализацией с высоким разрешением, например, с помощью технологий масс-ионного луча (Angelo et al).

Пример 12. Материалы и методы для следующих далее примеров.

[00370] Дезагрегация опухолей

[00371] Из организма мышей вырезали опухоли и определяли общую массу удаленной опухолевой ткани. Затем опухоли измельчали с использованием скальпелей и дезагрегировали с помощью 20 Ед/мл

либеразы TL (Roche) из 5 мг/мл маточного раствора и 200 мг/мл ДНКазы I (Roche) на 0,3 грамма массы опухоли в течение 30 минут в конической колбе на 50 мл и помещали на шейкер с 37°C и с 5 % CO₂. Затем через 30 минут опухолевую массу пропускали через сито для клеток размером 70 мкм и живые клетки обогащали на градиенте плотности из Ficoll Raque Plus (GE). С поверхности собирали живые клетки и промывали в буферном растворе для окрашивания (ФСБ + 2 % FCS + 2 mM ЭДТК).

[00372] Выделение костного мозга мышей и селезенки

[00373] Удаляли бедренные и большие берцовые кости, а костный мозг извлекали с использованием ФСБ/2 % FCS/2 mM ЭДТК и шприца/иглы калибром 25G. Селезенки вырезали у мышей и измельчали с использованием скальпелей. Фрагменты тканей дезагрегировали с использованием 500 Ед/мл коллагеназы IV (Worthington), 100 Ед/мл коллагеназы I (Worthington) и 200 мг/мл ДНКазы I (Roche) в конической колбе Эрленмейера на 50 мл на шейкере при 37°C. Дезагрегированные ткани затем фильтровали через сито для клеток размером 70 мкм. Красные клетки крови лизировали как в костном мозге, так и в селезенке с использованием 0,8 % NHCl₄ в течение 5 минут и затем промывали в буферном растворе для окрашивания (ФСБ + 2 % FC + 2 mM ЭДТК).

[00374] Образцы опухолей человека

[00375] Ткань интенсивно измельчали с использованием хирургических ножниц и переносили в коническую колбу на 50 мл с 20 мкг/мл либеразы TL (Roche) из 5 мг/мл маточного раствора и 200 мг/мл ДНКазы I (Roche) на 0,3 грамма массы опухоли в течение 30 минут при 37°C и с 5 % CO₂ с постоянным перемешиванием. Затем образцы фильтровали через фильтр с размером пор 70 мкм, центрифугировали и ресуспендировали для окрашивания (Ruffell et al., 2012). При получении всех образцов из организма людей у всех субъектов получали проинформированное согласие и выполняли работу в соответствии с разрешением IRB (номер IRB 13-12246, 12/06/2013- 12/05/2014).

[00376] Проточная цитометрия и клоны Ab

[00377] Все антитела приобретали в компаниях BD Pharmingen, eBioscience, Invitrogen, BioLegend, Human Protein Atlas или получали в лаборатории Krummel Lab или компании Precision Immune Inc. Для поверхностного окрашивания клетки инкубировали с антителом против Fc-рецептора (клон 2. 4G2), а также 500 нм IgG1 Fc человека и окрашивали первичными антителами в ФСБ + 2 % FCS + 2 нМ ЭДТК в течение 30 мин на льду. С последующими 2 промывками в ФСБ + 2 % FC + 2 mM ЭДТК и окрашиванием соответствующим вторичным антителом в течение 30 мин на льду. Жизнеспособность оценивали окрашиванием устранимым красителем для живых/мертвых клеток Zombie NIR или Aqua

(Biolegend) или Zombie NIR, или DAPI. Все анализы проточной цитометрии выполняли на проточном цитометре BD Fortessa. Анализ данных проточной цитометрии делали с использованием программного обеспечения FlowJo (Treestar).

[00378] Клоны Ab против мышинных маркеров: CD45 клон 30-F11, CD11b клон M1/70, CD11c клон N418, CD103 клон 2E7, CD24 клон M1/69, CD90. 2 клон 30-H12, Ly6C клон HK1. 4, MHCII клон M5/114. 15. 2, F4/80 клон BM8, CD64 клон X54-5/7. 1.

[00379] Маркеры NSM:MS4A7 (поликлональный, от Human Protein Atlas, номер продукта:HPA017418), MS4A6A (поликлональный от Human Protein Atlas, номер продукта HPA011391). Крысиное антитело против мышинового CD88 (C5aR) клон 20/70, клон против LILRB4 (Pi1. 5 Клон 1), против Trem2 (Pi1. 2 клон 2, 5 или 7), CD206 клон C068C2, MerTK клон Y323.

[00380] SDC: Антитело против CCR7 клон 4B12 (мышь), против CCR7 клон 3D12 (человек), против XCR1 клон ZET (мышь), CD135 клон A2F10 (мышь), CD117 клон 2B8 (мышь).

[00381] Клоны Ab против человеческих маркеров: CD45 клон HI30, CD3e клон OKT3, HLADR клон L243, CD56 клон CMSSB, CD19 клон H1B19, CD14 клон 61D3, CD16 клон CB16, CD11c клон 3,9, BDCA1 клон L161 и BDCA3 клон AD5-14H12. TREM2 (клон 237920).

[00382] Вторичные антитела: античеловеческое-Fab-A488, антикрысиное-A488 и A488 против антител козла – все приобретены в компании Jackson Immunoresearch.

[00383] Для получения антител против TREM2, очищенные белковые антигены, соответствующие внеклеточным доменам TREM2 человека и мыши, получали как слияния Fc и приобретали у R&D Systems (г. Миннеаполис, штат Миннесота). Эти антигены разбавляли в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ) при pH 7,4 и иммобилизовали в 96-луночных иммунопланшетах путем адсорбции в течение ночи при 4C. Затем иммунопланшеты блокировали с помощью бычьего сывороточного альбумина (БСА) и инкубировали с наивной синтетической Fab-фагмидной библиотекой в течение по меньшей мере 2 часов при комнатной температуре. Несвязавшийся фаг удаляли путем интенсивного промывания с помощью ФСБ + 0,05 % Твина-20. Связанный фаг элюировали с использованием 0,1 N HCl. Элюированный фаг нейтрализовали с помощью 1 M трис-Cl pH 8,0 и амплифицировали путем переноса через бактериального хозяина с помощью *транс*-комплементирования хелперным фагом M13KO7. Амплифицированный фаг концентрировали из бактериального супернатанта преципитацией путем добавления 1/5 объема ПЭГ-8000, 2,5 M NaCl, инкубацией на льду 20 минут и центрифугирования при > 17600 x g в течение 20 минут. Осажденный фаг ресуспендировали в ФСБ,

содержащем 0,5 % БСА и 0,05 % Твин-20, и применяли в последующих циклах отбора на адсорбированных мышинных, человеческих или антигенах обоих типов. После от трех до пяти циклов отбора фаг, полученный из отдельных клонов, выросших в 96-луночном формате, и культуральные супернатанты применяли в анализе фаговой ELISA для выявления специфических связывающих клонов. Клоны, которые связывались с антигеном, но не с бычьим сывороточным альбумином или с Fc-контролем человека, подвергали анализу последовательности ДНК. Отбирали и исследовали P1. 2 клоны 2, 5 и 7. Обнаружено, что эти клоны связываются с мышинным и человеческим внеклеточным TREM2 и не связывают мышинный и человеческий внеклеточный TREM1 (данные не показаны). TREM1 (инициирующий рецептор 1, экспрессируемый на миелоидных клетках) имеет номер доступа NM_018643. 3, по состоянию на 25 сентября 2015 г. через веб-сайт NCBI.

[00384] Библиотеку антител получали из Торонтского университета. См. Persson Et al., CDR-H3 Diversity is Not Required for Antigen Recognition by Synthetic Antibodies. *J Mol Biol.* 2013 February 22; 425(4):803-811, в данном документе включена посредством ссылки для непосредственной цели и всех целей. Различные библиотеки синтетических антител также описаны в USPN 7985840 B2, включена в данный документ посредством ссылки, и различных главах книги (Fellouse и Sidhu, «Создание антител в бактериях» в: *Making and Using Antibodies*, Howard and Kaser, eds. Taylor and Francis, 2007, включена в данный документ посредством ссылки.

[00385] Антитела LILRB4 получали с использованием способов, сходных с описанными выше или описанными в заявке WO2013080055, включена в данный документ посредством ссылки. Последовательности клона 1 показаны в таблице ВВ.

[00386] Линии клеток и культивирование клеток

[00387] Клетки MC38 культивировали стандартными методиками культивирования клеток. Вкратце, прикрепленные клетки культивировали при 37°C с 5 % CO₂ в DMEM плюс 10 % FCS с пенициллином, стрептомицином и глутамином на обработанных для тканевой культуры пластиковых планшетах и пересевали через день. Суспензионные клетки EL4 культивировали при 37°C с 5 % CO₂ в RPMI-1640 плюс 10 % FCS с пенициллином, стрептомицином и глутамином в колбах для тканевой культуры и пересевали через день.

[00388] Опухоли мышей

[00389] Всех мышей содержали в условиях SPF (свободных от патогенной микрофлоры) в соответствии с NIH и стандартами Американской ассоциации по уходу за лабораторными животными, и согласно протоколам UCSF IACUC.

[00390] Собирали линии опухолевых клеток, промывали 3 раза ФСБ и инъецировали в конечном объеме 50 мкл. Инъецировали сто пятьдесят тысяч опухолевых клеток подкожно в правый выбритый бок и давали возможность расти в течение 14-21 суток у самцов мышей C57BL/6 возрастом 6-8 недель.

[00391] Рост опухоли

[00392] Для получения кривых роста опухолей в течение указанных периодов времени измеряли опухоли с помощью электронного штангенциркуля как ширина опухоли x высоту опухоли и рассчитывали объем опухоли (мм^3) как $V = (L \times W \times W) / 2$.

[00393] Лечение антителами

[00394] Очищенное антитело против PD-1 (клон RMPI-14) приобретали в BioXcell, IgG1 Fc человека (приобретенный в BioXcell) или полученные своими силами клоны антител инъецировали ВБ по 200 мкг в виде четырех обработок на сутки 5, 8 и 11 и 14 роста опухолей за исключением антитела против TREM2 (P1. 2) (клон 2), которое инъецировали по 40, 20, 20 и 40 мкг в соответствующие сутки.

[00395] Создание трансдуктантов

[00396] Линии клеток создавали путем лентивирусной трансдукции с использованием лентивирусных векторов GeneCoposia и ВИЧ-систем упаковки LentiPack. Следуя инструкциям производителя, линии инфицированных клеток культивировали в селективирующей антибиотике (пурамицин), а также сортировали по экспрессии целевого белка методом FACS.

[00397] Маркирование клеток красителями

[00398] Клетки инкубировали в RPMI без FCS с 0,5 мкМ eFluor670 (eBioscience) или 0,5 мкМ CMТMR (Thermo) в течение 15 минут при 37° С. Затем красители гасили с помощью 2 мл FCS и перед применением промывали в RPMI 10 % FCS 3 раза.

[00399] Анализ внутрибрюшинного истощения

[00400] 2×10^6 меченых красителем клеток каждой из исходной и целевой экспрессирующей трансдуцированной линии клеток инъецировали ВБ самцам мышей WT В6. Через четыре часа

животным инъецировали 500 мкг истощающих или контрольных антител. Через 24 - 36 часов перенесенные клетки выделяли перитонеальным смывом и подсчитывали методом проточной цитометрии.

[00401] Статистический анализ

[00402] Статистические анализы выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Если конкретно не указано иное, то все данные являются репрезентативными из >3 независимых экспериментов. Величины ошибок представлены в виде S. E. M., рассчитанной с использованием Prism, и получены из условий экспериментов с тремя повторами. Конкретные статистические испытания были с односторонними и двухсторонними Т-критериями, а все р-значения < 0,05 считались статистически значимыми.

Пример 13. Присутствие NSM и SDC во множестве опухолей человека.

[00403] Следующим этапом было определение того, существуют ли NSM и SDC среди множества различных типов опухолей человека. Методом проточной цитометрии авторы анализировали биоптаты опухолевых тканей человека из местатической меланомы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКГШ) и карциномы толстой кишки на присутствие популяций SDC и NSM. На репрезентативных графиках проточной цитометрии показано, что прогрессивным распределением по гейтам идентифицированы как популяция NSM, так и популяция SDC, во всех отображенных типах опухолей человека (метастатическая меланома, плоскоклеточная карцинома головы и шеи (ПКГШ) и карцинома толстой кишки). См. Фиг. 13.

Пример 14. Экспрессия белков NSM и связывание в опухоли мыши.

[00404] Следующим этапом было определение того, экспрессируются ли определенные белки NSM на клеточной поверхности NSM и могут ли эти белки NSM связываться антителами против NSM. Определяли также экспрессируются ли определенные белки NSM на SDC.

[00405] Опухоли мышей окрашивали маркерами NSM для демонстрации специфичности этих маркеров для NSM, но не SDC или другими типами клеток или субпопуляций. На Фиг. 14 показано маркирование указанных субпопуляций клеток с помощью различных маркеров NSM, определяющих гейты внутри указанных субпопуляций клеток. Окрашивание по указанным маркерам показано на черных гистограммах, тогда как окрашивание контрольных изотипов показано закрашенными серым цветом гистограммами. Верхняя строка: Меланома B16, окрашенная антителом против TREM2 (Pi1. 2 клон 2); вторая строка: MC38, окрашенная антителом против TREM2 (Pi1. 2 клон 2); третья строка:

MC38, окрашенная антителом против MS4A7 (коммерческое поликлональное антитело, приобретенным в Human Protein Atlas, код продукта: HPA017418); четвертая строка: B16, окрашенная антителом против LILRB4 (Pi1. 5 клон 1); пятая строка: MC38, окрашенная антителом против C5AR1. Данные показывают сильное связывание с воспалительными DC, Ly6c+ моноцитами и TAM и значительное связывание с CD11b+ DC. Незначительное или отсутствие окрашивания наблюдалось для CD103+ DC, T-клеток, B-клеток и опухолевых клеток.

[00406] Связывание данного белка NSM антителом против NSM, направленным против данного белка NSM, указывает, что NSM будут истощаться или уничтожаться посредством известных истощающих механизмов на основе применения антител, например, путем выбора соответствующего домена Fc для обеспечения АЗКЦ.

Пример 15. Экспрессия CCR7 в клетках SDC и NSM человека.

[00407] Методом проточной цитометрии анализировали специфическую экспрессию CCR7 на популяциях SDC и NSM, соответственно, в дезагрегированной опухолевой ткани. Все данные получены из метастатических клеток меланомы человека. На Фиг. 15 показана специфическая экспрессия CCR7 на SDC человека относительно NSM и других иммунных клеток.

Пример 16. Экспрессия белков SDC и связывание в опухоли.

[00408] Следующим этапом было определение того, экспрессируются ли определенные белки SDC на клеточной поверхности SDC и могут ли эти белки SDC связываться антителами против SDC. Определяли также экспрессируются ли определенные белки SDC на NSM.

[00409] Методом проточной цитометрии анализировали специфическую экспрессию продуктов генов SDC и NSM на популяциях SDC и NSM, соответственно, в дезагрегированной опухолевой ткани. Все данные получены на эктопической модели опухоли B78chOVA. Экспрессия маркеров SDC (CCR7 и XCR1; черная линия) по сравнению с соответствующим изотипом (закрашенная серым цветом) среди популяций клеток в опухолях. На Фиг. 16 показана специфическая экспрессия продуктов генов SDC на SDC и отсутствие экспрессии белка SDC на NSM.

Пример 17. Отсутствие связывания NSM за пределами опухоли.

[00410] Костный мозг (KM) и селезенки здоровых мышей B6 дикого типа анализировали методом проточной цитометрии на экспрессию TREM2 (клон 237920, RnD) и MS4A7 (коммерческое поликлональное, Human Protein Atlas).

[00411] На репрезентативных гистограммах показаны уровни окрашивания TREM2 и MS4A7 среди нескольких популяций здоровых тканей. Вторичный контроль (антитело против A488 и антитело против A488, соответственно, от компании Jackson Immunoresearch) для каждой популяции показан закрашенным серым цветом, тогда как окрашивание целевых белков представлено наложением гистограммы со сплошной черной линией для каждой популяции.

[00412] Костный мозг (КМ) и селезенки здоровых мышей В6 дикого типа анализировали методом проточной цитометрии на экспрессию TREM2 (Pi1. 2 клон 2, клон 5 и клон 7) путем окрашивания антител по всему диапазону концентраций окрашивания (2, 20, 200 нМ) по сравнению с контролем (IgG1 Fc человека, маркированного 0 нМ) среди иммунных популяций.

[00413] На Фиг. 17 показано отсутствие существенного окрашивания множества маркеров NSM в здоровых тканях КМ и селезенки. Это дает основание предположить, что применение антител против NSM маловероятно вызывает значительные нецелевые эффекты, например, во время лечения опухоли.

Пример 18. Истощение NSM в опухоли с использованием антител против TREM2 или против LILRB4.

[00414] Следующим этапом было определение того, могут ли антитела против NSM специфически истощать несущие NSM клетки *in vivo*.

[00415] TREM2: Контрольные и экспрессирующие TREM2 (TREM2 может также называться Pi1. 2) клетки-трансфектанты EL4 маркировали красителем CMТMR и EIfour670, соответственно, и смешивали в соотношении 1:1. Смеси из всего 4×10^6 клеток инъецировали ВБ самцам мышей WT В6. Через 4 часа животным инъецировали 500 мкг антитела против Pi1. 2 (против TREM2) или контрольного IgG1 человека. Через 36 часов мышей умерщвляли и выделенные из брюшной полости клетки, собранные путем перитонеального смыва, подсчитывали методом проточной цитометрии. На Фиг. 18 показано, что антитела против TREM2 специфически истощают несущие TREM2 клетки *in vivo*, тогда как контрольное антитело – нет.

[00416] LILRB4 (ILT3): Контрольные и экспрессирующие LILRB4 клетки-трансфектанты EL4, экспрессирующие соответственно TdTomato и GFP, смешивали в соотношении 1:1 с 5×10^5 каждого типа клеток и инъецировали ВБ самцам мышей WT В6. Через два часа животным инъецировали 100 мкг антитела против LILRB4, клон 1, или контрольного ФСБ. Через 24 часа мышей умерщвляли и выделенные из брюшной полости клетки, собранные путем перитонеального смыва, подсчитывали

методом проточной цитометрии. На Фиг. 18 показано, что антитела против LILRB4 специфически истощают несущие LILRB4 клетки *in vivo*.

[00417] Истощение NSM антителом против NSM направлено против данного белка NSM, указывая на то, что антитело против NSM будет снижать рост опухолей при введении субъекту, имеющему опухоль.

Пример 19. Пониженный рост опухоли после введения антител против TREM2.

[00418] Следующим этапом было определение того, могут ли антитела против NSM снижать интенсивность роста опухолей *in vivo*.

[00419] Карциномы толстой кишки MC38 инъецировали самцам мышей B6 возрастом 6 недель в момент времени T0. Мышей, рандомизированно распределенных в группы лечения, лечили указанными антителами на сутки 5, 7, 11, 15 путем ВВ инъекции после опухолевого имплантата. Дозировка: были проведены инъекции 200 мкг/сутки антитела против PD-1 и контроля Fc, 40 мкг, 20 мкг, 20 мкг и 40 мкг антитела против TREM2 (Pi1. 2 клон 2) на сутки 5, 7, 11 и 15. Опухоли измеряли штангенциркулем и показан объем опухолей. Для каждой из групп TREM2 и PD-1 анализа данных отбрасывали наибольшее выпадающее значение. На Фиг. 19 указано, что антитела против NSM снижают рост опухолей относительно контроля в такой же степени, что и терапия с антителом против PD-1.

Пример 20. Истощение NSM в опухоли с использованием антител против NSM.

[00420] Контрольные и экспрессирующие белки NSM клетки-трансфектанты EL4, экспрессирующие соответственно TdTomato и GFP, смешивают в соотношении 1:1, например, с 5×10^5 каждого типа клеток и инъецируют ВВ самцам мышей WT B6. Через два часа животным инъецировали антитело против NSM (например, 100 мкг), контрольный Fc или контрольный ФСБ. Через 24 часа мышей умерщвляют и выделенные из брюшной полости клетки, собранные путем перитонеального смыва, подсчитывают методом проточной цитометрии. Антитела против NSM специфически истощают несущие белки NSM клетки *in vivo*. Антитела против NSM связывают TREM2, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK и/или TMEM119. Белки NSM выбирают из TREM2, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK и TMEM119.

Пример 21. Пониженный рост опухоли после введения антител против NSM.

[00421] Раковые клетки (например, карциномы толстой кишки MC38) инъецируют самцам мышей B6 возрастом 6 недель в момент времени T0. Мышей, рандомизированно распределенных в группы лечения, лечат контрольным Fc или антителом против NSM несколько суток (например, сутки 5, 7, 11, 15) путем ВВ инъекции после опухолевого имплантата. Определяют дозировку, например, 200 мкг/сутки контрольного Fc; 40 мкг, 20 мкг, 20 мкг и 40 мкг антитела против NSM каждые сутки (например, сутки 5, 7, 11 и 15). Опухоли измеряют штангенциркулем и определяют объем опухолей. Антитела против NSM снижают рост опухолей относительно контроля. Антитела против NSM усиливают иммунный ответ по отношению к опухоли у экспериментальных мышей относительно контроля. Антитела против NSM связывают TREM2, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK и/или TMEM119.

Пример 22. Улучшение иммунотерапии посредством совместного введения антител против NSM.

[00422] Раковые клетки (например, карциномы толстой кишки MC38) инъецируют самцам мышей B6 возрастом 6 недель в момент времени T0. Мышей, рандомизированно распределенных в группы лечения, лечат контрольным Fc или антителом против NSM несколько суток (например, сутки 5, 7, 11, 15) путем ВВ инъекции после опухолевого имплантата. Мыши предварительно получали, параллельно получают или впоследствии будут получать иммунотерапию. Виды иммунотерапии могут включать иммунотерапию, которая подавляет ингибитор контрольной точки; иммунотерапию, которая подавляет ингибитор контрольной точки Т-клеток; в которой используются антитела против PD1; против PDL1; против CTLA4; адаптивную Т-клеточную терапию; CAR-Т-клеточную терапию; применение вакцины на основе дендритных клеток; моноцитарной вакцины; антигенсвязывающего белка, который связывает и Т-клетки и антигенпрезентирующие клетки; антигенсвязывающего белка ViTE; toll-подобного приемного лиганда и/или цитокина. Дозировку определяют с использованием информации, доступной в данной области техники и среднему специалисту, например, 200 мкг/сутки контрольного Fc; 40 мкг, 20 мкг, 20 мкг и 40 мкг антитела против NSM каждые сутки (например, сутки 5, 7, 11 и 15). Опухоли измеряют штангенциркулем и определяют объем опухолей. Совместное введение антител против NSM с иммунотерапией усиливает снижение роста опухолей относительно не вводимого совместно контроля (например, монотерапия). Совместное введение антител против NSM с иммунотерапией усиливает иммунный ответ касательно опухолей относительно не вводимого совместно контроля (например, монотерапия). Антитела против NSM связывают TREM2, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK и/или TMEM119.

Пример 23. Анализ порогового значения SDC при иммунотерапии отвечающих по сравнению с неответающими.

[00423] Следующим этапом было определение посредством кривой ROC того, какое процентное пороговое значение SDC является статистическим показателем статуса отвечающих по сравнению с неответающими перед началом иммунотерапии у субъектов, имеющих раковое заболевание.

[00424] Для построения кривой ROC применяли данные %BDCA3, как фракции CD45+, или %BDCA3, как фракции HLA-DR+, отобранных у пациентов с меланомой перед лечением с помощью антитела против PD-1. На кривой отображаются характеристики бинарной системы отвечающий/неотвечающий в виде варьирующих значений % BDCA3+. Кривую строят путем откладывания значений истинной положительной частоты (TPR) в сравнении с ложной положительной частотой (FPR) оптимальных параметров пороговых значений. Истинная положительная частота также известна как чувствительность при выявлении сигнала. Ложная положительная частота также известна как выпавшее значение и может рассчитываться как (1 - специфичность). Большие площади под кривой указывают пороговое значение с большей чувствительностью по сравнению со специфичностью и, таким образом, с большим прогнозируемым значением.

[00425] Дальнейшую валидацию BDCA3, как прогностического фактора, получали с использованием метода DeLong, реализованного пакетом программного обеспечения pROC в R. Для процентного значения DC/HLA+ оценивался 95 % доверительный интервал (CI) значения площади под кривой (AUC) равный [0,76-1] (AUC=0,905 [0,76-1]). Используя бутстреп-метод с 2000 стратифицированных повторений в результате бутстреп, получен CI=[0,73-1] (AUC=0,905 [0,73-1]). Для pct/CD45+ метод DeLong оценивает 95 % CI: [0,59-0,98] (AUC=0,786 [0,59-0,98]), а бутстреп – [0,57-0,95] (AUC=0,786 [0,57-0,95]). На Фиг. 20 показан (A) ROC-анализ BDCA3+ по сравнению с соотношением CD45+ по сравнению с исходом, и (B) ROC-анализ BDCA3+ по сравнению с соотношением HLA-DR+ по сравнению с исходом.

[00426] Фигура показывает, что использование порогового процентного значения BDCA3+/HLADR+ равного 1,347 % представляет собой одно из: вероятность результата с высоким значением BDCA3+ означает, что пациент представляет собой отвечающего на 89 % (так называемая чувствительность), а вероятность результата с низким значением BDCA3+ означает, что пациент представляет собой неответающего на 86 % (так называемая специфичность). Это указывает на то, что увеличение процентного содержания SDC в опухоли до около 1,347 % или больше среди клеток HLA-DR+ в опухоли вероятно приводит к увеличению ответа на противораковую иммунотерапию, предварительное введение, текущее, намеченное введение или наоборот. Такого увеличения можно

достичь, например, увеличением количества SDC (например, посредством применения FLT3L) и/или уменьшением количества NSM (например, посредством применения антител против NSM).

Пример 24. Расширение популяций SDC в опухоль с помощью лечения FLT3-L.

[00427] Раковые клетки (например, карциномы толстой кишки MC38) инъецируют самцам мышей B6 возрастом 6 недель в момент времени T0. Мышей, рандомизированно распределенных в группы лечения, лечат инъекциями FLT3-L или контрольного ФСБ несколько суток (например, сутки 5, 7, 11, 15) путем В. Б., В. В. и/или П. К. инъекций после опухолевого имплантата. Дозировку определяют с использованием информации, доступной в данной области техники и среднему специалисту (например, 10 мкг в 100 мкл ФСБ). Животным с ростом опухолей делают надрезы во множество моментов времени и анализируют избыток SDC и NSM методом проточной цитометрии. Лечение FLT3-L в течение развития опухоли усиливает избыток SDC в опухоли.

Пример 25. Пониженный рост опухоли после лечений с помощью FLT3-L благодаря увеличенным популяциям SDC.

[00428] Раковые клетки (например, карциномы толстой кишки MC38) инъецируют самцам мышей B6 возрастом 6 недель в момент времени T0. Мышей, рандомизированно распределенных в группы лечения, лечат инъекциями FLT3-L или контрольного ФСБ несколько суток (например, сутки 5, 7, 11, 15) путем В. Б., В. В. и или П. К. инъекций после опухолевого имплантата. Дозировку определяют с использованием информации, доступной в данной области техники и среднему специалисту (например, 10 мкг в 100 мкл ФСБ). Опухоли измеряют штангенциркулем и определяют объем опухолей. Лечение FLT3-L снижает рост опухолей относительно контроля. Лечение FLT3-L усиливает избыток SDC в опухоли, а также популяции SDC в dLN, селезенке и костном мозге (KM). FLT3-L усиливает иммунный ответ по отношению к опухоли у экспериментальных мышей относительно контроля.

Пример 26. Улучшение иммунотерапии посредством совместного введения с FLT3-L.

[00429] Раковые клетки (например, карциномы толстой кишки MC38) инъецируют самцам мышей B6 возрастом 6 недель в момент времени T0. Мышей, рандомизированно распределенных в группы лечения, лечат инъекциями FLT3-L или контрольного ФСБ несколько суток (например, сутки 5, 7, 11, 15) путем В. Б., В. В. и или П. К. инъекций после опухолевого имплантата. Мыши предварительно получали, параллельно получают или впоследствии будут получать иммунотерапию. Виды

иммунотерапии могут включать иммунотерапию, которая подавляет ингибитор контрольной точки; иммунотерапию, которая подавляет ингибитор контрольной точки Т-клеток; в которой используются антитела против PD1; против PDL1; против CTLA4; адаптивную Т-клеточную терапию; CAR-Т-клеточную терапию; применение вакцины на основе дендритных клеток; моноцитарной вакцины; антигенсвязывающего белка, который связывает и Т-клетки и антигенпрезентирующие клетки; антигенсвязывающего белка ViTE; toll-подобного приемного лиганда и/или цитокина. Дозировку определяют с использованием информации, доступной в данной области техники и среднему специалисту (например, 10 мкг в 100 мкл ФСБ). Опухоли измеряют штангенциркулем и определяют объем опухолей. Совместное введение FLT3-L с иммунотерапией усиливает снижение роста опухолей относительно не вводимого совместно контроля (например, монотерапия). Совместное введение FLT3-L с иммунотерапией усиливает иммунный ответ касательно опухолей относительно не вводимого совместно контроля (например, монотерапия). См. также Curran et al., Lynch et al., Chen et al., Peron et al. и Shurin et al.

Пример 27. SDC-направленная стимуляция посредством антител-агонистов против FLT3.

[00430] Раковые клетки (например, карциномы толстой кишки MC38) инъецируют самцам мышей B6 возрастом 6 недель в момент времени T0. Мышей, рандомизированно распределенных в группы лечения, лечат инъекциями антител против FLT3 или антител с контрольным Fc несколько суток (например, сутки 5, 7, 11, 15) путем В. Б. инъекции после опухолевого имплантата. Дозировку определяют с использованием информации, доступной в данной области техники и среднему специалисту (например, 200 мкг/сутки контрольного Fc; 40 мкг, 20 мкг, 20 мкг и 40 мкг антител против FLT3). Животным с ростом опухолей делают надрезы во множество моментов времени и анализируют избыток SDC и NSM методом проточной цитометрии. Лечение антителом-агонистом FLT3 в течение развития опухоли усиливает избыток SDC в опухоли, а также популяции SDC в dLN, селезенке и КМ.

Пример 28. Пониженный рост опухоли после лечения с помощью антител-агонистов против FLT3 благодаря увеличенным популяциям SDC.

[00431] Раковые клетки (например, карциномы толстой кишки MC38) инъецируют самцам мышей B6 возрастом 6 недель в момент времени T0. Мышей, рандомизированно распределенных в группы лечения, лечат инъекциями антител-агонистов против FLT3 или контрольным Fc несколько суток (например, сутки 5, 7, 11, 15) путем В. Б. инъекции после опухолевого имплантата. Дозировку определяют с использованием информации, доступной в данной области техники и среднему

специалисту (например, 200 мкг/сутки контрольного Fc; 40 мкг, 20 мкг, 20 мкг и 40 мкг антител против FLT3). Опухоли измеряют штангенциркулем и определяют объем опухолей. Лечение антителом против FLT3 снижает рост опухолей относительно контроля. Лечение антителом против FLT3 усиливает избыток SDC в опухоли, а также популяции SDC в dLN, селезенке и КМ. Антитела-агонисты против FLT3L усиливают иммунный ответ по отношению к опухоли у экспериментальных мышей относительно контроля.

Пример 29. Улучшение иммунотерапии посредством совместного введения с антителами-агонистами против FLT3.

Раковые клетки (например, карциномы толстой кишки MC38) инъецируют самцам мышей B6 возрастом 6 недель в момент времени T0. Мышей, рандомизированно распределенных в группы лечения, лечат инъекциями антител против FLT3 или контрольного ФСБ несколько суток (например, сутки 5, 7, 11, 15) путем В. Б., В. В. и или П. К. инъекций после опухолевого имплантата. Мыши предварительно получали, параллельно получают или впоследствии будут получать иммунотерапию. Виды иммунотерапии могут включать иммунотерапию, которая подавляет ингибитор контрольной точки; иммунотерапию, которая подавляет ингибитор контрольной точки Т-клеток; в которой используются антитела против PD1; против PDL1; против CTLA4; адаптивную Т-клеточную терапию; CAR-Т-клеточную терапию; применение вакцины на основе дендритных клеток; моноцитарной вакцины; антигенсвязывающего белка, который связывает и Т-клетки и антигенпрезентирующие клетки; антигенсвязывающего белка ViTE; toll-подобного приемного лиганда и/или цитокина. Дозировку определяют с использованием информации, доступной в данной области техники и среднему специалисту (например, 10 мкг в 100 мкл ФСБ). Опухоли измеряют штангенциркулем и определяют объем опухолей. Совместное введение антител против FLT3 с иммунотерапией усиливает снижение роста опухолей относительно не вводимого совместно контроля (например, монотерапия). Совместное введение антител против FLT3 с иммунотерапией усиливает иммунный ответ касательно опухолей относительно не вводимого совместно контроля (например, монотерапия).

Пример 30. Экспрессия белков NSM на клетках человека.

[00432] На Фиг. 21 продемонстрирована ограниченная экспрессия белка TREM2 относительно популяций NSM (CD14+ TAM) с небольшой или отсутствием экспрессии на CD14-отрицательных CD11c-положительных клетках, которые включают SDC (BDCA3+ DC) в ткани первичной опухоли ПКГШ человека. Окрашивание TREM2-специфического коммерческого антитела (RnD, клон 237920) выполняли на дезагрегированной опухолевой ткани ПКГШ человека по сравнению со вторичным

контролем окрашивания (анитело IgG крысы, Jackson ImmunoResearch) и анализировали методом проточной цитометрии. На данной фигуре показана специфическая экспрессия продуктов генов NSM на клетках NSM и недостаток экспрессии на клетках SDC в опухолевой ткани человека. Популяции разделяли на гейты на живые, CD45+, отрицательную линию дифференцировки, HLA-DR+, CD11c+ и разбивали по экспрессии CD14.

[00433] Несмотря на то, что изобретение было конкретно проиллюстрировано и описано со ссылкой на предпочтительный вариант реализации изобретения и различные альтернативные варианты реализации изобретения, специалистам в данной области техники понятно, что могут быть внесены различные изменения в отношении формы и деталей без отступления от сущности и объема данного изобретения.

[00434] Все перечисленные в тексте данного описания ссылки, опубликованные патенты и заявки на патенты тем самым включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме и во всех смыслах.

Последовательности

Таблица АА			
	Название	Мышиная, № доступа NCBI	Человеческая, № доступа NCBI
cKIT	гомолог вирусного онкогена кошачьей саркомы Харди-Цукермана 4 v-kit (KIT)	NM_001122733. 1	NM_000222. 2
CCR7	хемокиновый (мотив C-C) рецептор 7 (CCR7)	NM_001301713. 1	NM_001838. 3
BATF3	основной фактор транскрипции с лейциновой застежкой-молнией, ATF-подобный 3 (BATF3)	NM_030060. 2	NM_018664. 2
FLT3	родственная fms тирозинкиназа 3 (FLT3)	NM_010229. 2	NM_004119. 2
ZBTB46	белок 46, содержащий цинковый палец и домен ВТВ (ZBTB46)	NM_027656. 2	NM_025224. 3
IRF8	интерферонрегулирующий фактор 8 (IRF8)	NM_001301811. 1	NM_002163. 2
BTLA	ассоциированный с В- и Т-лимфоцитами белок (BTLA)	NM_001301811. 1	NM_001085357. 1
MYCL1	гомолог, происходящий из вирусного онкогена карциномы легкого миелоцитоматоза птиц, v-мус (MYCL)	NM_001303121. 1	NM_001033081. 2
Clec9A	представитель А семейства 9 с лектиновым доменом С-типа (CLEC9A)	NM_001205363. 1	NM_207345. 3
BDSA3/THBD	тромбомодулин (THBD)	NM_009378. 3	NM_000361. 2
XCR1	хемокиновый (мотив C) рецептор 1 (XCR1)	NM_011798. 4	NM_001024644. 1

C5AR1	рецептор 1 компонента 5а комплемента (C5AR1)	NM_001173550. 1	NM_001736. 3
LYVE1	эндотелиальный гиалуроновый рецептор 1 лимфатических сосудов (LYVE1)	NM_053247. 4	NM_006691. 3
ABCC3	представитель 3 подсемейства C (CFTR/MRP) с АТФ-связывающей кассетой (ABCC3)	NM_029600. 3	NM_001144070. 1
MRC1	маннозный рецептор C-типа 1 (MRC1)	NM_008625. 2	NM_002438. 3
SIGLEC1	связывающий сиаловую кислоту Ig-подобный лектин 1, сиалоадгезин (SIGLEC1)	NM_011426. 3	NM_023068. 3
STAB1	стабилин 1 (STAB1)	NM_138672. 2	NM_015136. 2
C1QA	цепь А субкомпонента q компонента 1 комплемента (C1QA)	NM_007572. 2	NM_015991. 2
C1QB	цепь В субкомпонента q компонента 1 комплемента (C1QB)	NM_009777. 2	NM_000491. 3
TMEM37	трансмембранный белок 37 (TMEM37)	NM_019432. 2	NM_183240. 2
MERTK	протоонкоген MER, тирозинкиназа (MERTK)	NM_008587. 1	NM_006343. 2
C1QC	цепь С субкомпонента q компонента 1 комплемента (C1QC)	NM_007574. 2	NM_001114101. 1
TMEM119	трансмембранный белок 119 (Tmem119)	NM_146162. 2	NM_181724. 2
MS4A7	4-доменный проходящий мембрану представитель 7 подсемейства А (MS4A7)	NM_001025610. 4	NM_021201. 4
APOE	аполипопротеин Е (APOE)	NM_001305819. 1	NM_000041. 3
CYP4F18/ CYP4F2	полипептид 2 подсемейства F, семейства 4, цитохрома P450 (CYP4F2)	NM_024444. 2	NM_001082. 4

TREM2	инициирующий рецептор 2, экспрессирующийся на миелоидных клетках (TREM2)	NM_001272078. 1	NM_001271821. 1
TLR7	toll-подобный рецептор 7 (TLR7)	NM_001290755. 1	NM_016562.3
LILRB4	представитель 4 подсемейства В (с доменами TM и ITIM) лейкоцитарного иммуноглобулинподобного рецептора (LILRB4)	NM_001013894. 1	NM_001278426. 3
<ul style="list-style-type: none"> • Все номера доступа NCBI, описанные в данном документе и ассоциированные последовательности представлены на 25 сентября 2015 г. по доступности посредством открытого доступа на веб-сайте NCBI. 			

Таблица ВВ – CDR, переменные и полноразмерные последовательности каждого фрагмента антитела против LILRB4, клон 1

Клон	H1	H2	H3	L1	L2	L3
Антитело против LILRB4, клон 1-1	GFNLSSSY (SEQ ID NO:1)	ISSSYGST (SEQ ID NO:2)	ARAHYVWYGSVYAH SYGGMDY (SEQ ID NO:3)	QSVSSA (SEQ ID NO:4)	SAS (SEQ ID NO:5)	QQWSGGYSG LIT (SEQ ID NO:6)
Анти-LILRB4.	клон1-1.					vL-
	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFGSRSRGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWSGGYSGLITFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:7)					
Анти-LILRB4.	клон1-1.					vH-
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLSSTYMHWRQAPGKLEWVASISSYGSTYYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARAHYVWYGSVYAHSYGGMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:8)					
Анти-LILRB4.	клон1-1.					hukappa-
	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFGSRSRGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWSGGYSGLITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL					

QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:9)

Анти-LILRB4.

клон1-1.

hulgG1-

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLSSSYMHWVRQAPGKLEWVASISSYGYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARAHYVWYGSVYAHSYGGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO:10)

Литературные источники

- [00435] Bowles JA, Wang SY, Link BK, Allan B, Beuerlein G, Campbell MA, Marquis D, Ondek B, Wooldridge JE, Smith BJ, Breitmeyer JB, Weiner GJ. Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab. *Blood*. 2006 Oct 15;108(8):2648-54. Epub 2006 Jul 6.
- [00436] Desjarlais JR, Lazar GA. Modulation of antibody effector function. *Exp Cell Res*. 2011 May 15;317(9):1278-85.
- [00437] Ferrara C, Grau S, Jäger C, Sondermann P, Brünker P, Waldhauer I, Hennig M, Ruf A, Rufer AC, Stihle M, Umaña P, Benz J. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIIIb and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 2;108(31):12669-74.
- [00438] Heider KH, Kiefer K, Zenz T, Volden M, Stilgenbauer S, Ostermann E, Baum A, Lamche H, Küpcü Z, Jacobi A, Müller S, Hirt U, Adolf GR, Borges E. A novel Fc-engineered monoclonal antibody to CD37 with enhanced ADCC and high proapoptotic activity for treatment of B-cell malignancies. *Blood*. 2011 Oct 13;118(15):4159-68. Epub 2011 Jul 27. *Blood*. 2011 Oct 13;118(15):4159-68. Epub 2011 Jul 27.
- [00439] Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ, Dahiyat BI. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 14;103(11):4005-10. Epub 2006 Mar 6.
- [00440] Lu Y, Vernes JM, Chiang N, Ou Q, Ding J, Adams C, Hong K, Truong BT, Ng D, Shen A, Nakamura G, Gong Q, Presta LG, Beresini M, Kelley B, Lowman H, Wong WL, Meng YG. Identification of IgG(1) variants with increased affinity to FcγRIIIa and unaltered affinity to FcγRI and FcRn: comparison of soluble receptor-based and cell-based binding assays. *J Immunol Methods*. 2011 Feb 28;365(1-2):132-41. Epub 2010 Dec 23.
- [00441] Mizushima T, Yagi H, Takemoto E, Shibata-Koyama M, Isoda Y, Iida S, Masuda K, Satoh M, Kato K. Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans. *Genes Cells*. 2011 Nov;16(11):1071-1080.
- [00442] Moore GL, Chen H, Karki S, Lazar GA. Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs*. 2010 Mar-Apr;2(2):181-9.

- [00443] Nordstrom JL, Gorlatov S, Zhang W, Yang Y, Huang L, Burke S, Li H, Ciccarone V, Zhang T, Stavenhagen J, Koenig S, Stewart SJ, Moore PA, Johnson S, Bonvini E. Anti-tumor activity and toxicokinetics analysis of MGAH22, an anti-HER2 monoclonal antibody with enhanced Fc-gamma receptor binding properties. *Breast Cancer Res.* 2011 Nov 30;13(6):R123. [Epub ahead of print]
- [00444] Richards JO, Karki S, Lazar GA, Chen H, Dang W, Desjarlais JR. Optimization of antibody binding to FcgammaRIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther.* 2008 Aug;7(8):2517-27.
- [00445] Schneider S, Zacharias M. Atomic resolution model of the antibody Fc interaction with the complement C1q component. *Mol Immunol.* 2012 May;51(1):66-72.
- [00446] Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem.* 2001 Mar 2;276(9):6591-604.
- [00447] Stavenhagen JB, Gorlatov S, Tuailon N, Rankin CT, Li H, Burke S, Huang L, Vijn S, Johnson S, Bonvini E, Koenig S. Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating Fcgamma receptors. *Cancer Res.* 2007 Sep 15;67(18):8882-90.
- [00448] Stewart R, Thom G, Levens M, Güler-Gane G, Holgate R, Rudd PM, Webster C, Jermutus L, Lund J. A variant human IgG1-Fc mediates improved ADCC. *Protein Eng Des Sel.* 2011 Sep;24(9):671-8. Epub 2011 May 18.
- [00449] Bejamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate – a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* 57, 289-300.
- [00450] Boissonnas, A., Licata, F., Poupel, L., Jacquelin, S., Fetler, L., Krumeich, S., Thery, C., Amigorena, S., and Combadiere, C. (2013). CD8⁺ tumor-infiltrating T cells are trapped in the tumor-dendritic cell network. *Neoplasia* 15, 85-94.
- [00451] Cancer Genome Atlas Research, N., Weinstein, J. N., Collisson, E. A., Mills, G. B., Shaw, K. R., Ozenberger, B. A., Ellrott, K., Shmulevich, I., Sander, C., and Stuart, J. M. (2013). The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet* 45, 1113-1120.

- [00452] Chang, H. Y., Nuyten, D. S., Sneddon, J. B., Hastie, T., Tibshirani, R., Sorlie, T., Dai, H., He, Y. D., van't Veer, L. J., Bartelink, H., *et al.* (2005). Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 3738-3743.
- [00453] Cheong, C., Matos, I., Choi, J. H., Dandamudi, D. B., Shrestha, E., Longhi, M. P., Jeffrey, K. L., Anthony, R. M., Kluger, C., Nchinda, G., *et al.* (2010). Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* *143*, 416-429.
- [00454] Cortez-Retamozo, V., Etzrodt, M., Newton, A., Rauch, P. J., Chudnovskiy, A., Berger, C., Ryan, R. J., Iwamoto, Y., Marinelli, B., Gorbатов, R., *et al.* (2012). Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 2491-2496.
- [00455] Curran, M. A., and Allison, J. P. (2009). Tumor vaccines expressing flt3 ligand synergize with ctla-4 blockade to reject preimplanted tumors. *Cancer Res* *69*, 7747-7755.
- [00456] Curran, M. A., Montalvo, W., Yagita, H., and Allison, J. P. (2010). PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 4275-4280.
- [00457] DeNardo, D. G., Brennan, D. J., Rexhepaj, E., Ruffell, B., Shiao, S. L., Madden, S. F., Gallagher, W. M., Wadhvani, N., Keil, S. D., Junaid, S. A., *et al.* (2011). Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer discovery* *1*, 54-67.
- [00458] Dranoff, G. (2002). GM-CSF-based cancer vaccines. *Immunol Rev* *188*, 147-154.
- [00459] Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D. W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* *165*, 6037-6046.
- [00460] Engelhardt, J. J., Boldajipour, B., Beemiller, P., Pandurangi, P., Sorensen, C., Werb, Z., Egeblad, M., and Krummel, M. F. (2012). Marginating dendritic cells of the tumor microenvironment cross-present tumor antigens and stably engage tumor-specific T cells. *Cancer Cell* *21*, 402-417.
- [00461] Gao, Y., Nish, S. A., Jiang, R., Hou, L., Licona-Limon, P., Weinstein, J. S., Zhao, H., and Medzhitov, R. (2013). Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity* *39*, 722-732.

- [00462] Gautier, E. L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K. G., Gordonov, S., *et al.* (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol* *13*, 1118-1128.
- [00463] Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* *327*, 656-661.
- [00464] Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S. A., *et al.* (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J Exp Med* *206*, 3115-3130.
- [00465] Graf, L. H., Jr., Kaplan, P., and Silagi, S. (1984). Efficient DNA-mediated transfer of selectable genes and unselected sequences into differentiated and undifferentiated mouse melanoma clones. *Somatic cell and molecular genetics* *10*, 139-151.
- [00466] Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* *20*, 621-667.
- [00467] Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.
- [00468] Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P. S., Wang, X. N., Malinarich, F., Malleret, B., *et al.* (2012). Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* *37*, 60-73.
- [00469] Hashimoto, D., Miller, J., and Merad, M. (2011). Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity* *35*, 323-335.
- [00470] Helmich, B. K., and Dutton, R. W. (2001). The role of adoptively transferred CD8 T cells and host cells in the control of the growth of the EG7 thymoma: factors that determine the relative effectiveness and homing properties of Tc1 and Tc2 effectors. *J Immunol* *166*, 6500-6508.
- [00471] Hildner, K., Edelson, B. T., Purtha, W. E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B. U., Unanue, E. R., Diamond, M. S., *et al.* (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* *322*, 1097-1100.

- [00472] Hoadley, K. A., Yau, C., Wolf, D. M., Cherniack, A. D., Tamborero, D., Ng, S., Leiserson, M. D., Niu, B., McLellan, M. D., Uzunangelov, V., *et al.* (2014). Multiplatform Analysis of 12 Cancer Types Reveals Molecular Classification within and across Tissues of Origin. *Cell* 158, 929-944.
- [00473] Kraman, M., Bambrough, P. J., Arnold, J. N., Roberts, E. W., Magiera, L., Jones, J. O., Gopinathan, A., Tuveson, D. A., and Fearon, D. T. (2010). Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. *Science* 330, 827-830.
- [00474] Kumamoto, Y., Linehan, M., Weinstein, J. S., Laidlaw, B. J., Craft, J. E., and Iwasaki, A. (2013). CD301b(+) dermal dendritic cells drive T helper 2 cell-mediated immunity. *Immunity* 39, 733-743.
- [00475] Kusmartsev, S., Nagaraj, S., and Gabrilovich, D. I. (2005). Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol* 175, 4583-4592.
- [00476] Leach, D. R., Krummel, M. F., and Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271, 1734-1736.
- [00477] Lewis, C. E., and Pollard, J. W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 66, 605-612.
- [00478] Meredith, M. M., Liu, K., Darrasse-Jeze, G., Kamphorst, A. O., Schreiber, H. A., Guermonprez, P., Idoyaga, J., Cheong, C., Yao, K. H., Niec, R. E., and Nussenzweig, M. C. (2012). Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. *J Exp Med* 209, 1153-1165.
- [00479] Miller, J. C., Brown, B. D., Shay, T., Gautier, E. L., Jojic, V., Cohain, A., Pandey, G., Leboeuf, M., Elpek, K. G., Helft, J., *et al.* (2012). Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 13, 888-899.
- [00480] Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stange, G., Van den Bossche, J., Mack, M., Pipeleers, D., In't Veld, P., De Baetselier, P., and Van Ginderachter, J. A. (2010). Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res* 70, 5728-5739.
- [00481] Palmer, C., Diehn, M., Alizadeh, A. A., and Brown, P. O. (2006). Cell-type specific gene expression profiles of leukocytes in human peripheral blood. *BMC genomics* 7, 115.

- [00482] Ries, C. H., Cannarile, M. A., Hoves, S., Benz, J., Wartha, K., Runza, V., Rey-Giraud, F., Pradel, L. P., Feuerhake, F., Klaman, I., *et al.* (2014). Targeting Tumor-Associated Macrophages with Anti-CSF-1R Antibody Reveals a Strategy for Cancer Therapy. *Cancer Cell* 25, 846-859.
- [00483] Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I. C., Lennon-Dumenil, A. M., Seabra, M. C., Raposo, G., and Amigorena, S. (2006). NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 126, 205-218.
- [00484] Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S. E., Pollard, J. W., *et al.* (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336, 86-90.
- [00485] Strachan, D. C., Ruffell, B., Oei, Y., Bissell, M. J., Coussens, L. M., Pryer, N., and Daniel, D. (2013). CSF1R inhibition delays cervical and mammary tumor growth in murine models by attenuating the turnover of tumor-associated macrophages and enhancing infiltration by CD8 T cells. *Oncoimmunology* 2, e26968.
- [00486] Tamura, T., Taylor, P., Yamaoka, K., Kong, H. J., Tsujimura, H., O'Shea, J. J., Singh, H., and Ozato, K. (2005). IFN regulatory factor-4 and -8 govern dendritic cell subset development and their functional diversity. *J Immunol* 174, 2573-2581.
- [00487] Tussiwand, R., Lee, W. L., Murphy, T. L., Mashayekhi, M., Kc, W., Albring, J. C., Satpathy, A. T., Rotondo, J. A., Edelson, B. T., Kretzer, N. M., *et al.* (2012). Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature* 490, 502-507.
- [00488] Viigimaa, M., Vaverkova, H., Farnier, M., Averna, M., Missault, L., Hanson, M. E., Dong, Q., Shah, A., and Brudi, P. (2010). Ezetimibe/simvastatin 10/20 mg versus rosuvastatin 10 mg in high-risk hypercholesterolemic patients stratified by prior statin treatment potency. *Lipids in health and disease* 9, 127.
- [00489] Williams, J. W., Tjota, M. Y., Clay, B. S., Vander Lugt, B., Bandukwala, H. S., Hrusch, C. L., Decker, D. C., Blaine, K. M., Fixsen, B. R., Singh, H., *et al.* (2013). Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nature communications* 4, 2990.
- [00490] Wolf, D. M., Lenburg, M. E., Yau, C., Boudreau, A., and van 't Veer, L. J. (2014). Gene co-expression modules as clinically relevant hallmarks of breast cancer diversity. *PLoS One* 9, e88309.
- [00491] Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E. Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E. R., Graf, T., Pollard, J. W., Segall, J., and Condeelis, J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 64, 7022-7029.

- [00492] Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* *11*, R106.
- [00493] Bertram, J. S., and Janik, P. (1980). Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture. *Cancer Lett* *11*, 63-73.
- [00494] Curran, M. A., and Allison, J. P. (2009). Tumor vaccines expressing flt3 ligand synergize with ctla-4 blockade to reject preimplanted tumors. *Cancer Res* *69*, 7747-7755.
- [00495] Choi, C. H., Webb, B. A., Chimenti, M. S., Jacobson, M. P., and Barber, D. L. (2013). pH sensing by FAK-His58 regulates focal adhesion remodeling. *J Cell Biol* *202*, 849-859.
- [00496] Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., and Mulligan, R. C. (1993). Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 3539-3543.
- [00497] Fidler, I. J. (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res* *35*, 218-224.
- [00498] Friedman, R. S., Jacobelli, J., and Krummel, M. F. (2006). Surface-bound chemokines capture and prime T cells for synapse formation. *Nat Immunol* *7*, 1101-1108.
- [00499] Graf, L. H., Jr., Kaplan, P., and Silagi, S. (1984). Efficient DNA-mediated transfer of selectable genes and unselected sequences into differentiated and undifferentiated mouse melanoma clones. *Somatic cell and molecular genetics* *10*, 139-151.
- [00500] Hadjantonakis, A. K., Macmaster, S., and Nagy, A. (2002). Embryonic stem cells and mice expressing different GFP variants for multiple non-invasive reporter usage within a single animal. *BMC Biotechnol* *2*, 11.
- [00501] Halpern, J., Lynch, C. C., Fleming, J., Hamming, D., Martin, M. D., Schwartz, H. S., Matrisian, L. M., and Holt, G. E. (2006). The application of a murine bone bioreactor as a model of tumor: bone interaction. *Clinical & experimental metastasis* *23*, 345-356.
- [00502] Hoquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., and Carbone, F. R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* *76*, 17-27.

- [00503] Hyman, R., Ralph, P., and Sarkar, S. (1972). Cell-specific antigens and immunoglobulin synthesis of murine myeloma cells and their variants. *Journal of the National Cancer Institute* 48, 173-184.
- [00504] Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M. J., Kreutzberg, G. W., Sher, A., and Littman, D. R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and cellular biology* 20, 4106-4114.
- [00505] Khanna, K. M., Blair, D. A., Vella, A. T., McSorley, S. J., Datta, S. K., and Lefrancois, L. (2010). T cell and APC dynamics in situ control the outcome of vaccination. *J Immunol* 185, 239-252.
- [00506] Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K., and Dalla-Favera, R. (2006). Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol* 7, 773-782.
- [00507] Koivusalo, M., Welch, C., Hayashi, H., Scott, C. C., Kim, M., Alexander, T., Touret, N., Hahn, K. M., and Grinstein, S. (2010). Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J Cell Biol* 188, 547-563.
- [00508] Liu, F., Wu, H. Y., Wesselschmidt, R., Kornaga, T., and Link, D. C. (1996). Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity* 5, 491-501.
- [00509] Meredith, M. M., Liu, K., Darrasse-Jeze, G., Kamphorst, A. O., Schreiber, H. A., Guermonprez, P., Idoyaga, J., Cheong, C., Yao, K. H., Niec, R. E., and Nussenzweig, M. C. (2012). Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. *J Exp Med* 209, 1153-1165.
- [00510] Moore, M. W., Carbone, F. R., and Bevan, M. J. (1988). Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54, 777-785.
- [00511] Moran, A. E., Holzapfel, K. L., Xing, Y., Cunningham, N. R., Maltzman, J. S., Punt, J., and Hogquist, K. A. (2011). T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J Exp Med* 208, 1279-1289.
- [00512] Ouyang, X., Zhang, R., Yang, J., Li, Q., Qin, L., Zhu, C., Liu, J., Ning, H., Shin, M. S., Gupta, M., *et al.* (2011). Transcription factor IRF8 directs a silencing programme for TH17 cell differentiation. *Nature communications* 2, 314.

- [00513] Robb, L., Drinkwater, C. C., Metcalf, D., Li, R., Kontgen, F., Nicola, N. A., and Begley, C. G. (1995). Hematopoietic and lung abnormalities in mice with a null mutation of the common beta subunit of the receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukins 3 and 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 9565-9569.
- [00514] Ruffell, B., Au, A., Rugo, H. S., Esserman, L. J., Hwang, E. S., and Coussens, L. M. (2012). Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 2796-2801.
- [00515] Trapnell, C., Pachter, L., and Salzberg, S. L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* *25*, 1105-1111.
- [00516] Veiga-Fernandes, H., Coles, M. C., Foster, K. E., Patel, A., Williams, A., Natarajan, D., Barlow, A., Pachnis, V., and Kioussis, D. (2007). Tyrosine kinase receptor RET is a key regulator of Peyer's patch organogenesis. *Nature* *446*, 547-551.
- [00517] Webb, B. A., Chimenti, M., Jacobson, M. P., and Barber, D. L. (2011). Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer* *11*, 671-677.
- [00518] Williams, J. W., Tjota, M. Y., Clay, B. S., Vander Lugt, B., Bandukwala, H. S., Hrusch, C. L., Decker, D. C., Blaine, K. M., Fixsen, B. R., Singh, H., *et al.* (2013). Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nature communications* *4*, 2990.
- [00519] Leach, D. R., Krummel, M. F. & Allison, J. P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* *271*, 1734-1736 (1996).
- [00520] Hodi, F. S., *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* *363*, 711-723 (2010).
- [00521] Wolchok, J. D., *et al.* Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *The New England journal of medicine* *369*, 122-133 (2013).
- [00522] Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* *12*, 252-264 (2012).
- [00523] Topalian, S. L., *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *The New England journal of medicine* *366*, 2443-2454 (2012).

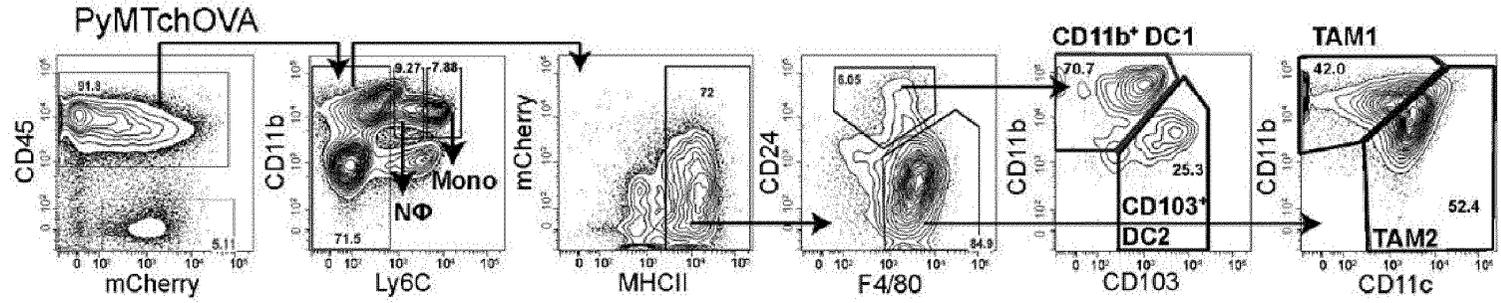
- [00524] Hamid, O., *et al.* Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *The New England journal of medicine* **369**, 134-144 (2013).
- [00525] Broz, M. L., *et al.* Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. *Cancer Cell* **26**, 638-652 (2014).
- [00526] DeNardo, D. G., *et al.* Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer discovery* **1**, 54-67 (2011).
- [00527] Hanada, T., *et al.* Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* **7**, 263-269 (2000).
- [00528] Sandel, M. H., *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin Cancer Res* **11**, 2576-2582 (2005).
- [00529] Bogunovic, D., *et al.* Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20429-20434 (2009).
- [00530] Fridman, W. H., Pages, F., Sautes-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* **12**, 298-306 (2012).
- [00531] Ascierto, P. A., *et al.* The additional facet of immunoscore: immunoprofiling as a possible predictive tool for cancer treatment. *J Transl Med* **11**, 54 (2013).
- [00532] Angelo, M., *et al.* Multiplexed ion beam imaging of human breast tumors. *Nat Med* **20**, 436-442 (2014).
- [00533] Le, D. T., *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *The New England journal of medicine* (2015).
- [00534] Snyder, A., *et al.* Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *New England Journal of Medicine* **371**, 2189-2199 (2014).
- [00535] Selby, M. J., *et al.* Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer immunology research* **1**, 32-42 (2013).
- [00536] Bell, D., *et al.* In Breast Carcinoma Tissue, Immature Dendritic Cells Reside within the Tumor, Whereas Mature Dendritic Cells Are Located in Peritumoral Areas. *The Journal of Experimental Medicine* **190**, 1417-1426 (1999).

- [00537] Dieu-Nosjean, M. C., *et al.* Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol* **26**, 4410-4417 (2008).
- [00538] Bejamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate – a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* **57**, 289-300 (1995).
- [00539] Ruffell, B., *et al.* Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 2796-2801 (2012).
- [00540] Graf, L. H., Jr., Kaplan, P. & Silagi, S. Efficient DNA-mediated transfer of selectable genes and unselected sequences into differentiated and undifferentiated mouse melanoma clones. *Somatic cell and molecular genetics* **10**, 139-151 (1984).
- [00541] Engelhardt, J. J., *et al.* Marginating dendritic cells of the tumor microenvironment cross-present tumor antigens and stably engage tumor-specific T cells. *Cancer Cell* **21**, 402-417 (2012).
- [00542] Meredith, M. M., *et al.* Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. *J Exp Med* **209**, 1153-1165 (2012).
- [00543] Curran and Allison. 'Tumor Vaccines Expressing Flt3-Ligand Synergize with CTLA-4 Blockade to Reject Pre-Implanted Tumors' Cancer Research 2009.
- [00544] Lynch, D. H., A. Andreasen, E. Maraskovsky, J. Whitmore, R. E. Miller, J. C. Schuh. 1997. Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* **3**: 625.
- [00545] Chen, K., S. Braun, S. Lyman, Y. Fan, C. M. Traycoff, E. A. Wiebke, J. Gaddy, G. Sledge, H. E. Broxmeyer, K. Cornetta. 1997. Antitumor activity and immunotherapeutic properties of Flt3-ligand in a murine breast cancer model. *Cancer Res.* **57**: 3511.
- [00546] Peron, J. M., C. Esche, V. M. Subbotin, C. Maliszewski, M. T. Lotze, M. R. Shurin. 1998. Flt3-ligand administration inhibits liver metastases: role of NK cells. *J. Immunol.* **161**: 6164.
- [00547] Shurin, M. R., C. Esche, M. T. Lotze. 1998. FLT3: receptor and ligand: biology and potential clinical application. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**: 3

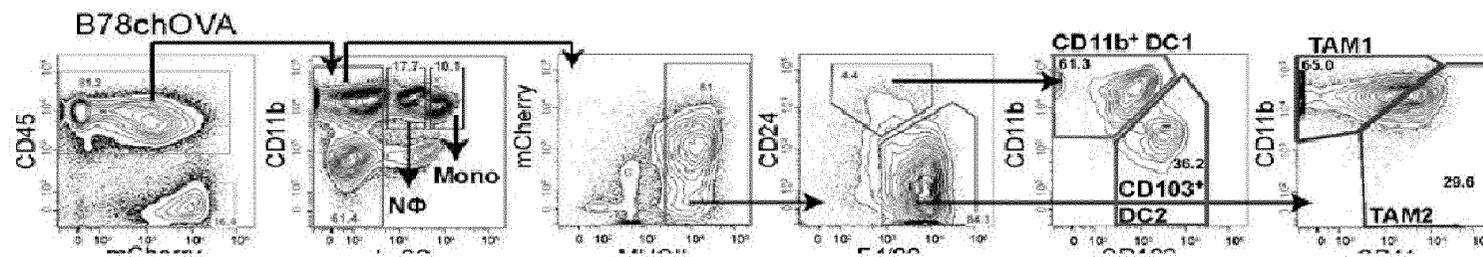
ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака у субъекта, получающего лечение антителом против иницирующего рецептора 2, экспрессируемого на миелоидных клетках (TREM2), или его антигенсвязывающим фрагментом, включающий введение субъекту иммунотерапии, выбранной из группы, состоящей из: иммунотерапии, которая ингибирует ингибитор контрольной точки; иммунотерапии, которая ингибирует ингибитор контрольной точки Т-клеток; антитела против PD1; антитела против PDL1; антитела против CTLA4; пембромизулаба; ниволумаба и ипилимумаба.
2. Способ по п. 1, включающий введение пембромизулаба субъекту.
3. Способ по п. 1, включающий введение ниволумаба субъекту.
4. Способ по п. 1, включающий введение ипилимумаба субъекту.
5. Способ по п. 1, в котором рак представляет собой солидный рак или гемобластоз.
6. Способ по п. 1, в котором рак выбран из группы, состоящей из: меланомы, рака почки, гепатобилиарного рака, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКГШ), рака поджелудочной железы, толстой кишки, мочевого пузыря, глиобластомы, рака простаты, легкого и молочной железы.
7. Способ по п. 1, в котором иммунотерапию вводят параллельно с антителом против TREM2 или его антигенсвязывающим фрагментом.
8. Способ по п. 1, в котором иммунотерапию вводят последовательно с антителом против TREM2 или его антигенсвязывающим фрагментом.
9. Способ по п. 1, в котором субъект ранее получал иммунотерапию.
10. Способ по п. 9, в котором ранее полученная иммунотерапия включает по меньшей мере одну из иммунотерапии, которая ингибирует ингибитор контрольной точки; иммунотерапии, которая ингибирует ингибитор контрольной точки Т клеток; антитело против PD1; антитело против PDL1; антитело против CTLA4; пембромизулаб; ниволумаб или ипилимумаб.
11. Способ по п. 1, в котором антитело против TREM2 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой по меньшей мере один из моноклонального антитела, антитела IgG1, антитела IgG4, афукозилированного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела и полноразмерного антитела и антигенсвязывающего фрагмента.
12. Способ по п. 1, в котором антитело против TREM2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит человеческий Fc домен .
13. Способ по п. 1, в котором антитело против TREM2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит Fc домен IgG1 человека.
14. Способ по п. 1, в котором антитело против TREM2 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой афукозилированное антитело.
15. Способ по п. 1, в котором антитело против TREM2 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело.

16. Способ по п. 1, в котором антитело против TREM2 или его антигенсвязывающий фрагмент присутствует в количестве эффективном для уничтожения, блокирования или истощения TREM2+ миелоидной клетки посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности, антитело-опосредованной активности фагоцитоза, комплементзависимой цитотоксичности или антитело-опосредованной активности фагоцитоза.
17. Способ по п. 1, дополнительно включающий определение присутствия TREM2+ миелоидных клеток из образца рака, полученного у субъекта.
18. Способ по п. 17, в котором образец рака получают путем игольчатой биопсии, штанцевой биопсии или хирургическим иссечением опухоли.
19. Способ по п. 17, в котором стадия определения включает определение присутствия экспрессии мРНК TREM2 или экспрессии белка TREM2.
20. Способ по п. 17, в котором стадию определения осуществляют с использованием по меньшей мере одного из метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), количественной ПЦР (кПЦР), количественной ПЦР в режиме реального времени (кПЦР-РВ), анализа на микрочипах, на генетическом чипе, секвенированием РНК и сортировки клеток.

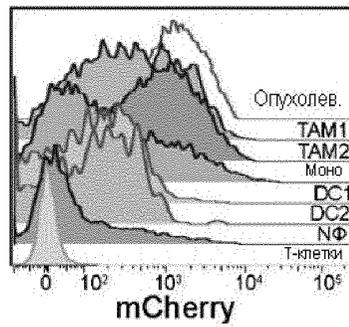


ФИГ. 1А



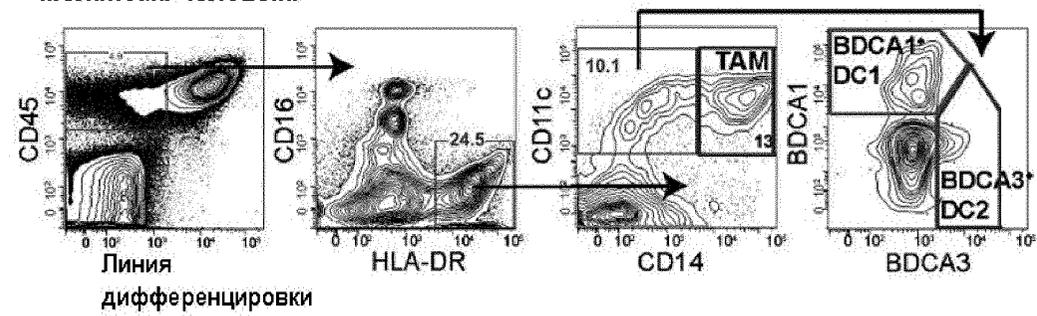
ФИГ. 1В

ФИГ. 1С

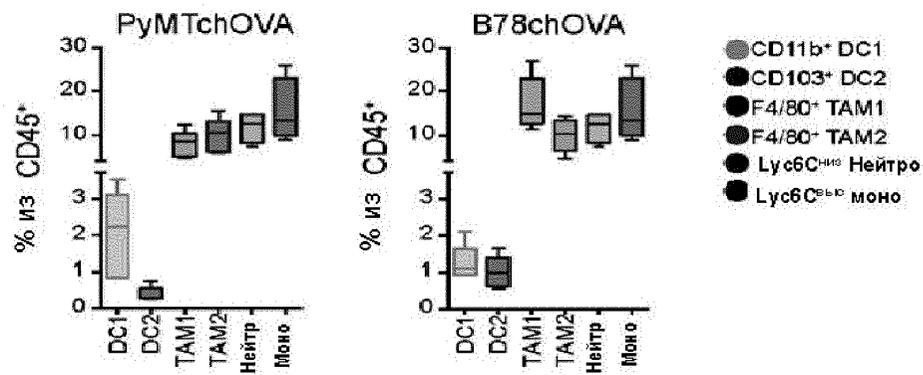


ФИГ. 1D

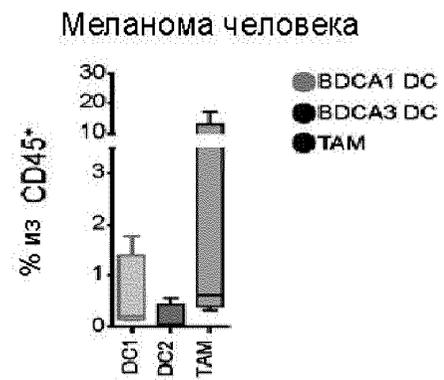
Меланома человека



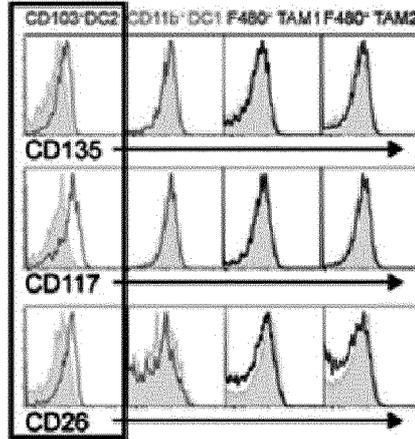
ФИГ. 1Е



ФИГ. 1F

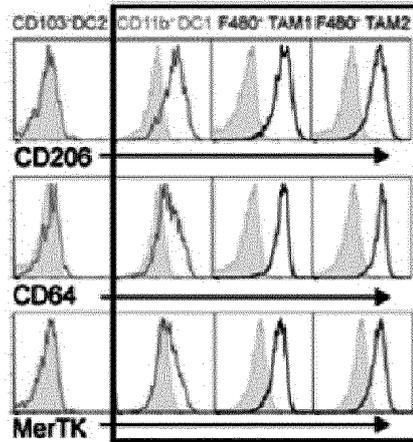


Дендритные клеточные маркеры

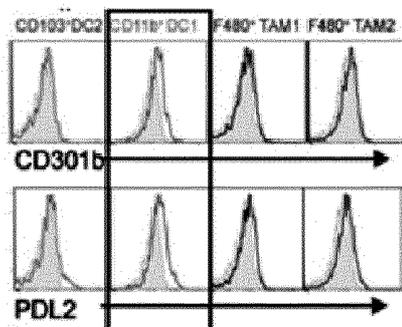


ФИГ. 2А

Макрофагальные клеточные маркеры



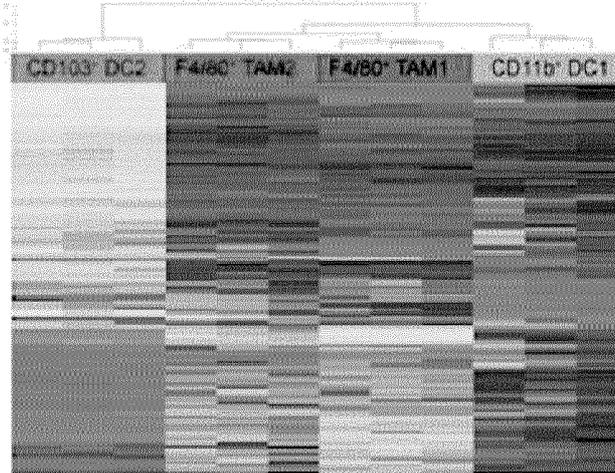
ФИГ. 2В

T_H2 Дендритный клеточный маркер-

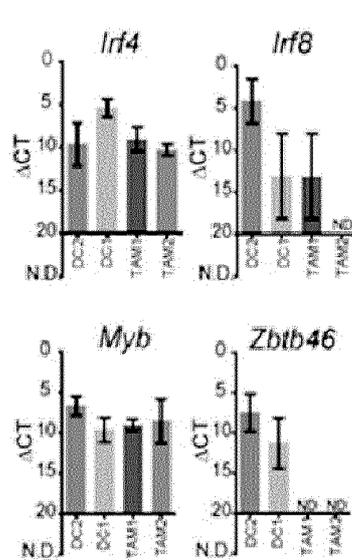
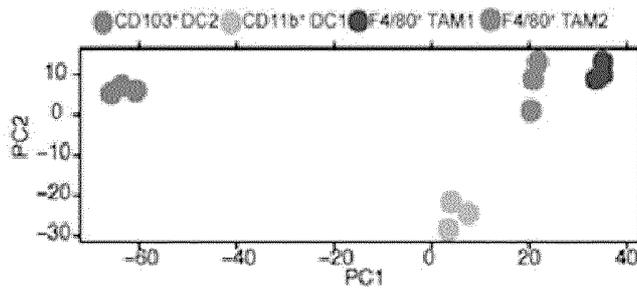
ФИГ. 2С

ФИГ. 2D

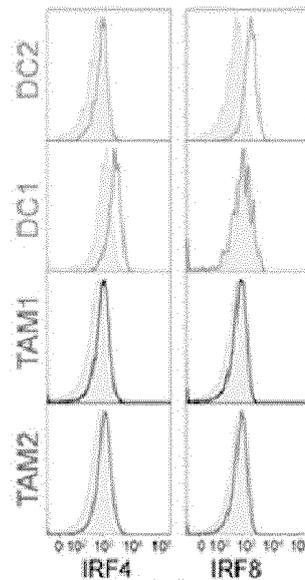
Log₂ FC относ. общего средн. для наиболее активных 1000 генов по вариации



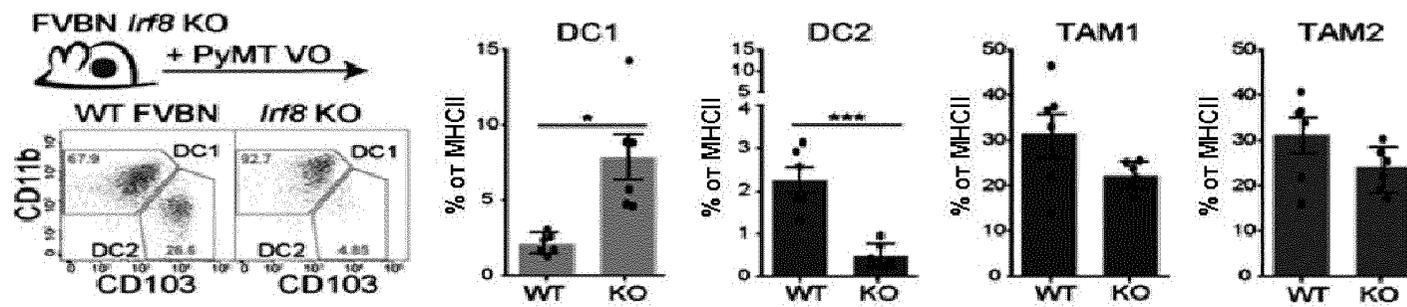
ФИГ. 2E



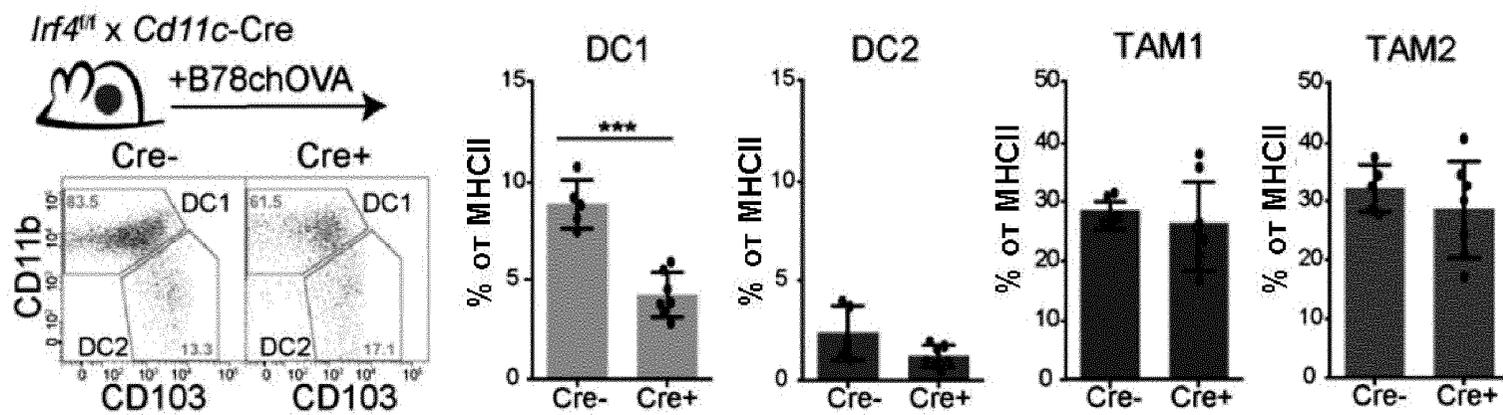
ФИГ. 2F



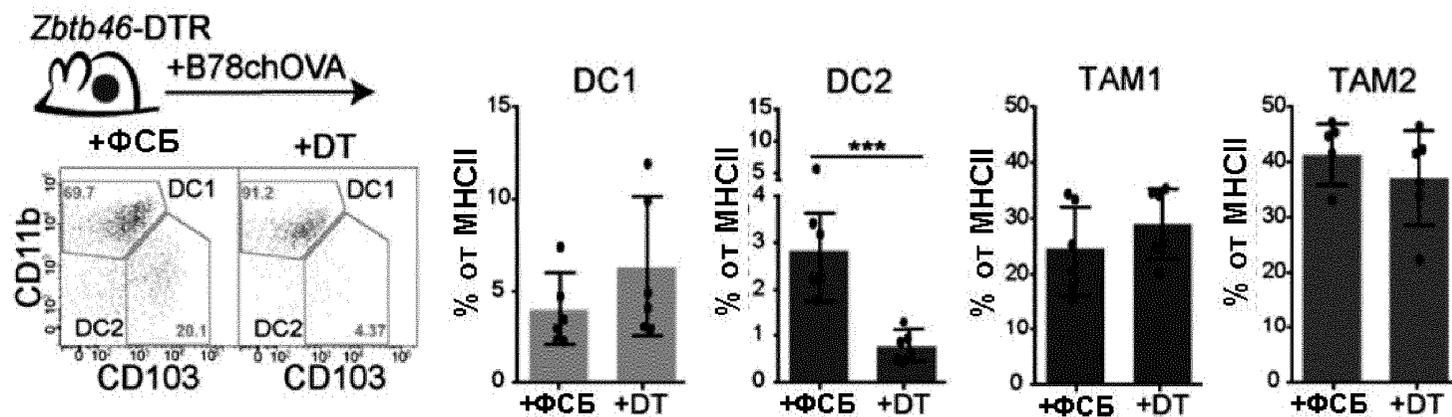
ФИГ. 2G



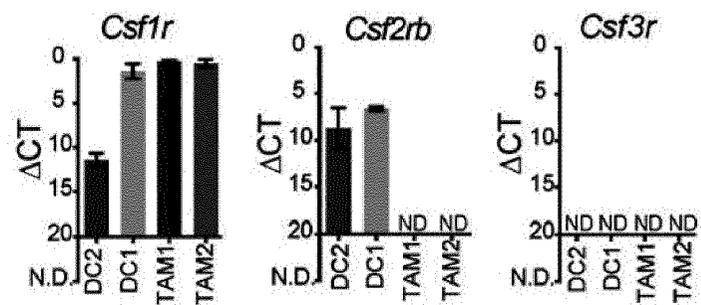
ΦΙΓ. 3Α



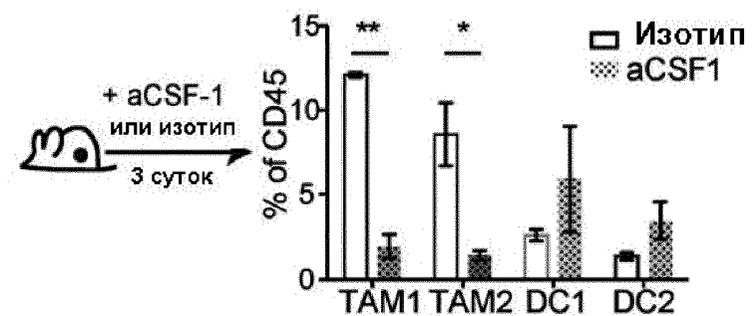
ΦΙΓ. 3Β



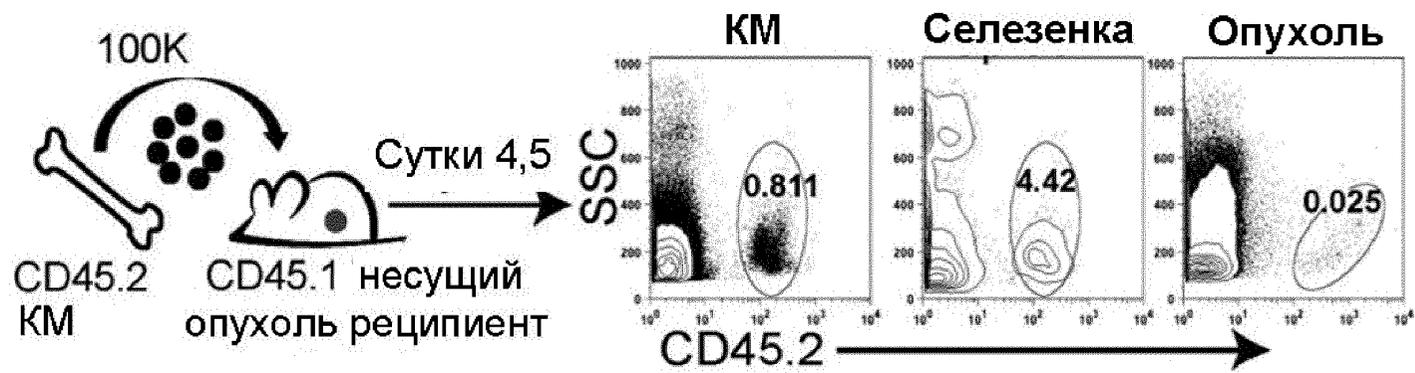
ФИГ. 3D



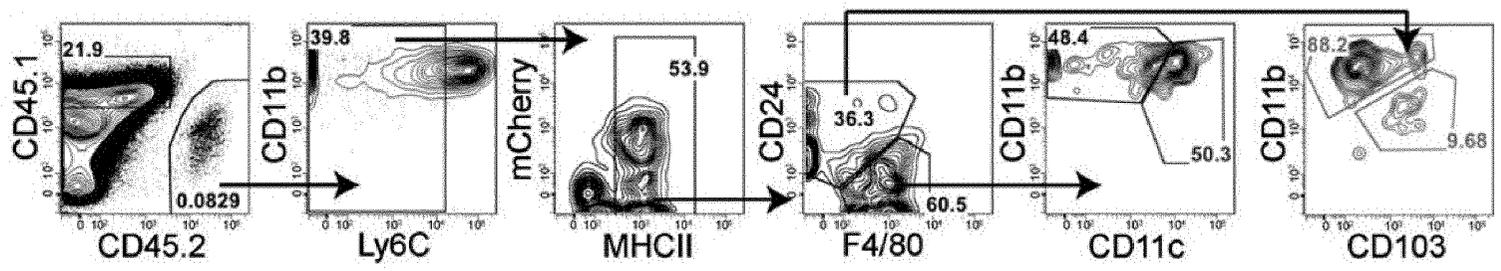
ФИГ. 4А



ФИГ. 4В

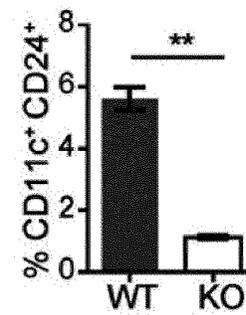
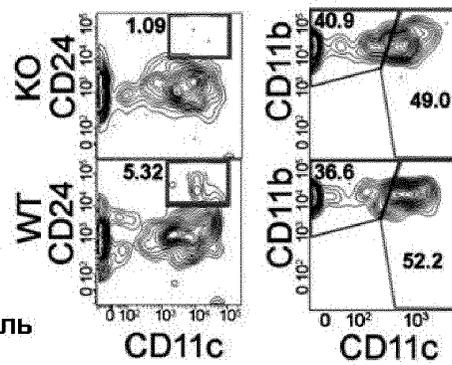
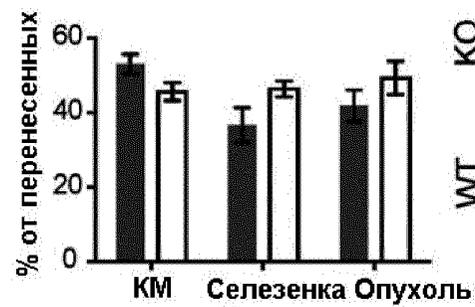
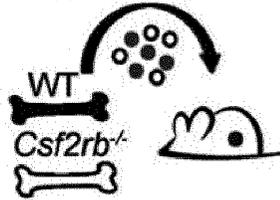


ФИГ. 4С



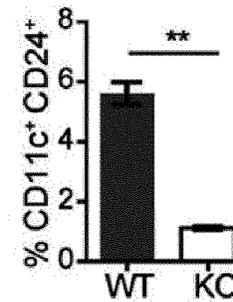
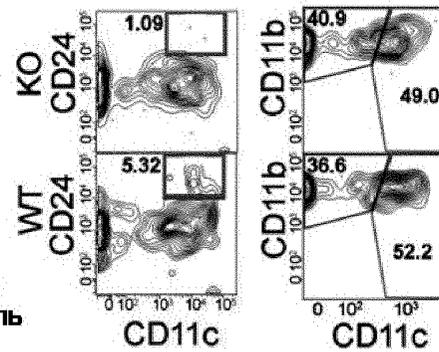
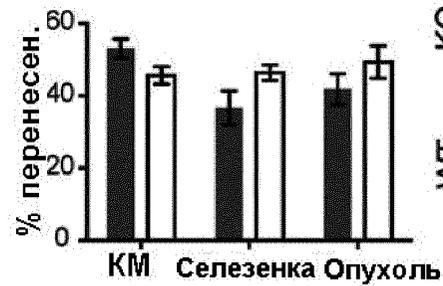
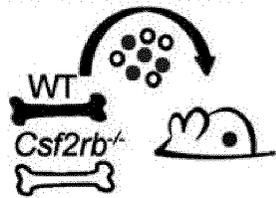
ФИГ. 4D

100K WT : 100K KO



ФИГ. 4Е

100K WT : 100K KO

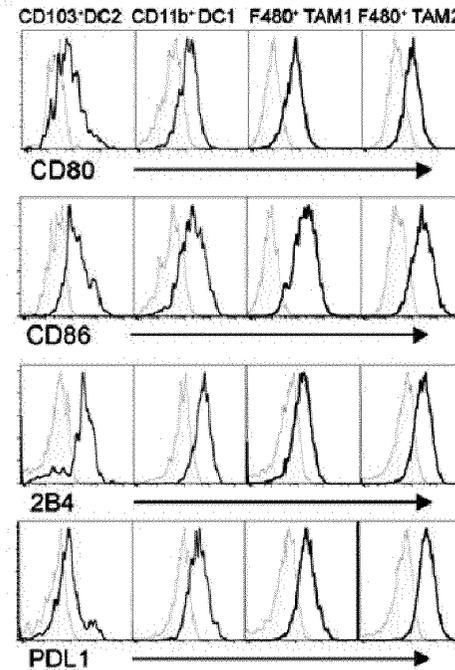


ФИГ. 4F

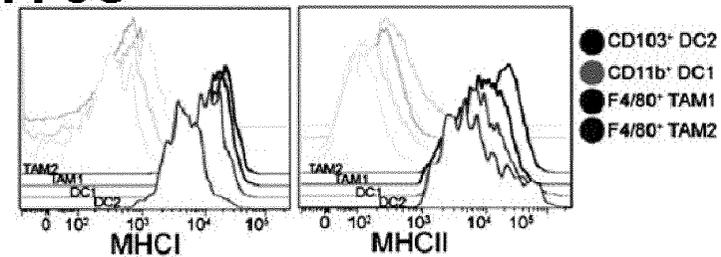
ФИГ. 5А

	CD103	CD11b	TAM1	TAM2
TAP1	12.5281872	11.3348079	11.3423345	11.5203036
TAP2	9.77746428	8.58700091	8.20900126	8.33302989
MB8/LAMP7	12.6270849	11.8973346	11.7930322	11.8267684
PSMB9	13.9343351	12.3374391	12.4760725	12.555713
TAPBP	12.4973706	11.7663449	11.8948052	12.0346708
PSME2	12.9020982	11.7030045	11.7658732	11.8983784
CD24a	13.8571846	12.9903113	7.11109957	8.03201505
CD274	12.8763543	12.2493377	11.7610041	12.1303198
CD86	12.7748317	11.252308	10.9022457	11.0999987
BTLA	12.7911575	7.99711245	2.5852609	6.52747475
CD80	10.518393	9.91003335	8.01810822	8.42733576
CD40	10.6699583	9.67604424	10.2010209	10.3156094
CD244	9.93719015	9.27286307	8.11255024	9.02037874
ICOSL	10.6439223	10.1115522	9.67778802	9.81486732
ICAM1	11.423507	11.8605509	11.48564	11.2930632
TIM3	12.6070773	10.6547947	11.1333441	11.6593625
PDL2	10.6433634	9.50920322	6.53221079	8.69061794
RANK	10.5340067	10.6247424	11.2368622	11.0920542
FLT3	12.4211476	7.84044727	4.18925978	6.15871459
CSF2R8	13.6661111	13.3249597	11.3522942	12.1031801
CSF2R2	11.5849389	11.222547	9.85284718	10.6225069
CSF2RA	10.6975683	11.9916791	10.2279991	10.4697646
CSF1R	9.0290986	13.2365753	13.9855404	13.8867233
CSF3R	6.15672919	8.68091917	10.132956	10.1897088
IL12b	12.6320379	9.0438971	5.14054336	6.58551795
IL10	4.86634428	9.09989976	11.2756788	9.75595818
XCR1	13.2611816	8.20780119	6.88202834	7.1663434
CCR7	14.3089476	11.5330673	7.06931626	10.0516651
CCR2	11.8762979	13.8973662	11.8842776	12.8868015
CX3CR1	6.21446354	9.90293534	11.4991964	11.8184148
CCL22	14.6664035	12.4422523	7.22110286	10.5986464
CXCL9	13.9976075	14.1078814	15.2567802	15.7816488
CCL5	14.0351061	11.4975837	9.59971671	11.0933727
CXCL10	10.7245017	12.9069587	13.4991943	13.3547892
CCL12	6.80300402	10.9719111	13.5778008	13.1085234

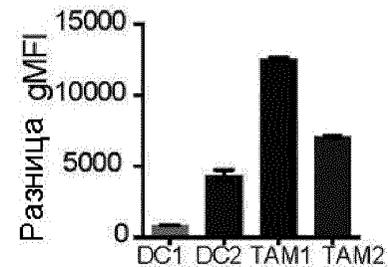
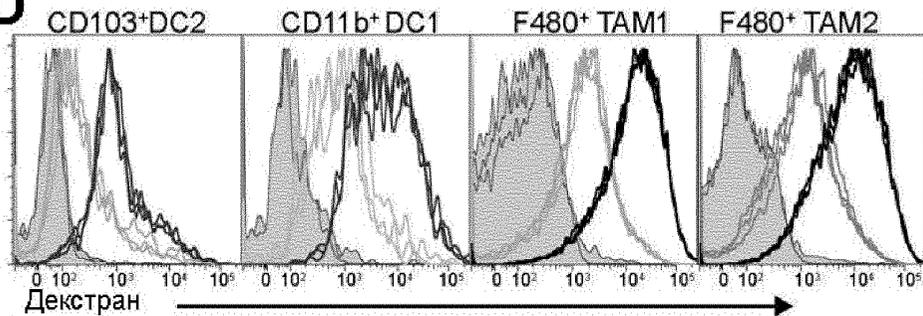
ФИГ. 5В Регуляторные молекулы



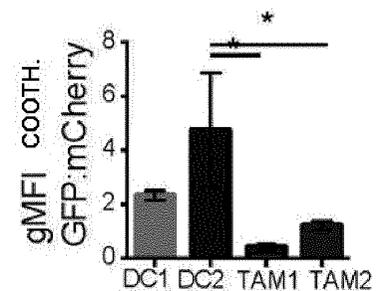
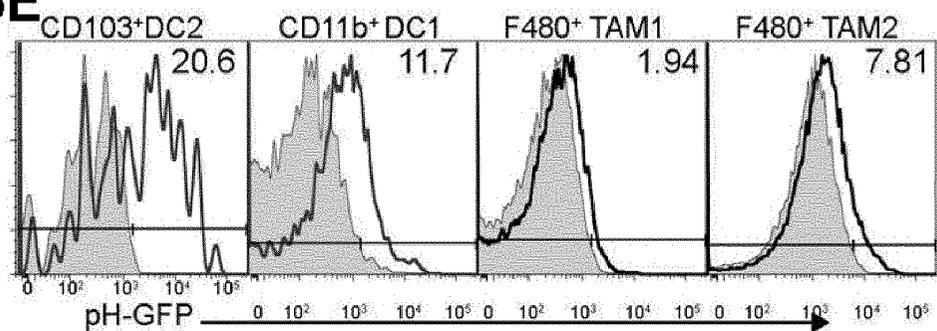
ФИГ. 5С



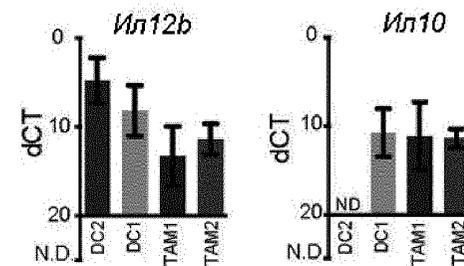
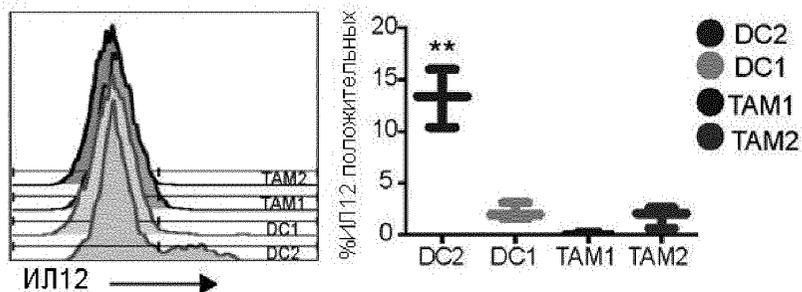
ФИГ. 5D



ФИГ. 5E



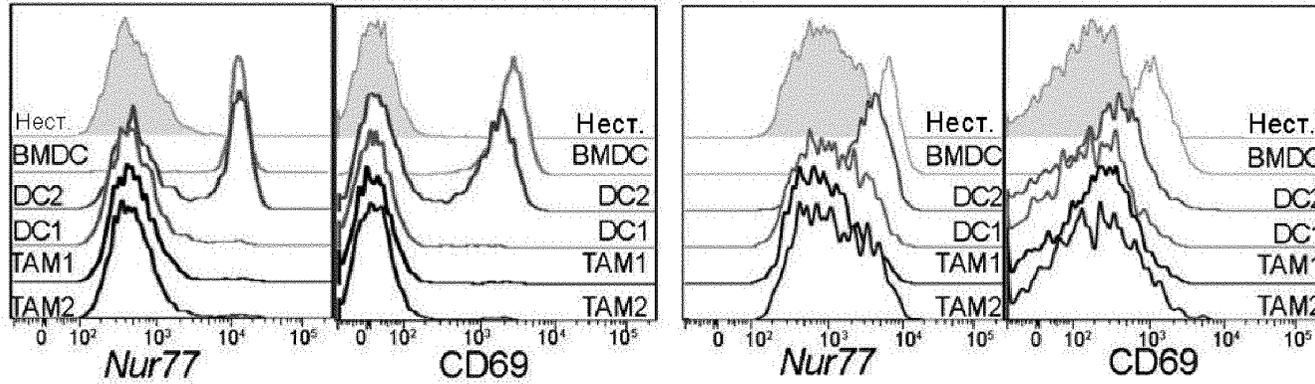
ФИГ. 5F



ФИГ. 6А

Наивные OT-I CD8⁺ Т-клетки

Раннее активиров. OT-I CD8⁺ Т-клетки



ФИГ. 6В

ФИГ. 6С

Наивные OT-I CD8⁺ Т-клетки

CD103⁺DC2

CD11b⁺DC1

F480⁺TAM1

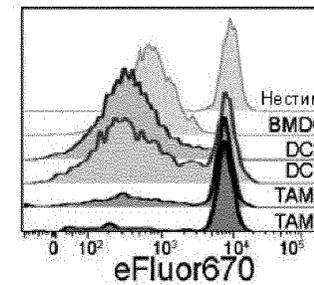
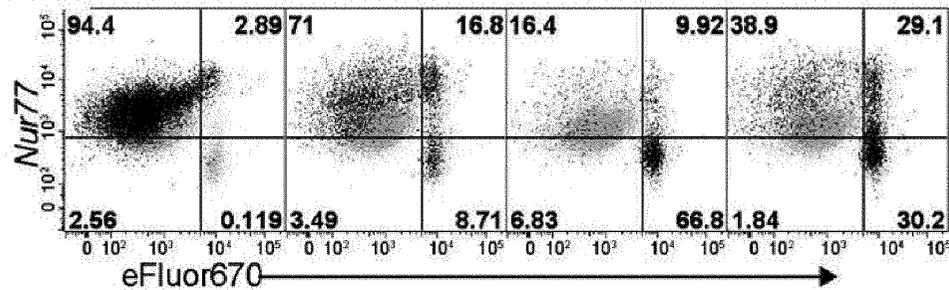
F480⁺TAM2

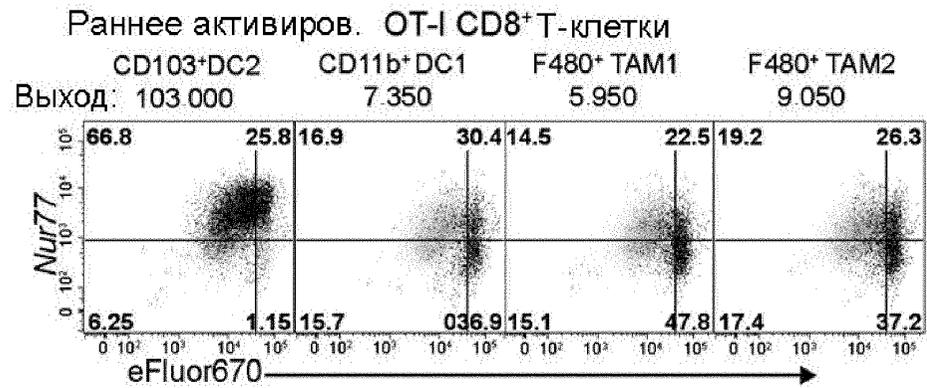
Выход: 347 400

71 000

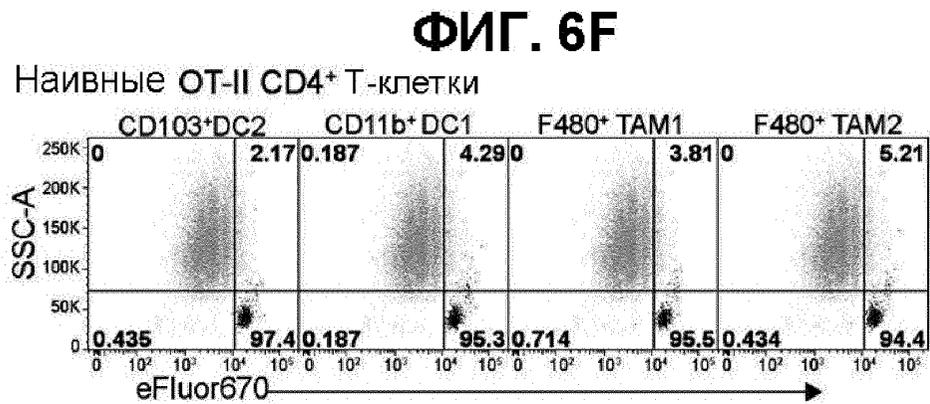
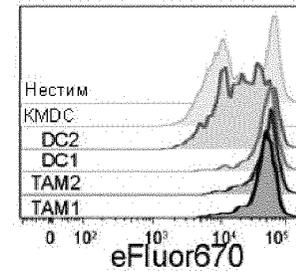
5 400

15 400

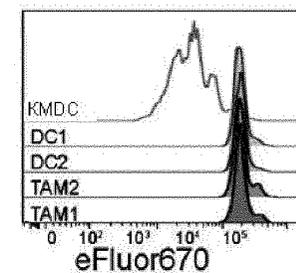




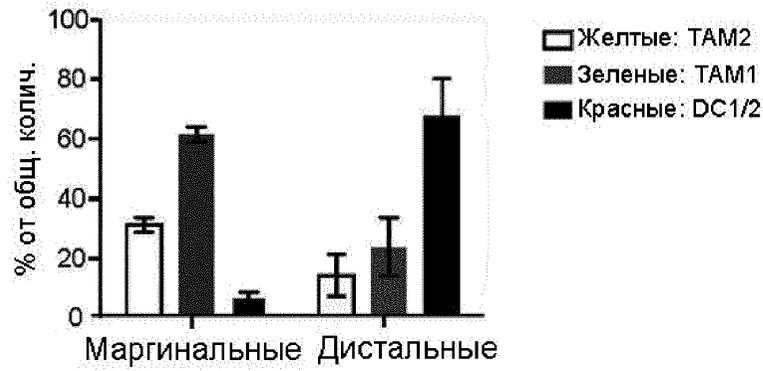
ФИГ. 6Е



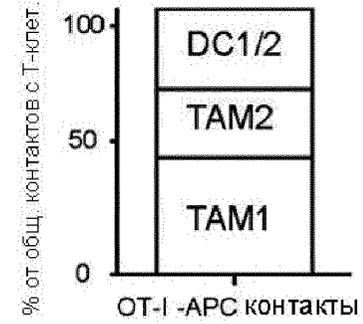
ФИГ. 6G



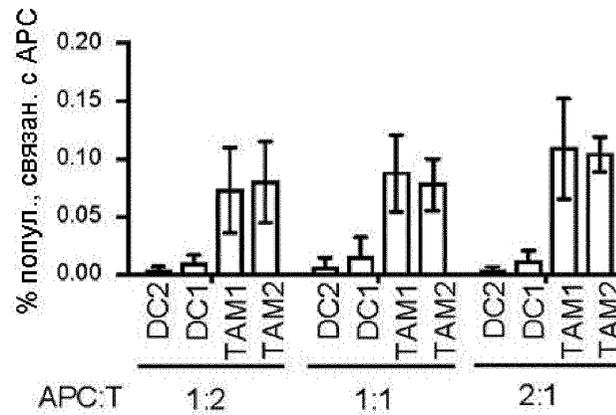
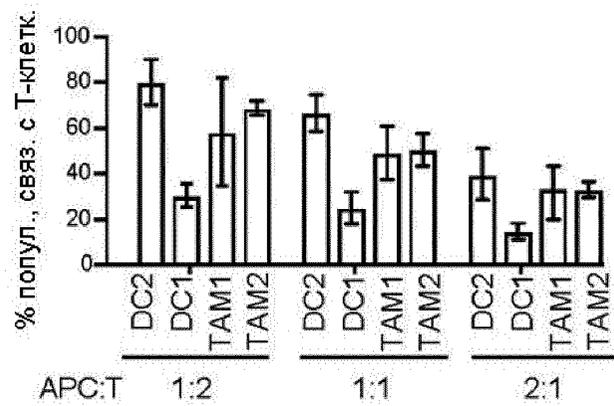
ФИГ. 7А



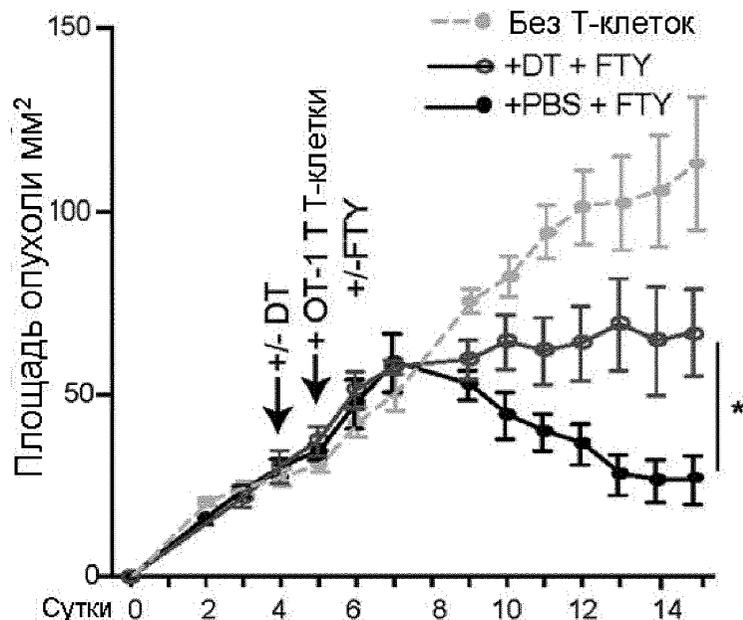
ФИГ. 7В



ФИГ. 7С



ФИГ. 8А

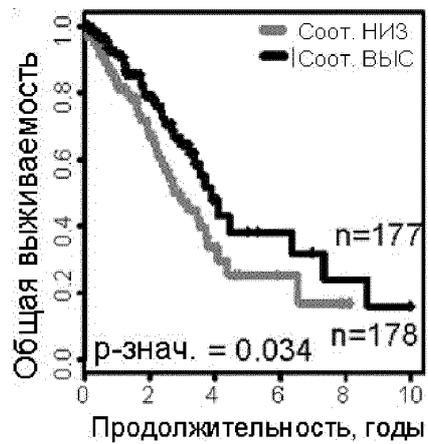
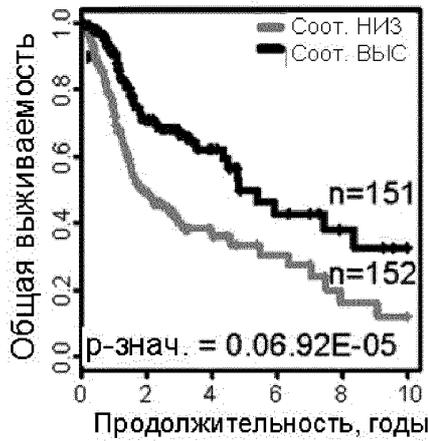
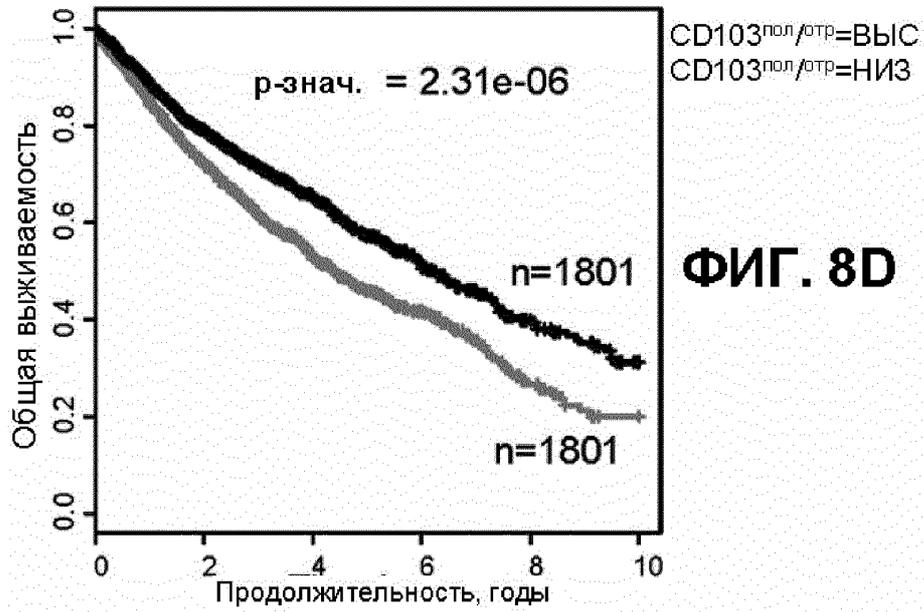


ФИГ. 8С

Сигнатура	Ассоц с ОВ	HR [95% ДИ]	р-знач.	ВН р-зн.
Соотн. CD103 ⁺	Увеличен.	0.79 [0.719-0.87]	2.23E-06	1.34E-05
Т-клетка	Увеличен.	0.848 [0.76-0.93]	0.00096	0.00144
Соотн. CD8/CD68	Увеличен.	0.908 [0.85-0.96]	0.00315	0.00378
Пролиферация	Уменьшен.	1.19 [1.08-1.31]	0.00047	0.00142
CSRI Заживл.	Уменьшен.	1.18 [1.07-1.3]	0.00092	0.00144
IFNG	Уменьшен.	1.12 [1.03-1.21]	0.00479	0.00479

ФИГ. 8В

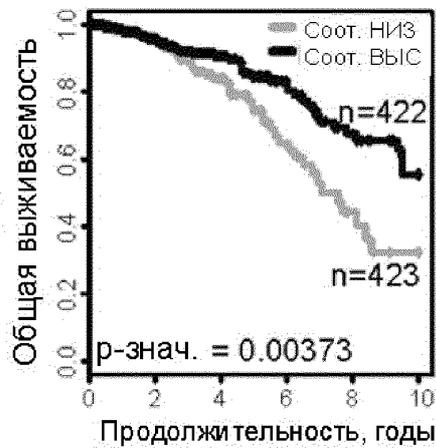
Ген/сигнат.	Тип	HR [95% ДИ]	р-знач.	ВН р-зн.
Соотн. CD103 ⁺	Соотн.	0.792 [0.719-0.872]	2.23E-06	6.47E-05
KIT	CD103 ⁺	0.896 [0.826-0.972]	0.00841	0.0264
CCR7	CD103 ⁺	0.905 [0.84-0.976]	0.00912	0.0264
CD103 ⁺ гены	CD103 ⁺	0.907 [0.838-0.981]	0.0152	0.0399
BATF3	CD103 ⁺	1.1 [1.02-1.2]	0.0165	0.0399
FLT3	CD103 ⁺	0.862 [0.745-0.997]	0.0458	0.0781
ZBTB46	CD103 ⁺	1.07 [0.985-1.16]	0.11	0.168
IRF8	CD103 ⁺	0.952 [0.886-1.02]	0.182	0.254
BTLA	CD103 ⁺	0.957 [0.879-1.04]	0.306	0.403
MYCL1	CD103 ⁺	0.969 [0.892-1.05]	0.459	0.532
CLEC9A	CD103 ⁺	0.976 [0.895-1.06]	0.583	0.604
CSAR1	CD103	1.12 [1.06-1.19]	0.00014	0.00203
LYVE1	CD103	1.15 [1.06-1.24]	0.00062	0.00502
ABCC3	CD103	1.17 [1.07-1.29]	0.000693	0.00502
MRC1	CD103	1.14 [1.05-1.23]	0.00162	0.0094
SIGLEC1	CD103	1.11 [1.04-1.19]	0.00202	0.00976
CD103 ⁻ гены	CD103	1.12 [1.03-1.21]	0.00541	0.02
STAB1	CD103	1.09 [1.03-1.16]	0.00551	0.02
C1QB	CD103	1.1 [1.01-1.19]	0.0218	0.052
C1QA	CD103	1.1 [1.01-1.19]	0.0233	0.052
TMEM37	CD103	0.889 [0.801-0.987]	0.0278	0.0576
MERTK	CD103	0.93 [0.869-0.996]	0.0392	0.0758
C1QC	CD103	1.07 [0.986-1.16]	0.106	0.168
TMEM119	CD103	1.05 [0.976-1.13]	0.184	0.254
MS4A7	CD103	1.04 [0.961-1.13]	0.322	0.406
APOE	CD103	1.04 [0.943-1.14]	0.438	0.529
CYP4F18	CD103	1.03 [0.951-1.11]	0.477	0.532
TREM2	CD103	1.02 [0.943-1.11]	0.583	0.604
TLR7	CD103	1.01 [0.937-1.08]	0.868	0.868



ФИГ. 8E

ФИГ. 8F

ФИГ. 8G



ФИГ. 9А

Тип клеток

SDC: Стимул. дендритные клетки (CD103+/BDCA3+)

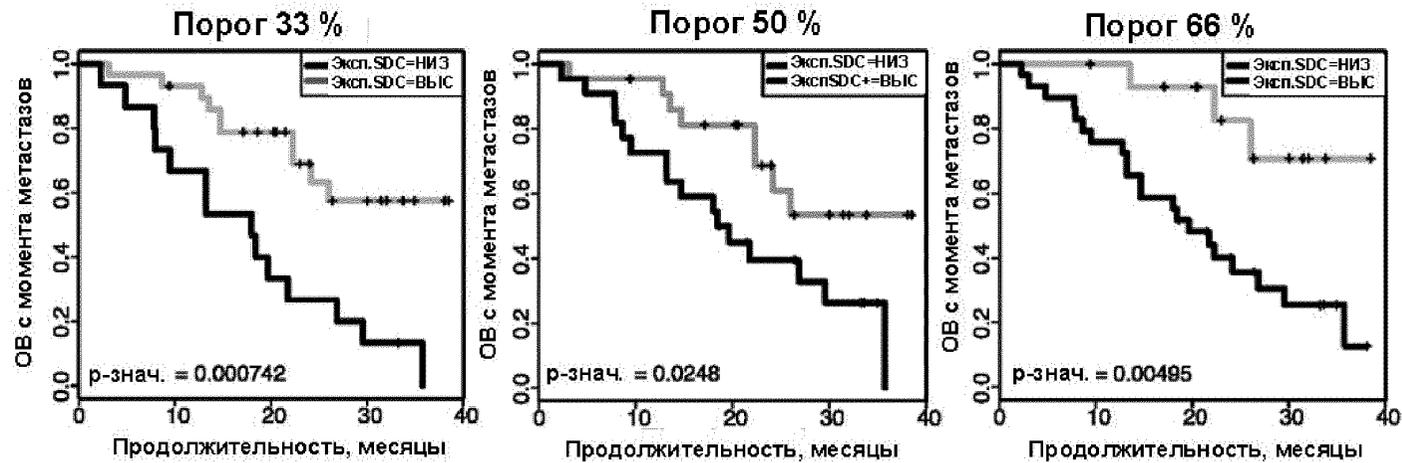
NSM: Нестимулирующие миелоидные клетки

Сигнатуры генов

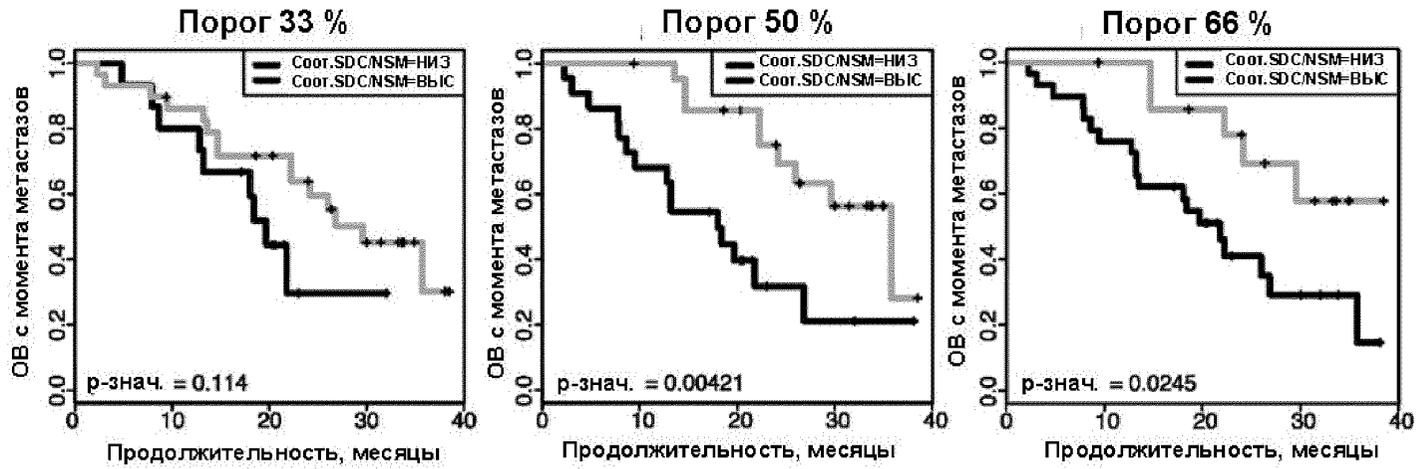
Kit, Ccr7, Batf3, Flt3, Zbtb46, Irf8, Btla, Mycl1, Clec9a

C5ar1, Lyve1, Abcc3, Mrc1, Sigelec1, Stab1, C1Qb, C1Qa, Tmem37, MS4A7, ApoE, Cyp4F18, Trem2, Tlr7

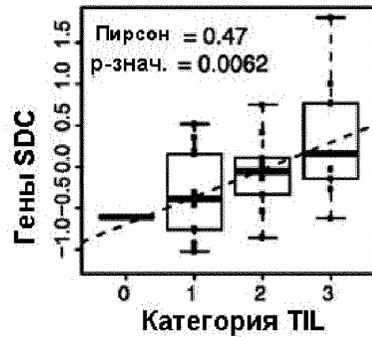
ФИГ. 9В



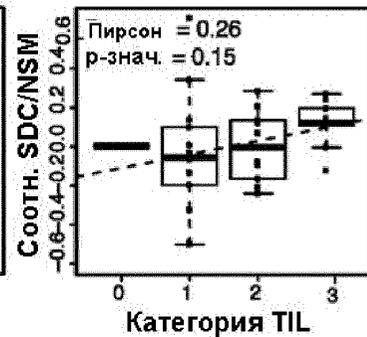
ФИГ. 9С



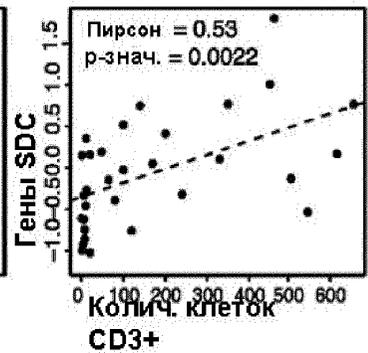
ФИГ. 9D



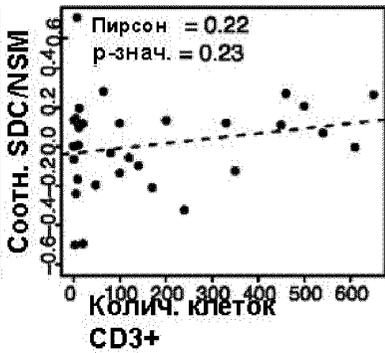
ФИГ. 9E



ФИГ. 9F

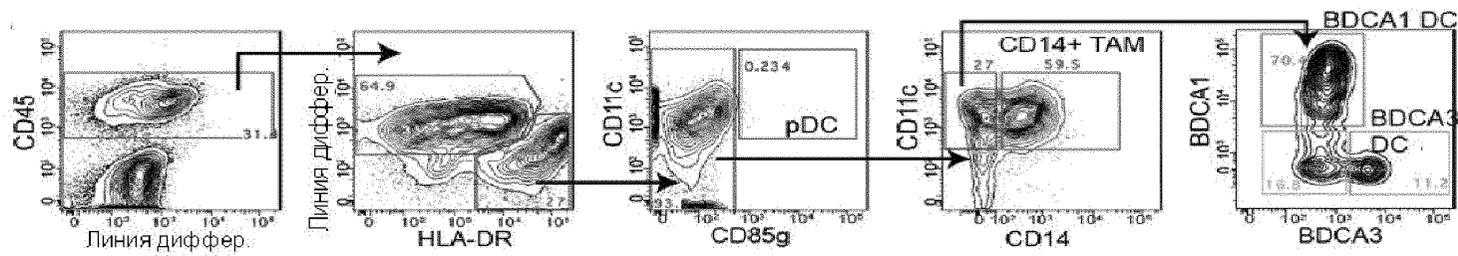


ФИГ. 9G

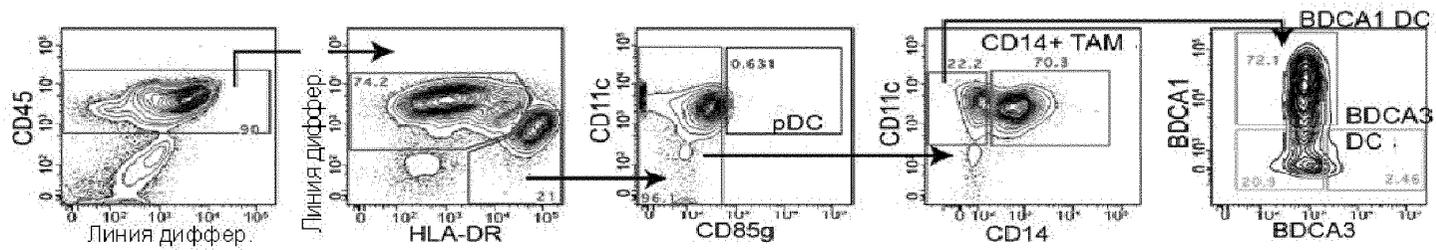


Образец	Ответ	Наилучший объект. ответ (RECIST)	Исходное место	Стадия по AJCC	Перед ипиллиму-мабом	Перед нацелен. терапией	Перед облучением	Перед химио-терапией	Исходн. уровень ЛДГ
1	CR	-100	Кожное	IV M1C	Н	Д	Д	Н	Нормал.
2	CR	-100	Кожное	III C	Д	Н	Н	Н	Нормал.
3	CR	-100	Кожное	III C	Д	Н	Н	Н	Нормал.
4	CR	-100	Кожное	IV M1C	Д	Н	Н	Н	Повыш.
5	PR	-94	Кожное	III C	Н	Д	Н	Н	Нормал.
6	PR	-76	Кожное	IV M1C	Д	Н	Д	Н	Нормал.
7	PR	-73	Кожное	IV M1C	Д	Д	Н	Н	Нормал.
8	PR	-61	Кожное	IV M1C	Д	Н	Н	Д	Нормал.
9	PR	-42	Кожное	IVM1A	Н	Н	Н	Д	Повыш.
10	SD	-13	Кожное	IV M1C	Д	Н	Н	Н	Нормал.
11	SD	-10	Неизвестно	IV M1C	Н	Д	Д	Д	Нормал.
12	SD	0	Кожное	IV M1C	Н	Д	Д	Д	Нормал.
13	SD	5	Акральное	IV M1C	Д	Н	Н	Д	Нормал.
14	SD	5	Кожное	III C	Н	Н	Н	Н	Нормал.
15	SD	15	Кожное	IV M1C	Д	Д	Н	Д	Повыш.
16	SD	27	Кожное	IV M1C	Д	Н	Н	Н	Нормал.
17	PD	33	Кожное	IV M1C	Д	Н	Н	Н	Нормал.
18	PD	80	Кожное	IV M1C	Д	Д	Д	Д	Нормал.
19	PD	100	Неизвестно	IV M1C	Н	Д	Д	Н	Нормал.
20	PD	290	Увеальное	IV M1C	Д	Д	Д	Н	Повыш.
21	PD	**	Кожное	IVM1B	Д	Н	Н	Н	Повыш.
22	PD	**	Кожное	IVM1A	Д	Н	Н	Д	Нормал.
23	PD	**	Неизвестно	IV M1C	Н	Н	Д	Н	Нормал.

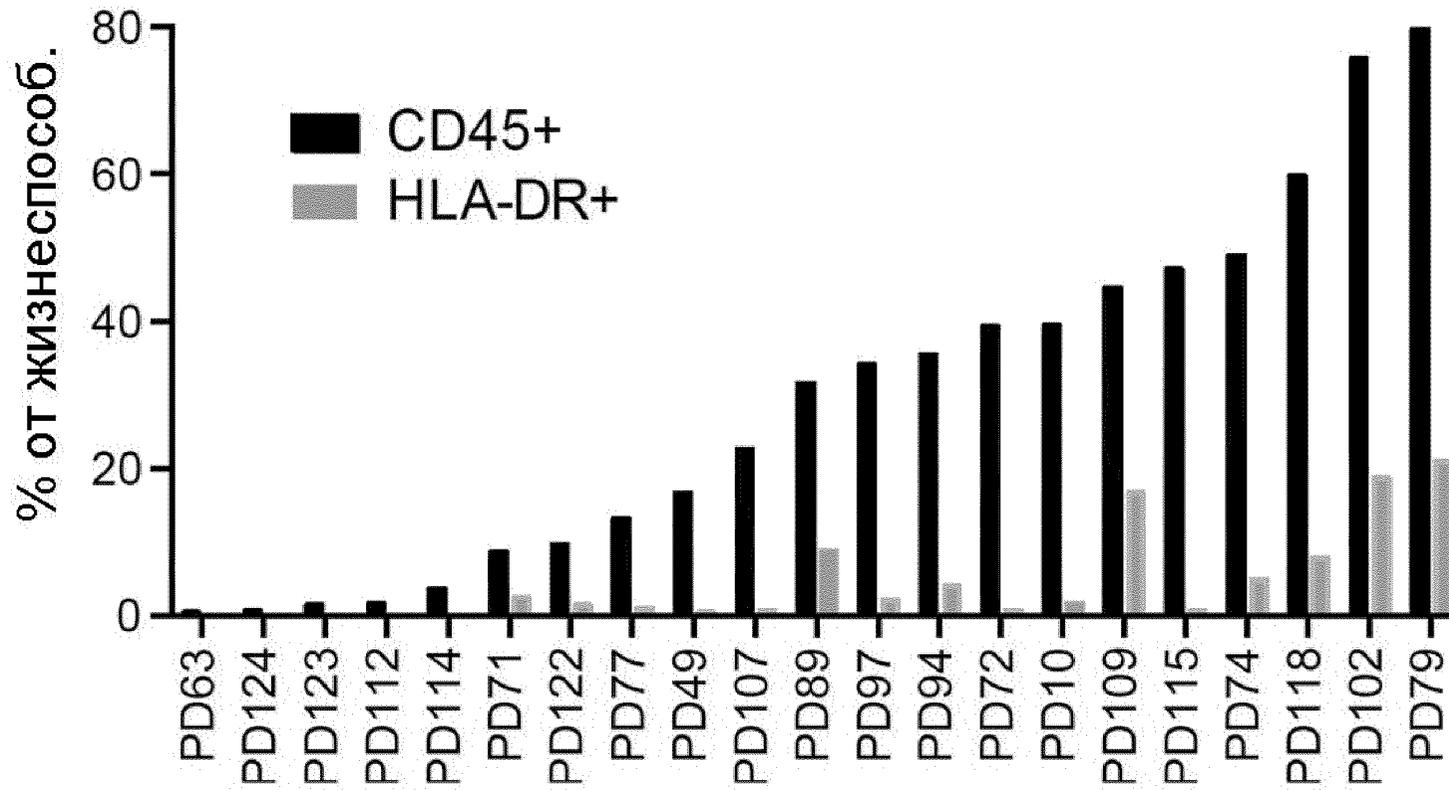
ФИГ. 10А



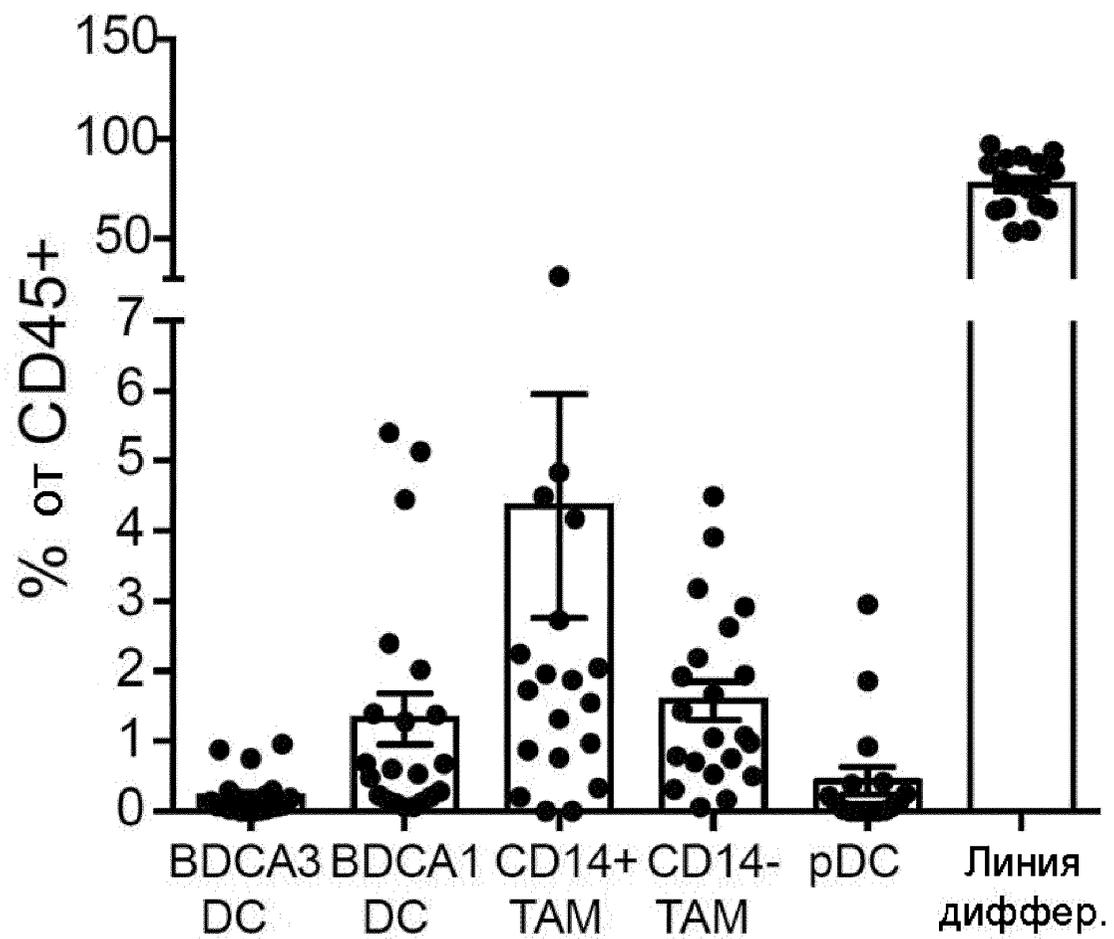
ФИГ. 10В



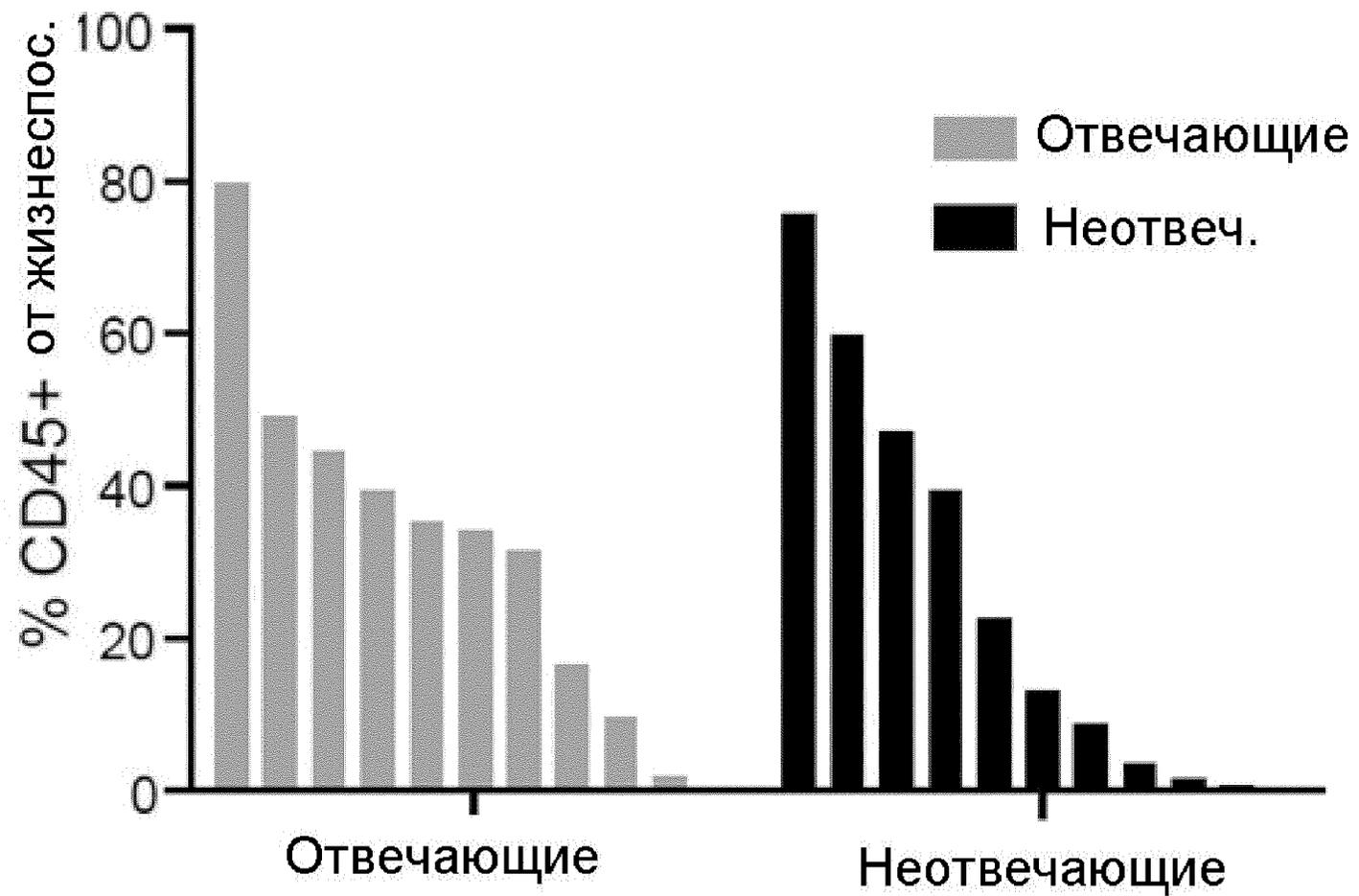
ФИГ. 10С



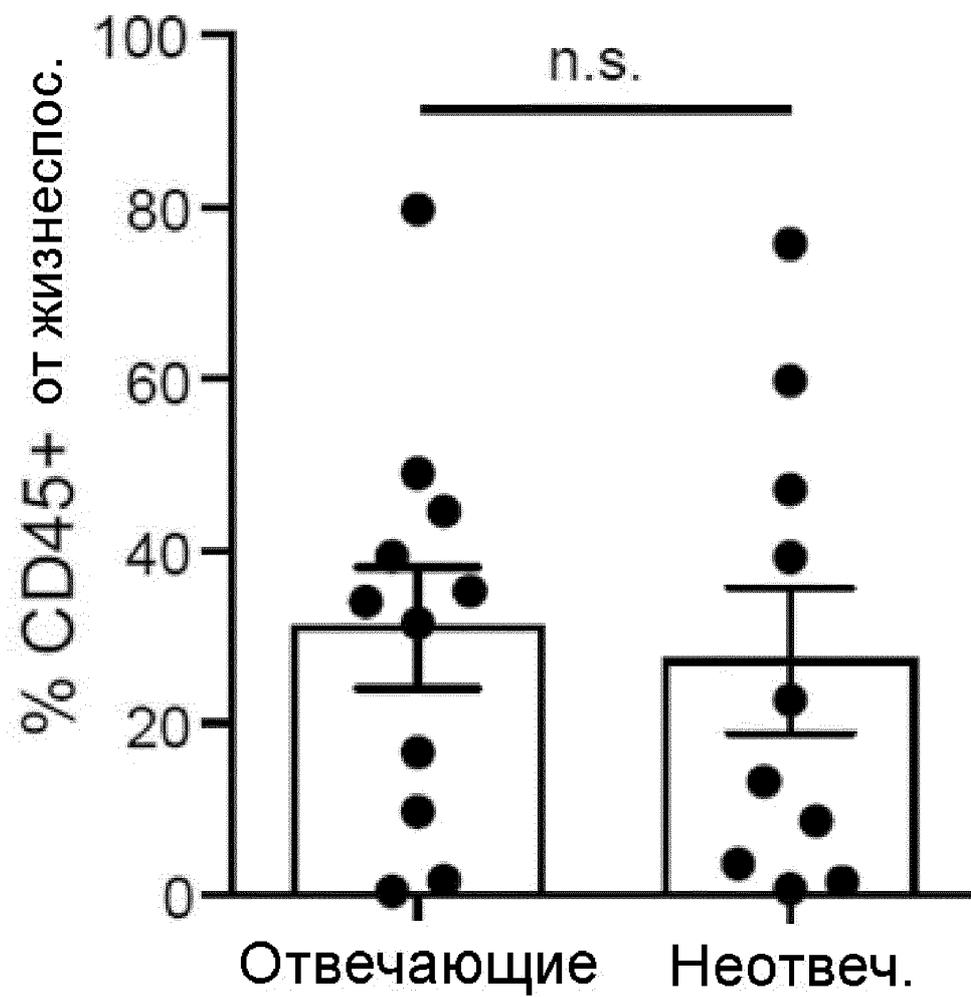
ФИГ. 10D



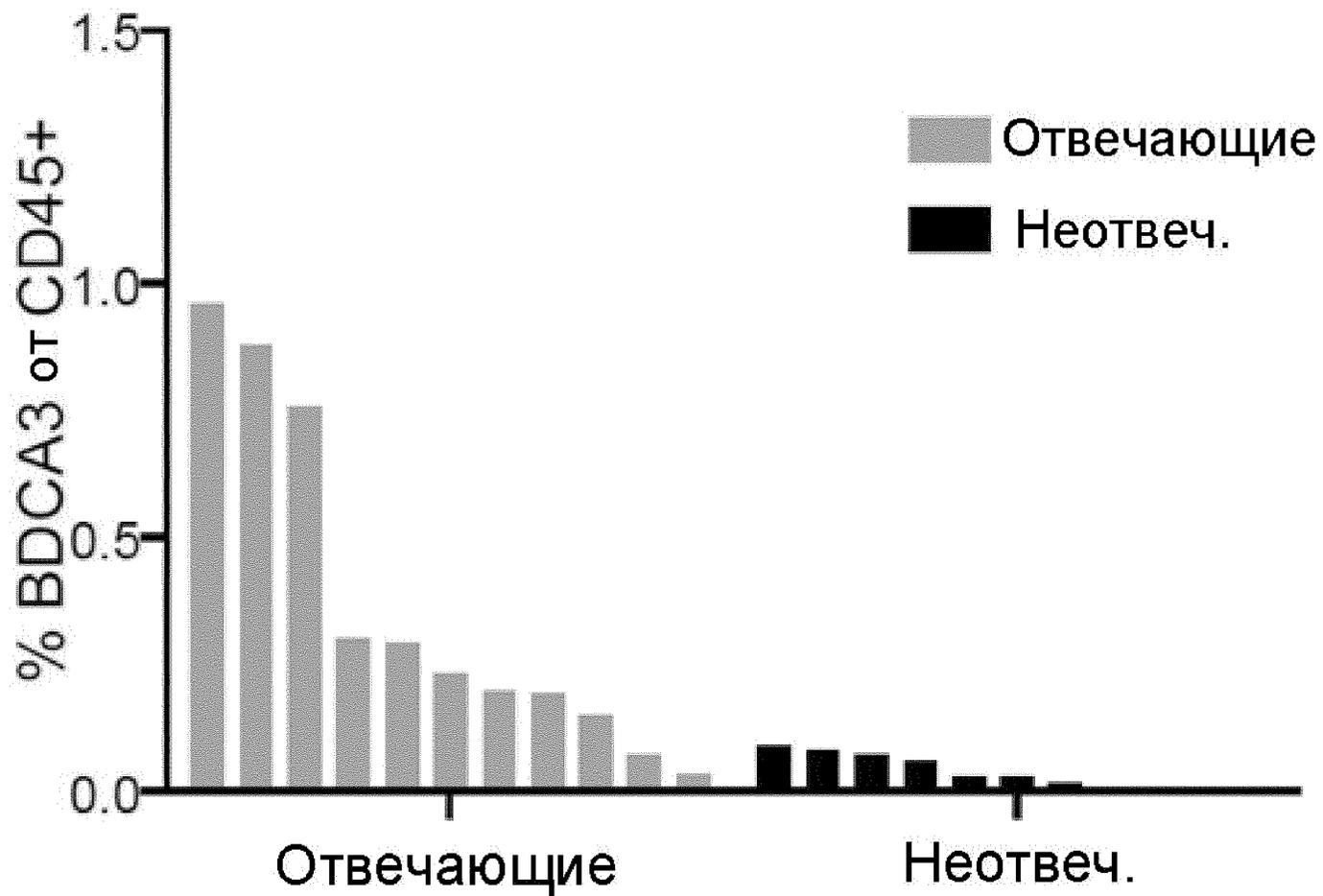
ФИГ. 10Е



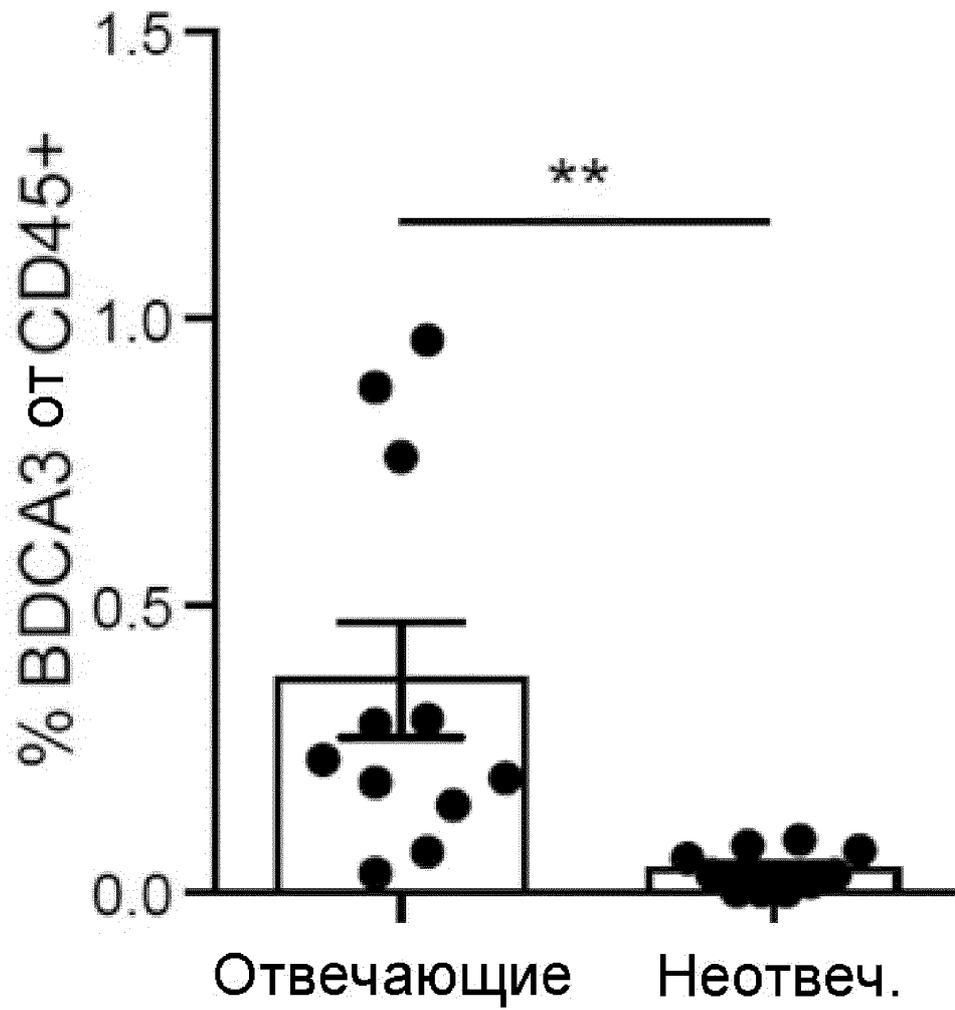
ФИГ. 11А



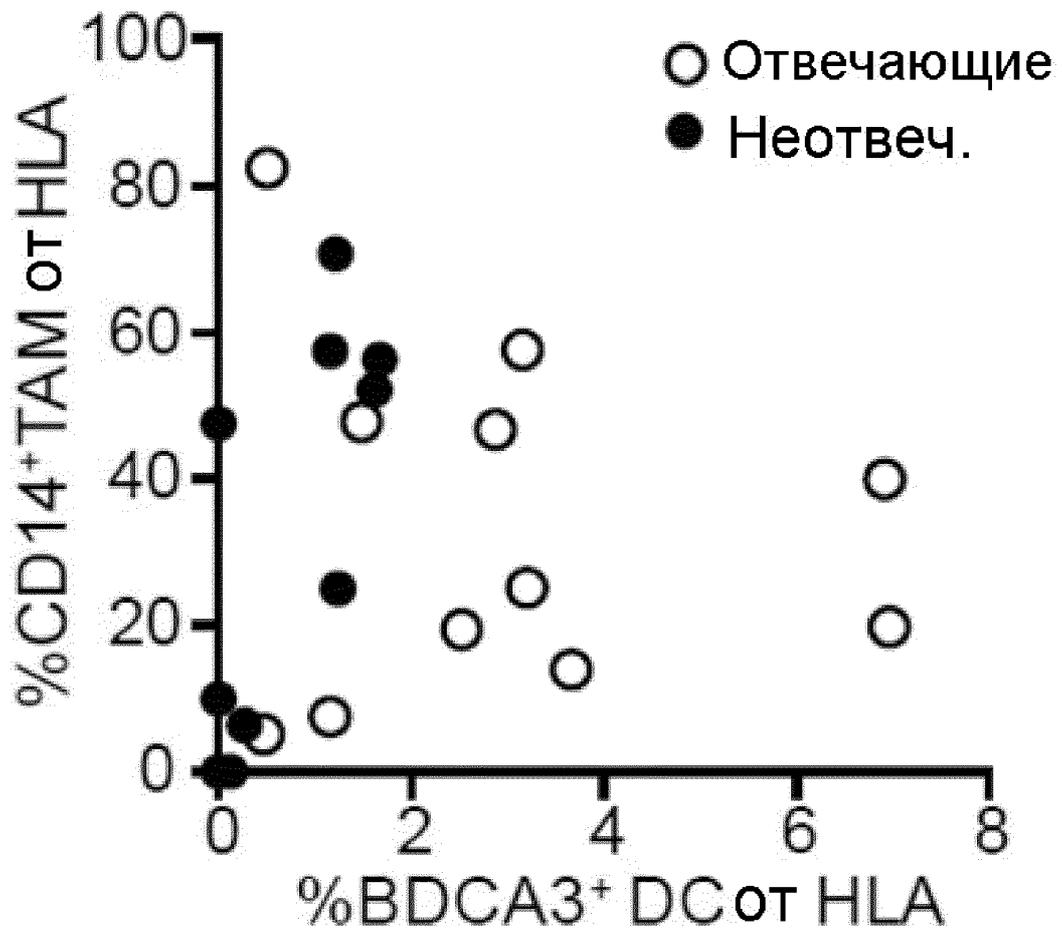
ФИГ. 11В



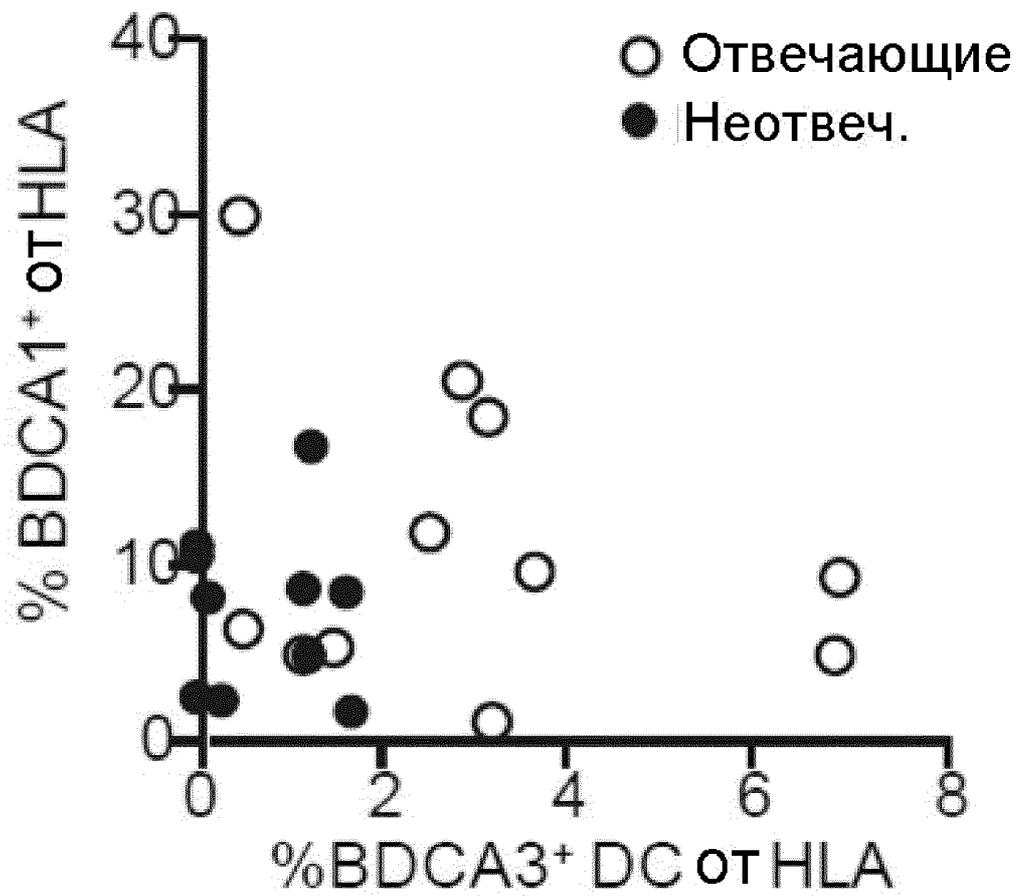
ФИГ. 11С



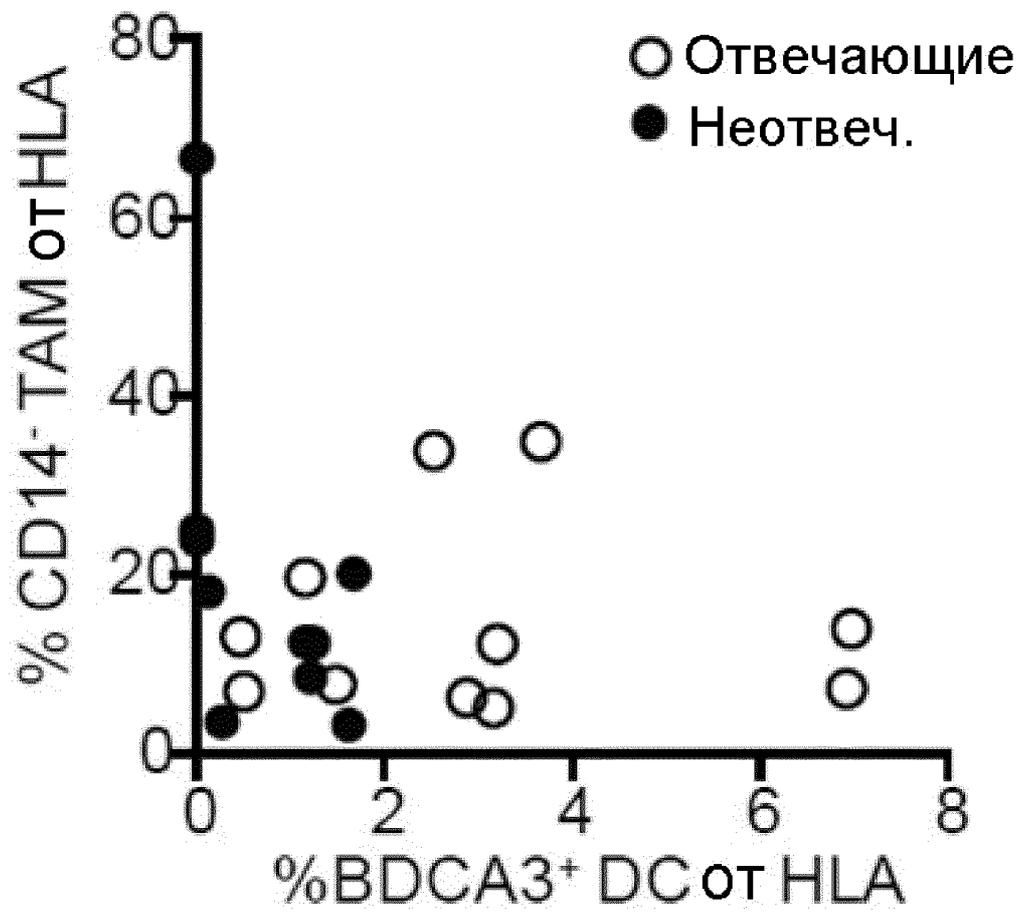
ФИГ. 11D



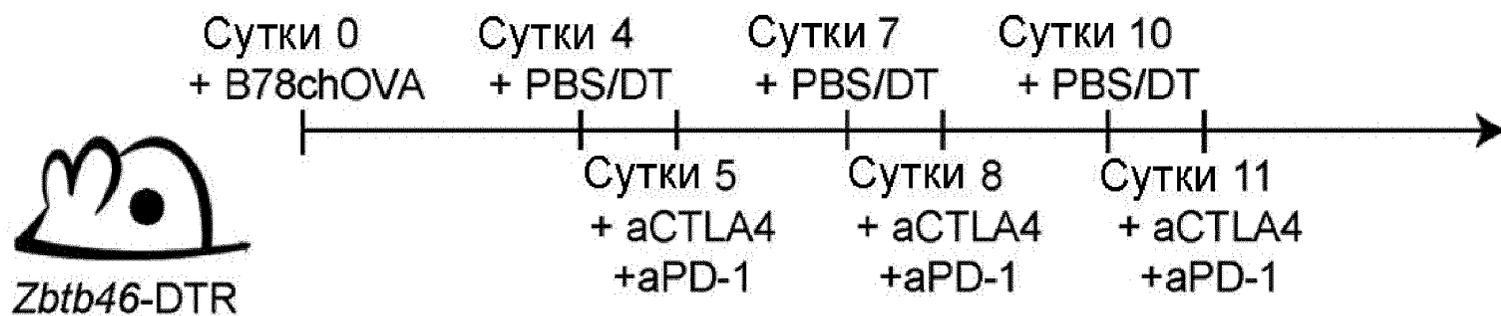
ФИГ. 11Е



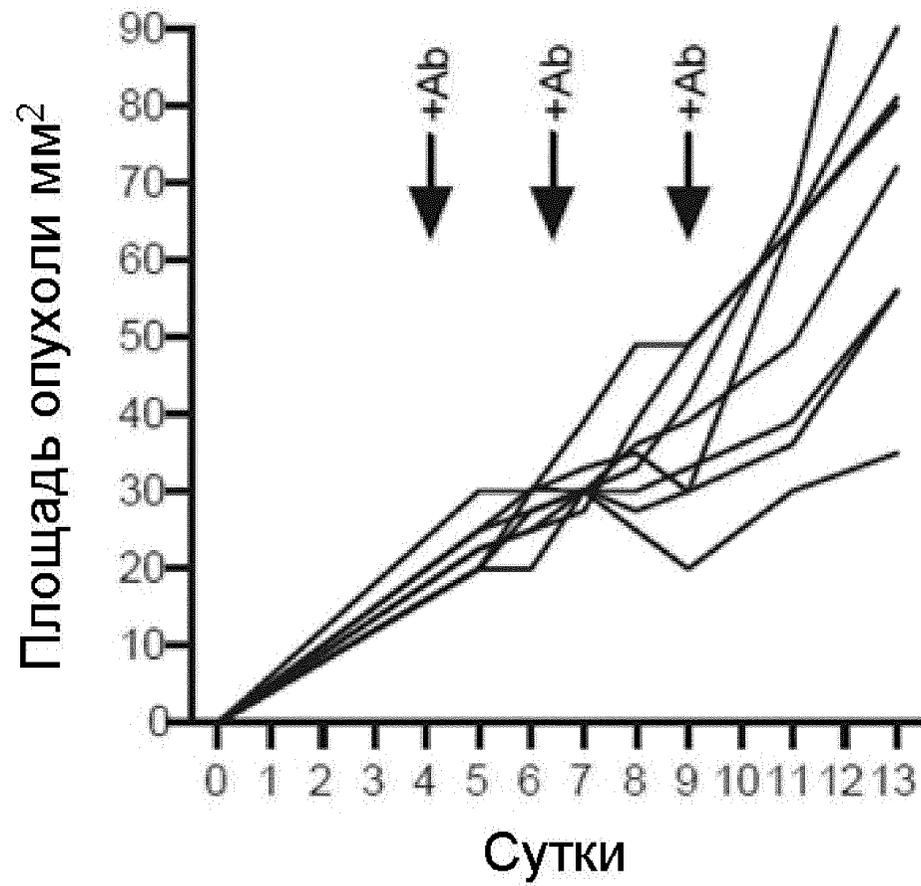
ФИГ. 11F



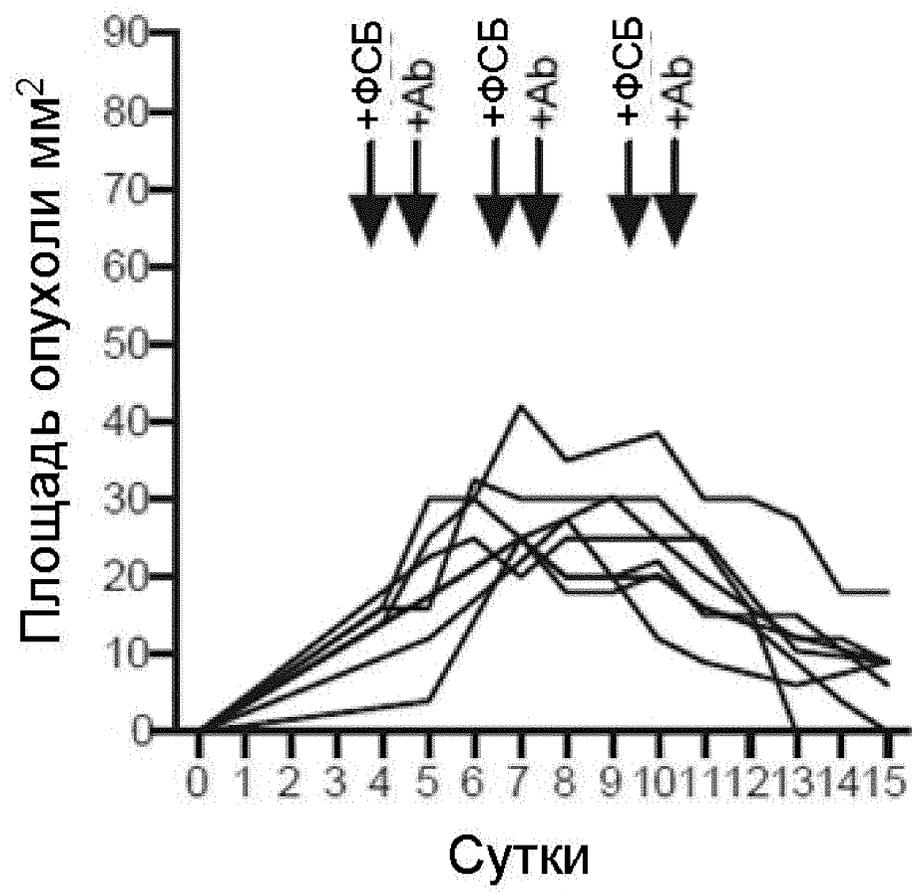
ФИГ. 11G



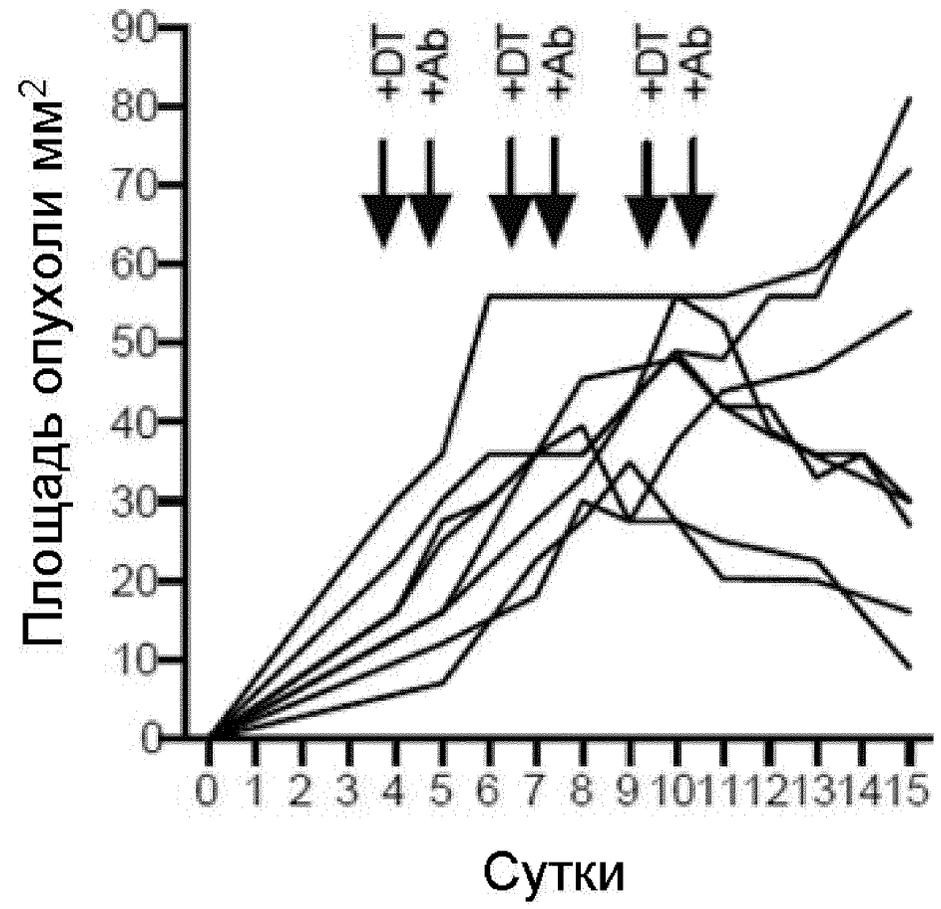
ФИГ. 12А



ФИГ. 12В

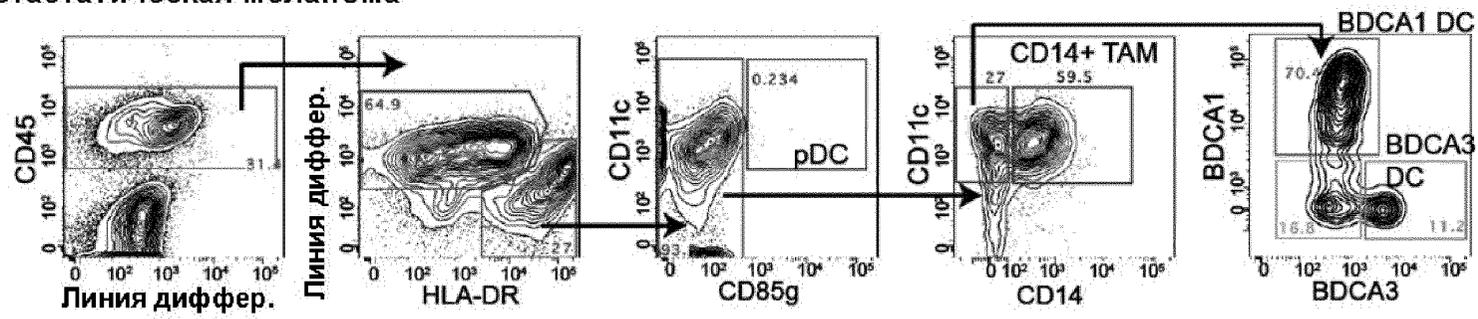


ФИГ. 12С



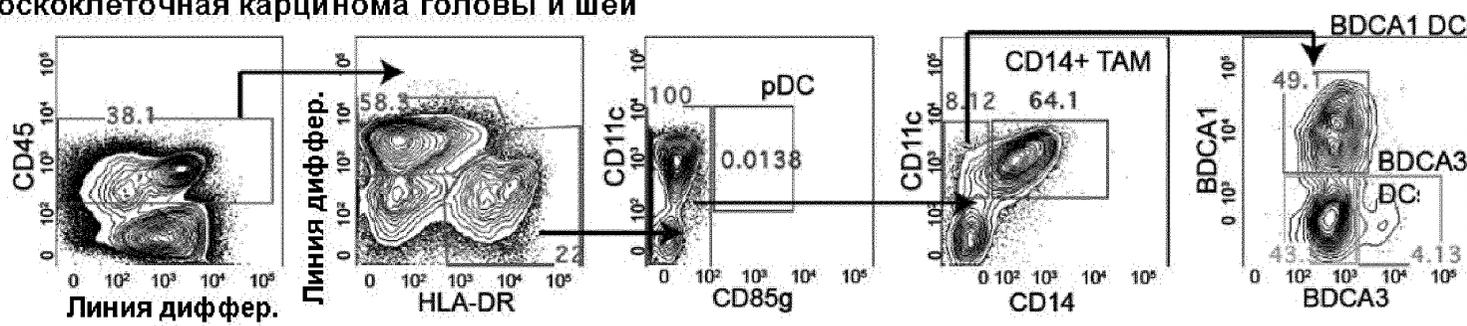
ФИГ. 12D

Метастатическая меланома



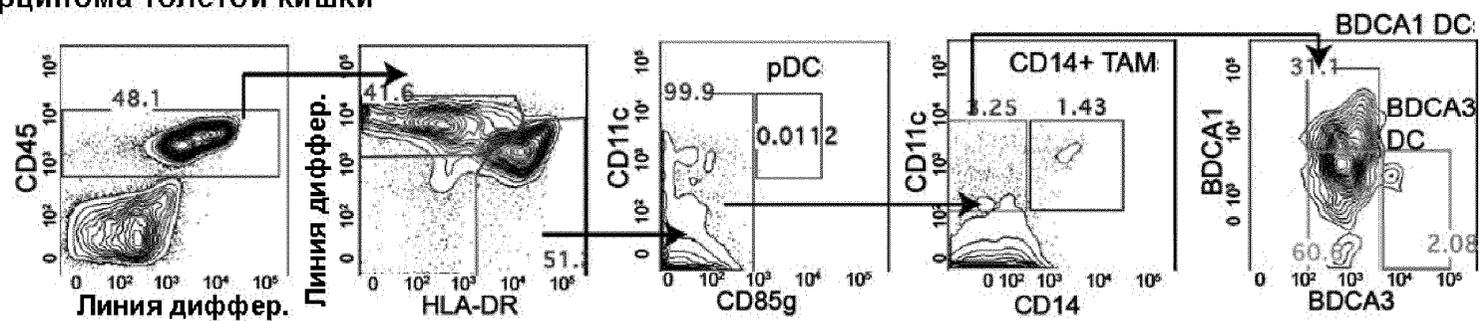
ФИГ. 13

Плоскоклеточная карцинома головы и шеи



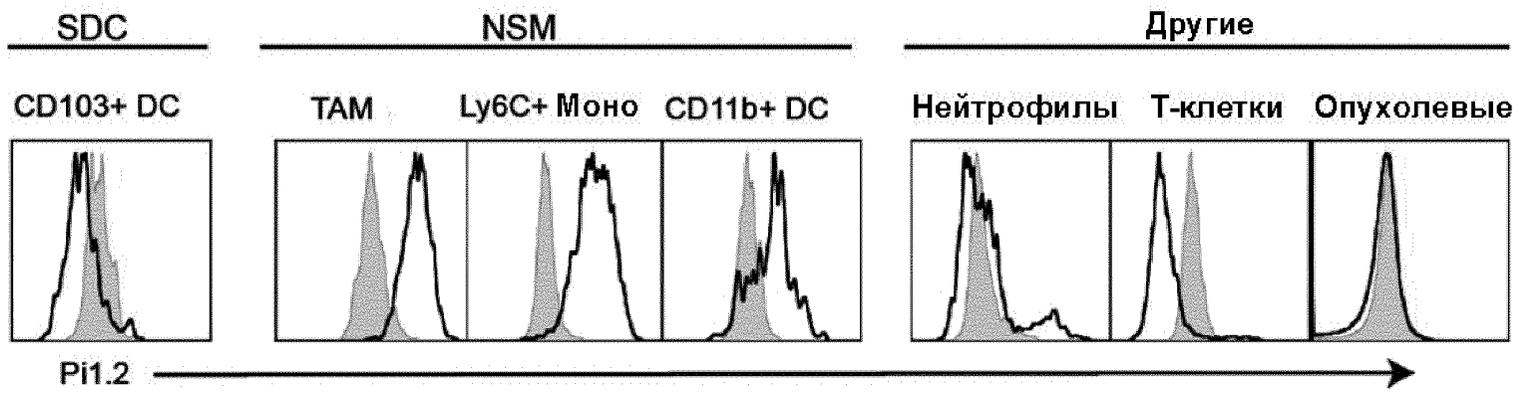
ФИГ. 13 (продолж.)

Карцинома толстой кишки

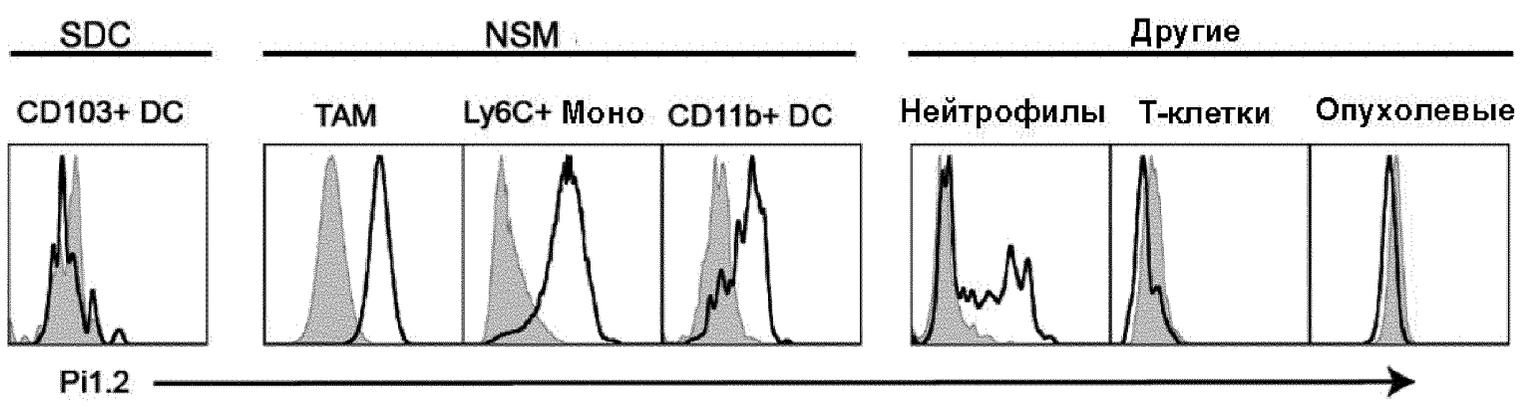


ФИГ. 13 (продолж.)

B16 - меланома **TREM2** Клон 2 20 нМ перекрывает по изотипу

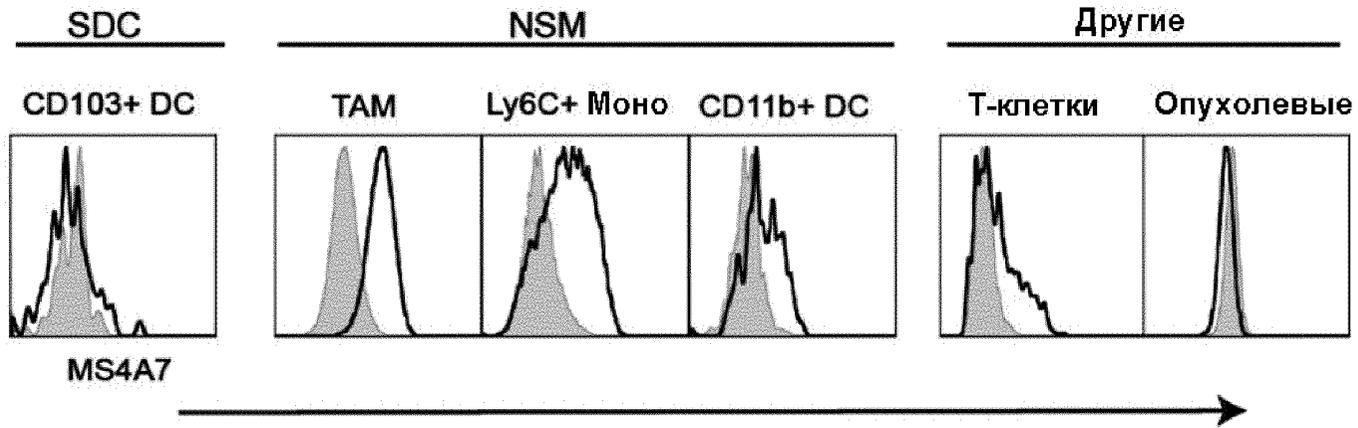


MC38 **TREM2** Клон 2 20 нМ перекрывает по изотипу

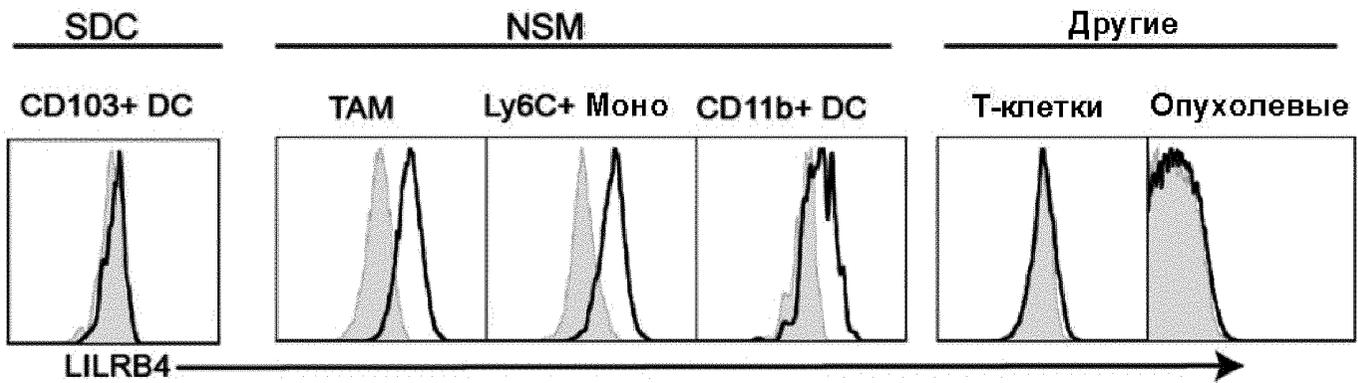


ФИГ. 14

MC38 Коммерч. **MS4A7** Ab, перекрыт. по изотипу

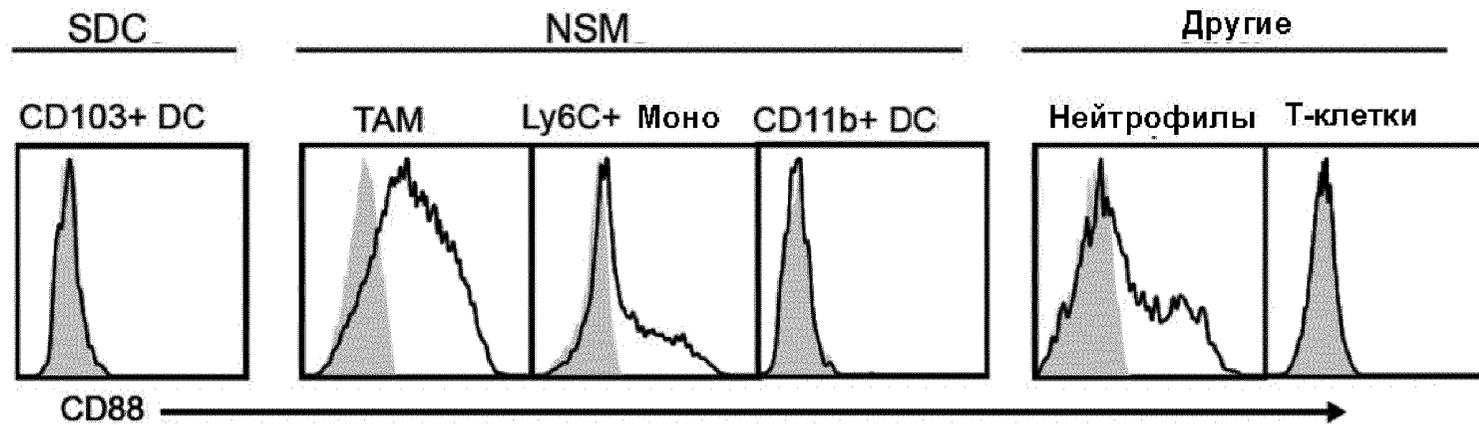


B16 - меланома **LILRB4** - окрашивание, перекрыт. по изотипу

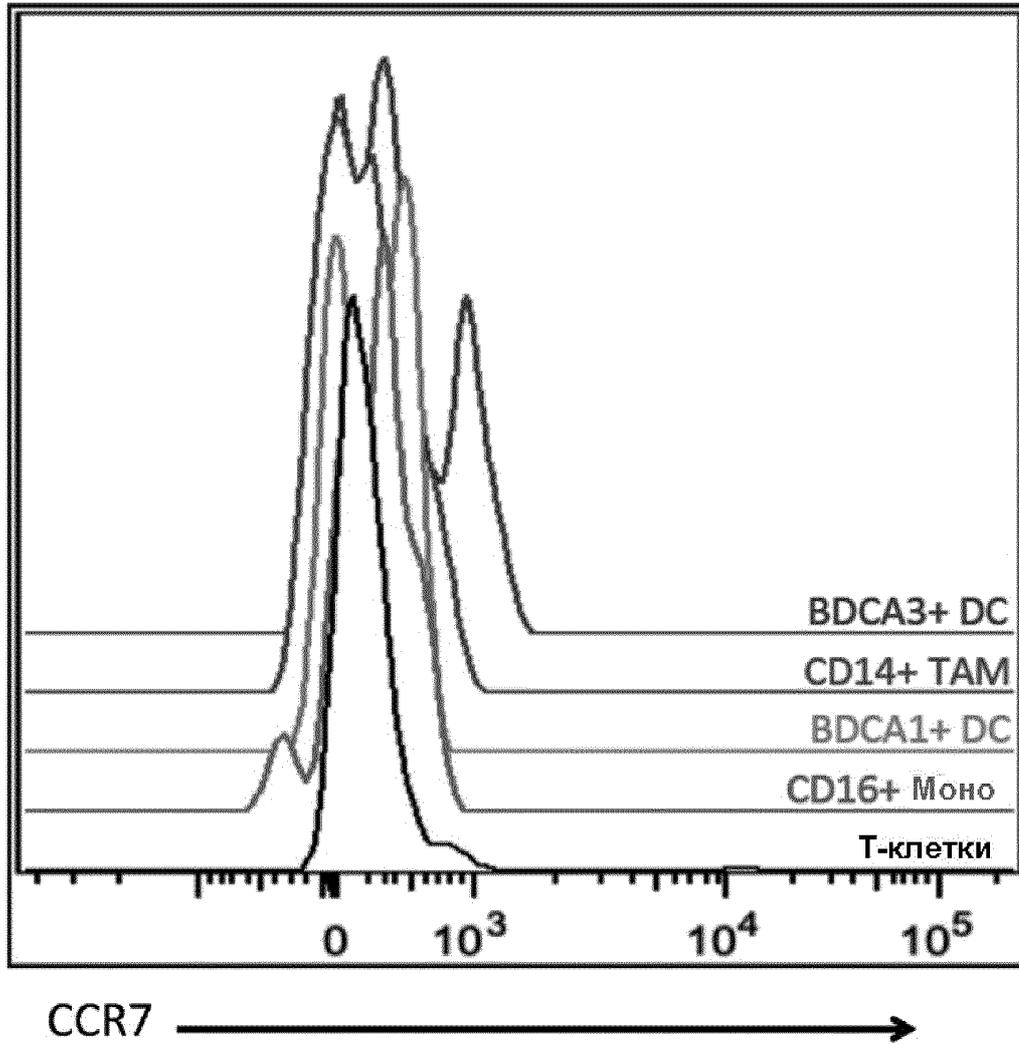


ФИГ. 14 (продолж.)

MC38 C5AR1(CD88) - окрашивание, перекрыт. по изотипу

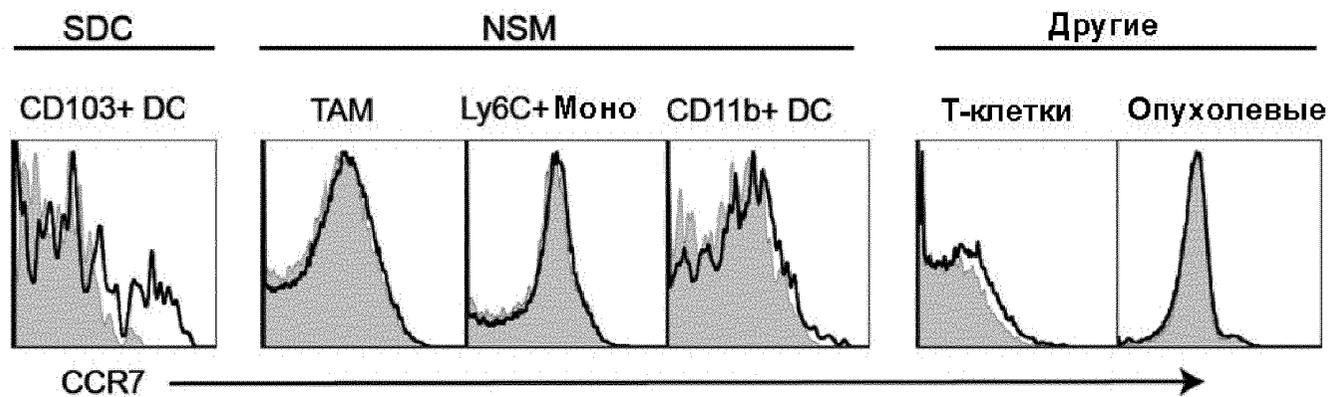


ФИГ. 14 (продолж.)

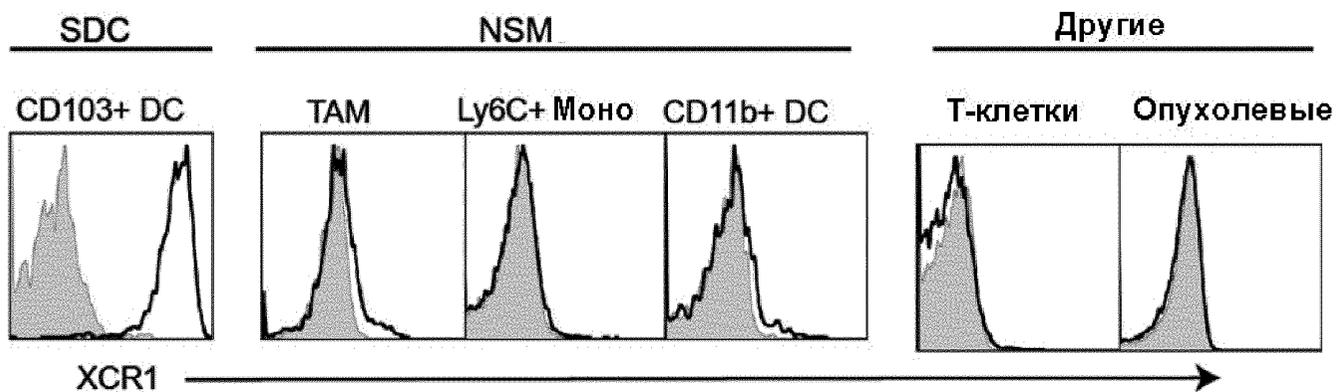


ФИГ. 15

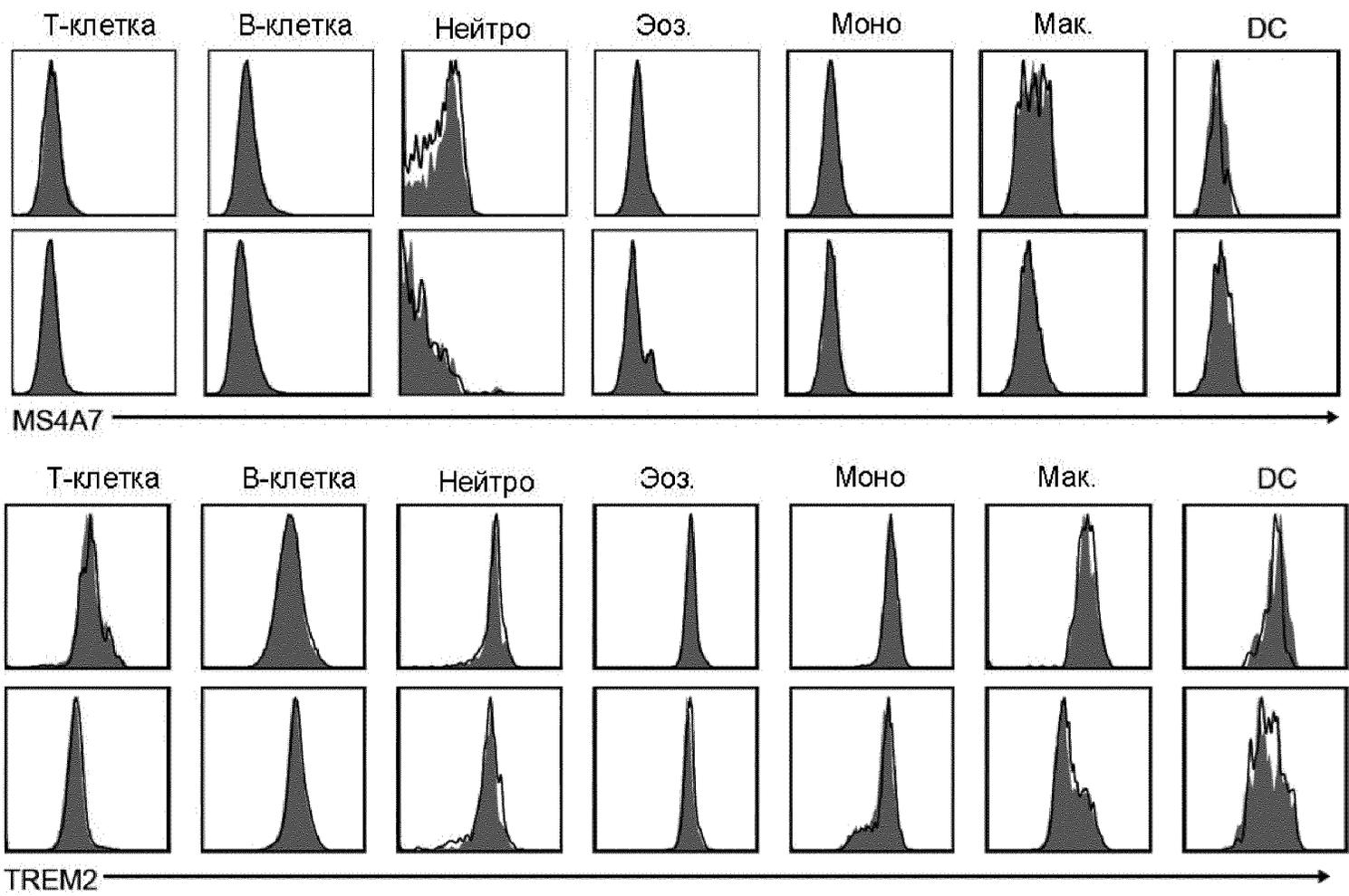
CCR7 - окрашивание, перекрыт. по изотипу



XCR1 - окрашивание, перекрыт. по изотипу

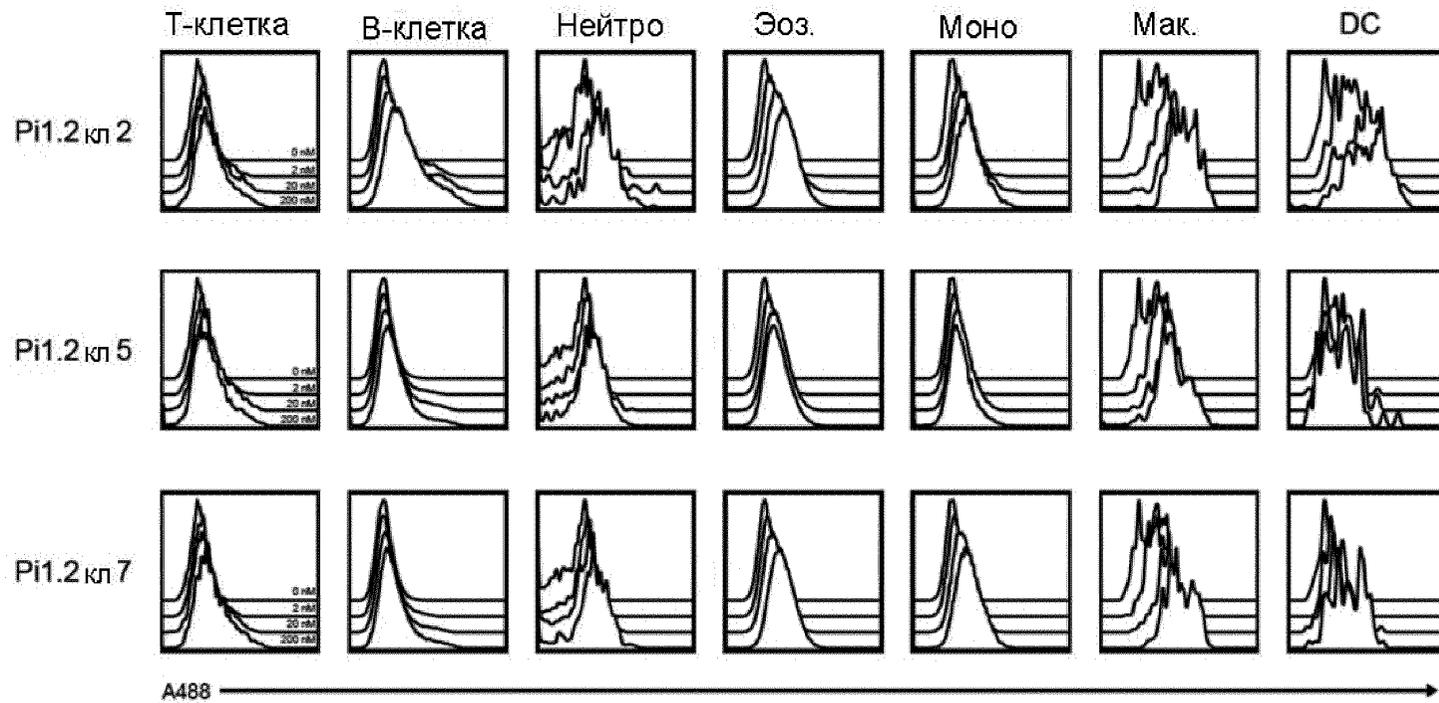


ФИГ. 16



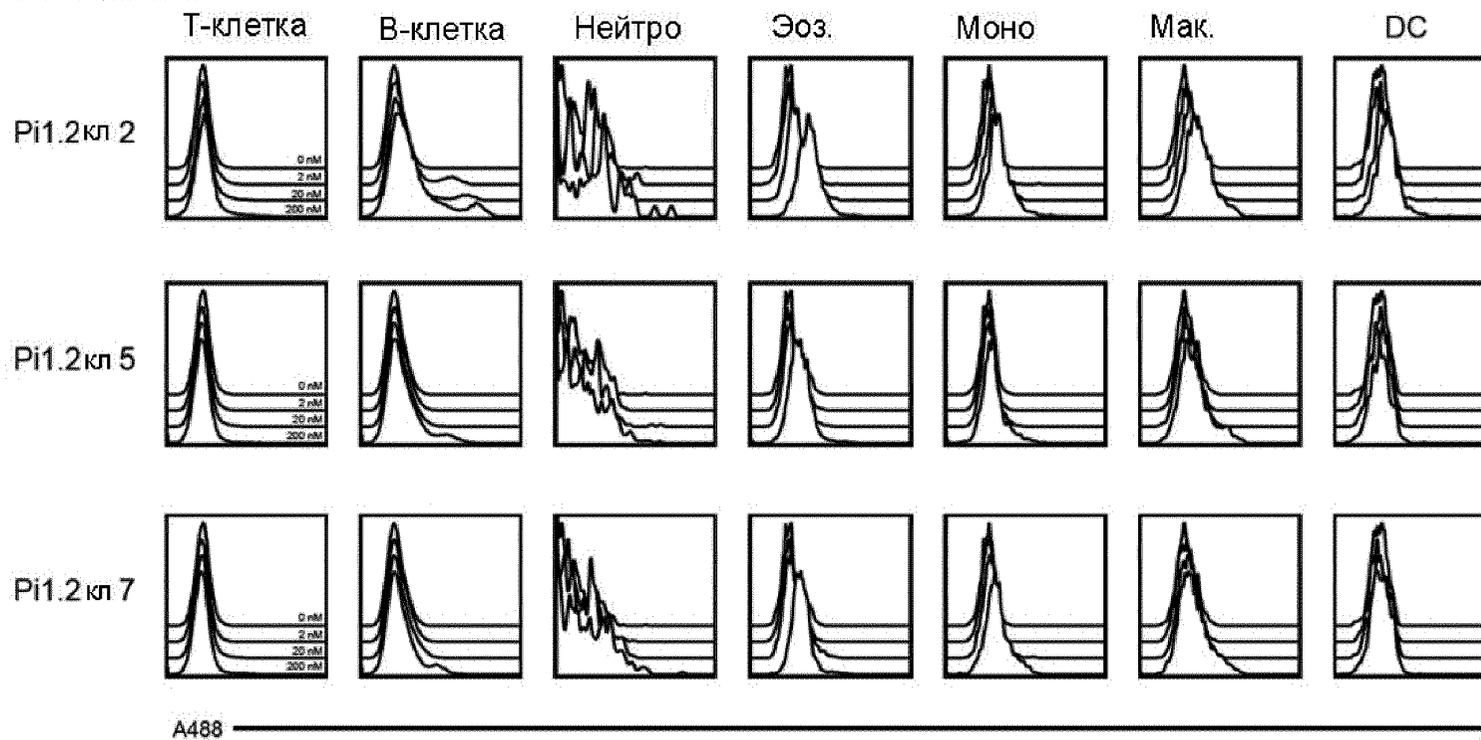
ФИГ. 17

Костный мозг



ФИГ. 17 (продолж.)

Селезенка



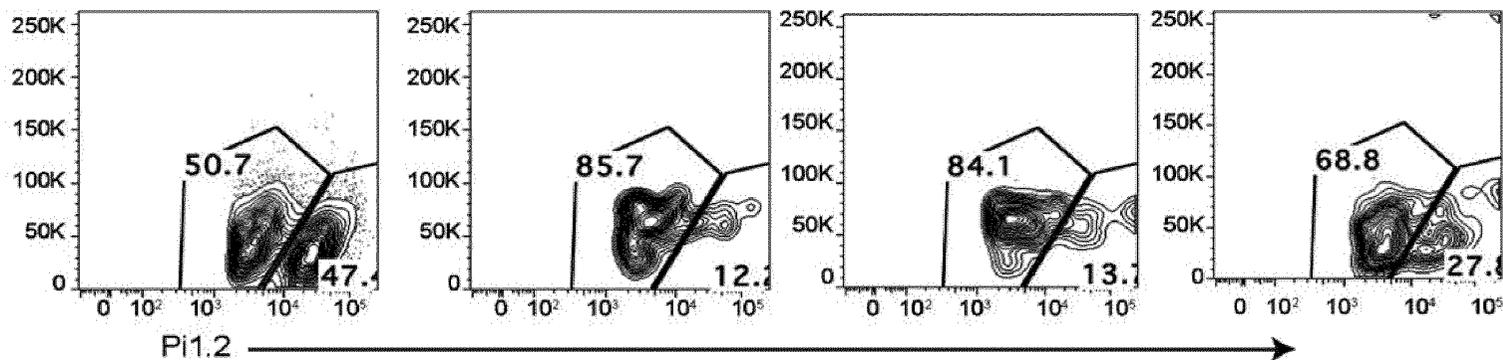
ФИГ. 17 (продолж.)

Человеч.
IgG

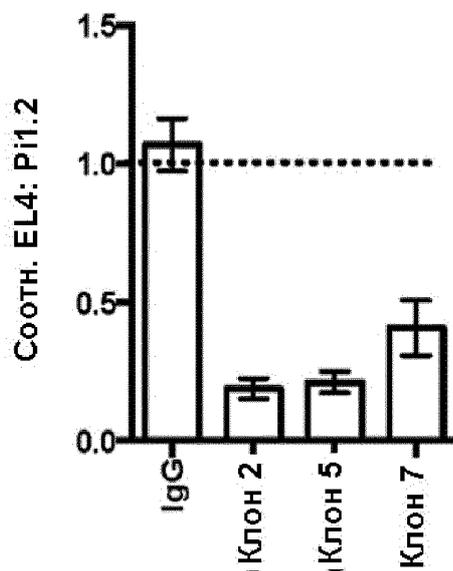
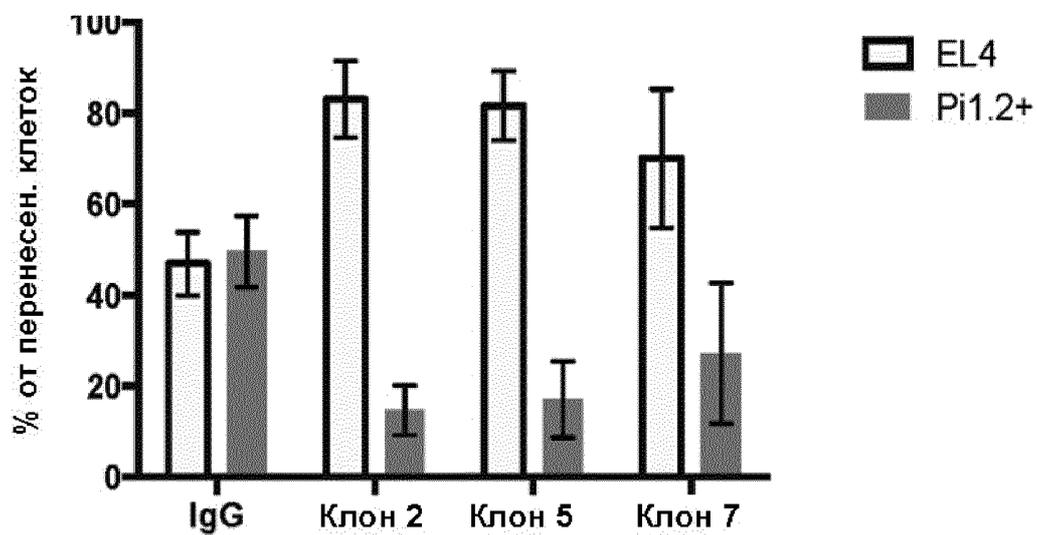
αPi1.2
Клон № 2

αPi1.2
Клон № 5

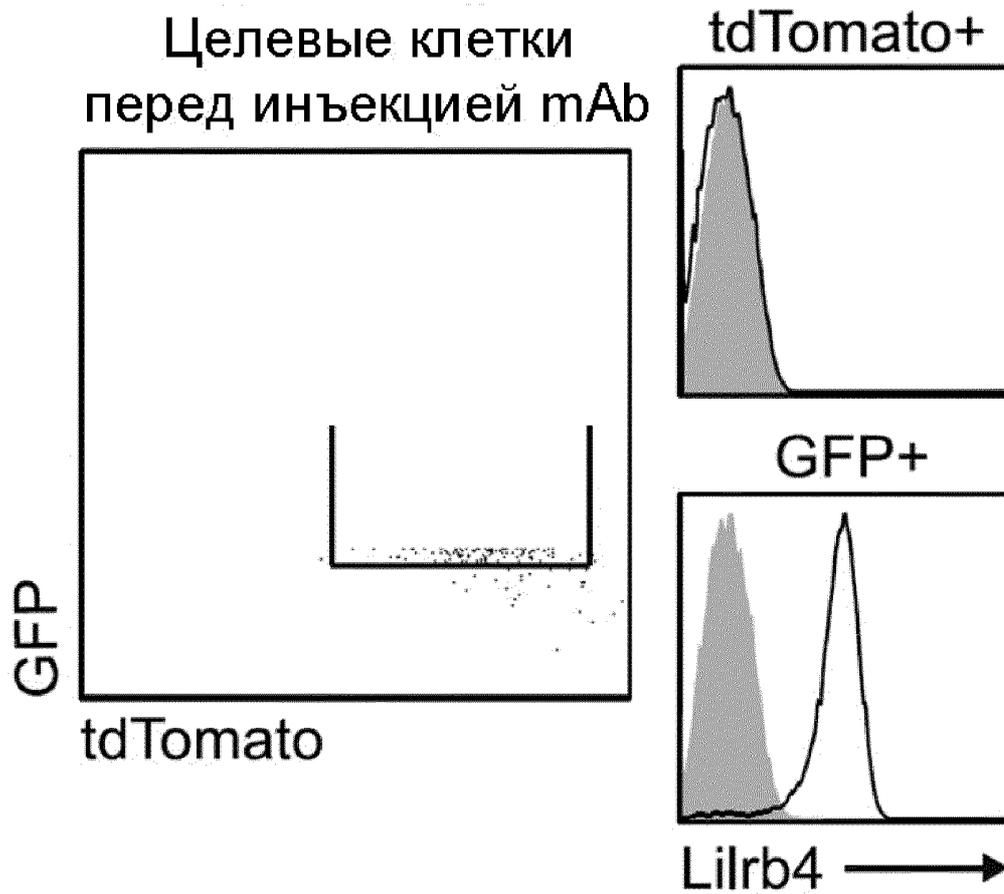
αPi1.2
Клон № 7



ФИГ. 18

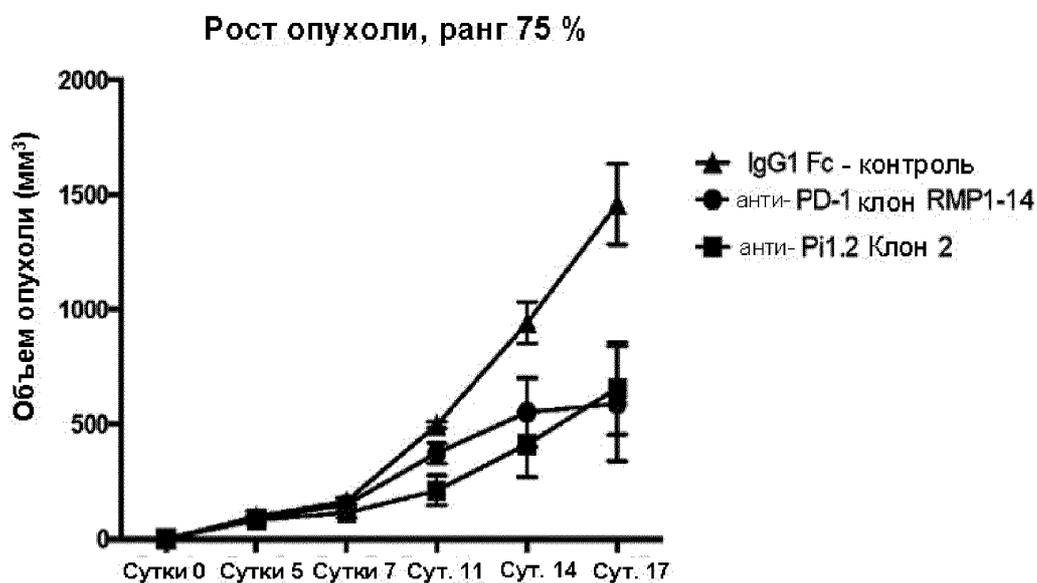


ФИГ. 18 (продолж.)

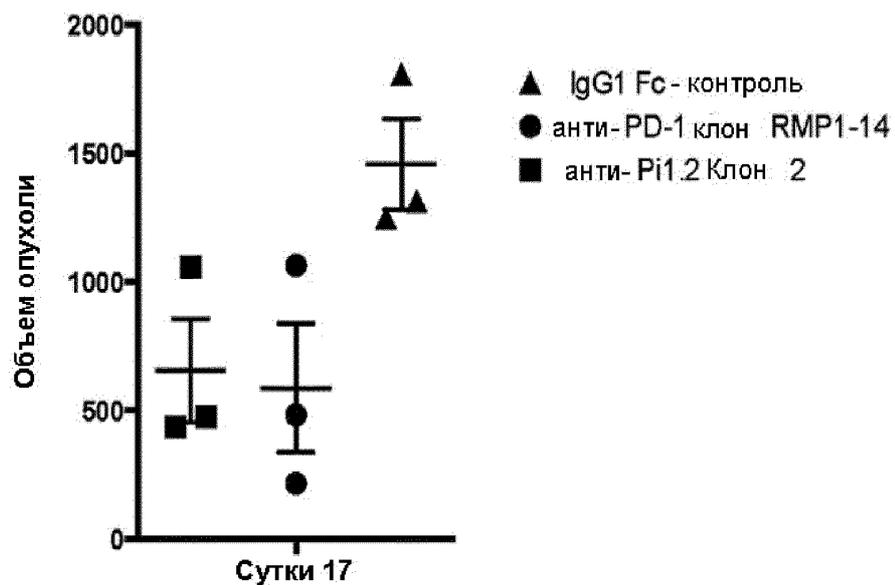


Соотнош. целевых клеток
24 ч после инъекции mAb

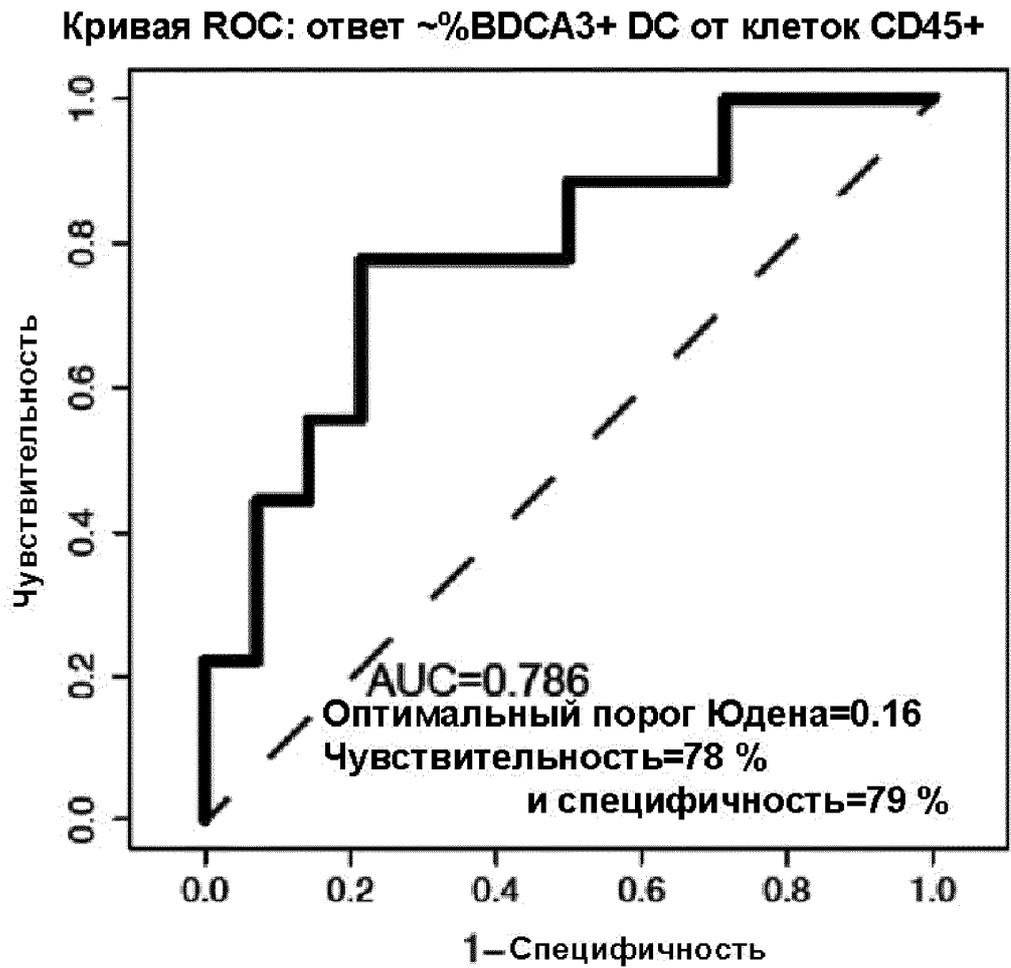
ФИГ. 18 (продолж.)



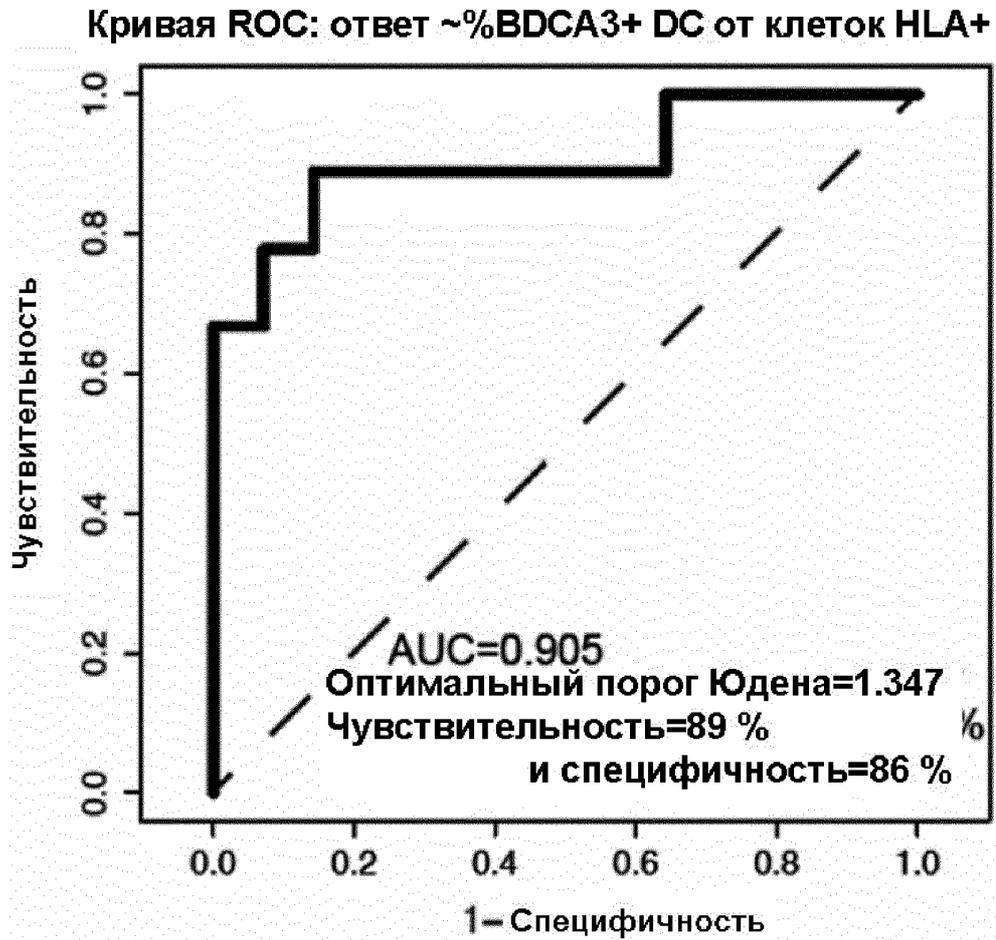
Средний размер опухоли на сутки 17: ранг 75 %



ФИГ. 19

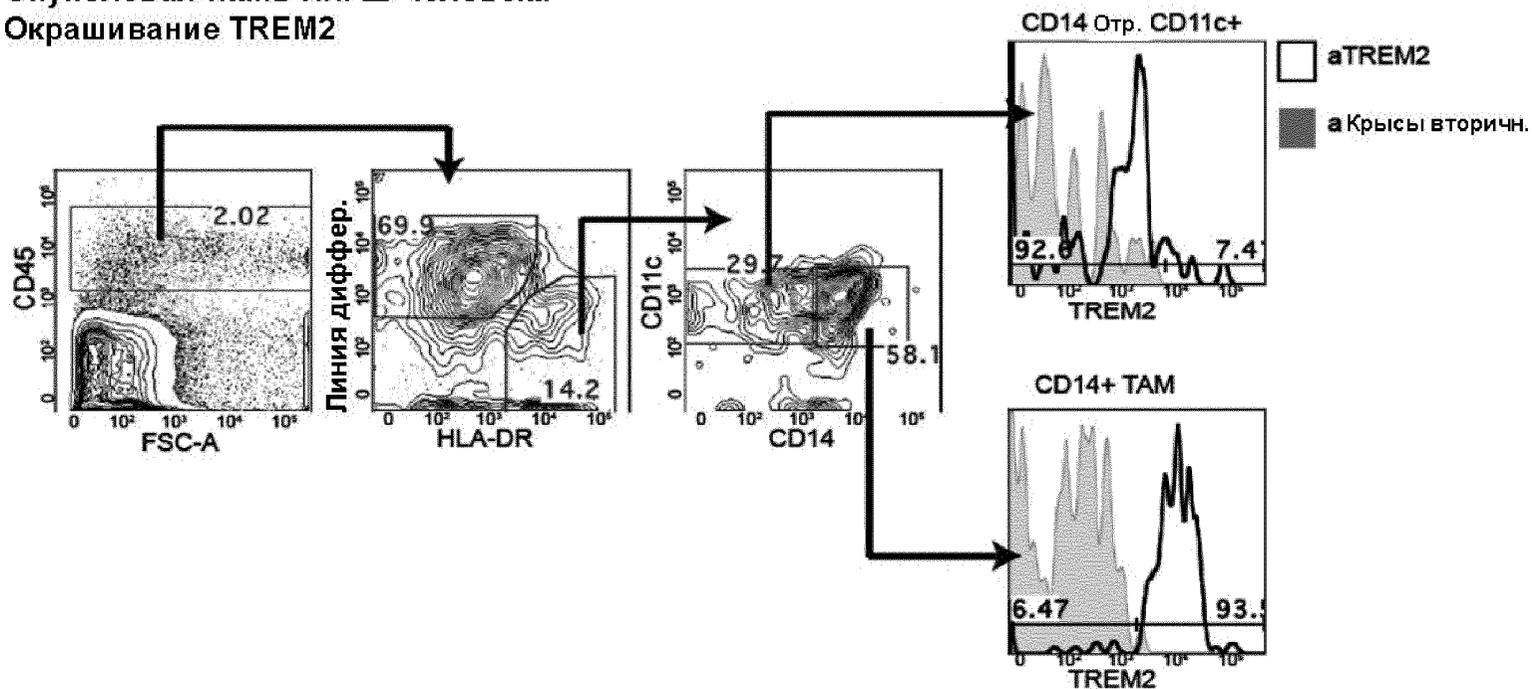


ФИГ. 20А



ФИГ. 20В

Опухолевая ткань ПКГШ Человека
Окрашивание TREM2



ФИГ. 21

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202393348А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

A61K 39/395, A61P 35/00, 37/04, C07K 16/28, 16/30

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, EAPATIS, Google, Reaxys

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	RU 2494107 C2 (ОНО ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. и др.) 27.09.2013, реферат, страница 74, строки 12-71, пункты 1-3, 10 формулы	1-13, 15
A		14, 16-20
Y	US 2013/0150559 A1 (NOVO NORDISK A/S) 13.06.2013, реферат, параграфы [0002], [0029], [0035]-[0037], [0166]-[0167], [0203]-[0204], [0284], [0314]	1-13, 15
Y	SRIVASTAVA N. et al. Update on benefit of immunotherapy and targeted therapy in melanoma: the changing landscape. Cancer Management and Research, 20 June 2014, V. 6, pp. 279-289, реферат; страницы 281, 283, правая колонка, абзац 2, страница 285, левая колонка, абзац 2, правая колонка, абзац 3	2-4
Y	BRADLEY Jenna Maria. TREM-2 Expression and Regulation in Inflammation and Ischaemia. Doctoral thesis, University of East Anglia. March 2014. 237 pages, страница 44, последний абзац, страница 86, таблица 2.3	12-13
A	WOLCHOK M.D. Jedd D. et al. Safety and clinical activity of combined PD-1 (nivolumab) and CTLA-4 (ipilimumab) blockade in advanced melanoma patients. The New England Journal of Medicine, 2013, V. 369, N. 2, pp. 122-133	1-20
A	US 2008/0292546 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 27.11.2008	1-20

 последующие документы указаны в продолжении графы

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

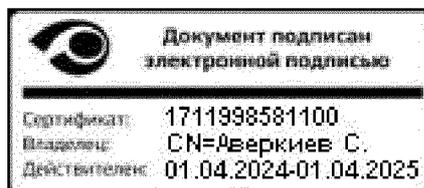
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 19 июня 2024 (19.06.2024)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202393348

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

СПК:

A61K 39/395
A61K 39/39558
A61K 2039/505
A61K 2039/507
A61P 35/00
A61P 37/04
C07K 16/28
C07K 16/2803
C07K 16/30