

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491415 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.19

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.11.29

(54) ЛЕЧЕНИЕ ФИБРОЗА АНТИТЕЛАМИ ПРОТИВ TREM2

(31) 63/283,738

(32) 2021.11.29

(33) US

(86) PCT/US2022/080560

(87) WO 2023/097327 2023.06.01

(71) Заявитель:

ПАЙОНИР

ИММУНОТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.

(US)

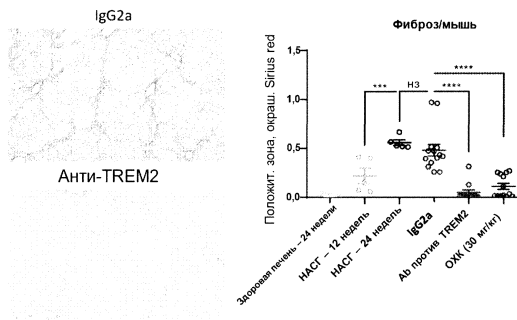
(72) Изобретатель:

Юрич Владислава, Эллиотт Серра,
Ливи Алисия (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем документе предложены антитела против TREM2 и соответствующие способы получения и применения антител против TREM2. Предложены также способы и композиции для усиления иммунного ответа и/или лечения связанного с иммунитетом состояния у индивидуума, например фиброзирующего заболевания, включающие уничтожение, блокирование или истощение нестимулирующих миелоидных клеток с использованием антитела против TREM2 или его антигенсвязывающего фрагмента.



A1

202491415

202491415

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581435EA/042

ЛЕЧЕНИЕ ФИБРОЗА АНТИТЕЛАМИ ПРОТИВ TREM2

Перекрестные ссылки на родственные заявки

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/283 738, поданной 29 ноября 2021 г., содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронной виде в формате XML и тем самым включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанный перечень последовательностей XML, созданный 15 ноября 2022 г., называется P11-014WO_SL.xml и имеет размер 55 804 байта.

Уровень техники

[0003] По оценкам, 600 000 человек в США страдают от цирроза печени, 14 000 из них находятся в конечной стадии заболевания и ожидают трансплантации печени. По данным исследований предполагается, что до 40-60% пациентов с циррозом имеют сопутствующее истощение мышц. Возникающая в результате слабость является значимой причиной функционального снижения, связанных с циррозом осложнений, госпитализаций и смертей пациентов с терминальной стадией заболевания печени (ТСЗП). Трансплантация печени является радикальным методом лечения ТСЗП, однако ухудшение физического состояния, не зависящее от тяжести заболевания печени, связано с повышенным риском исключения из списков ожидания трансплантации. Примерно у 40-50% пациентов с циррозом наблюдается цирротическая саркопения. Цирротическая саркопения представляет собой частое осложнение цирроза, которое негативно влияет на выживаемость и качество жизни пациентов. Цирротическая саркопения - это системное заболевание, обусловленное гипераммониемией вследствие нарушения цикла мочевины при циррозе, при котором мышцы обезвреживают аммиак, но за счет потери мышечной массы. Саркопения у пациентов с циррозом снижает выживаемость, уменьшает шансы на получение трансплантата и повышает риск развития осложнений, связанных с циррозом. Современные стандарты лечения пациентов с циррозом, таких как пациенты с ТСЗП или цирротической саркопенией, включают ряд изменений образа жизни, например увеличение физических нагрузок и соблюдение диеты. В настоящее время не существует одобренных фармакологических воздействий.

[0004] Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) распространена в мире на уровне 25% и является основной причиной развития цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). НАЖБП включает в себя широкий спектр заболеваний - от стеатоза с легким воспалением или без него (неалкогольная жировая печень) до неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), характеризующегося некровоспалением и быстрым прогрессированием фиброза. НАЖБП имеет двунаправленную связь с компонентами

метаболического синдрома, и диабет 2 типа повышает риск развития цирроза печени и связанных с ним осложнений. Хроническое повреждение печени при НАСГ значительно повышает риск развития терминальной стадии заболеваний печени, таких как цирроз и рак печени. Прогрессирующий фиброз печени является фактором риска для связанных с печенью исходов и общей смертности, и может быть оценен с помощью комбинации неинвазивных тестов. Пациенты с НАСГ подвержены повышенному риску развития гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК).

[0005] Изменение образа жизни и снижение веса на сегодняшний день являются единственными вариантами профилактики и лечения НАЖБП. Одобренных медицинских препаратов для лечения НАЖБП не существует, хотя несколько лекарств находятся на поздних стадиях разработки. Таким образом, требуются дополнительные терапевтические средства для лечения фиброза печени и НАЖБП.

[0006] В нормальных тканях многие миелоидные клетки, такие как макрофаги, полезны для правильного функционирования как врожденного, так и адаптивного иммунитета и, в частности, для заживления ран. Недавно была выявлена новая рубцово-ассоциированная субпопуляция TREM2⁺ CD9⁺ макрофагов, которая, как было показано, увеличивается при фиброзе печени, дифференцируется от циркулирующих моноцитов и является профиброгенной. Ramachandran et al. *Nature*. 2019 November; 575(7783): 512-518.

[0007] Связанные с ними патенты и патентные заявки включают: PCT/US2015/052682, поданная 28 сентября 2015 г.; PCT/US2016/054104, поданная 28 сентября 2016 г.; и USPN 10 836 828, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

[0008] Все патенты, патентные заявки, публикации, документы и статьи, процитированные в настоящем документе, во всей полноте включены в настоящий документ посредством ссылки.

Краткое описание изобретения

[0009] В настоящем документе описан способ лечения фиброзирующего заболевания у субъекта, включающий введение субъекту выделенного антитела, которое связывается с TREM2 человека (SEQ ID NO:15) и, необязательно, конкурирует за связывание с TREM2 мыши (SEQ ID NO:17) с антителом 37017 (SEQ ID NO: 31 и 32).

[0010] В некоторых вариантах осуществления антитело включает CDR-H1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, CDR-H2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10, CDR-H3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, и CDR-L1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, CDR-L2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и CDR-L3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14.

[0011] В некоторых вариантах осуществления антитело является афукозилированным и содержит последовательность VH, показанную в SEQ ID NO: 1; и последовательность VL, показанную в SEQ ID NO: 2; и активную Fc-область IgG1

человека.

[0012] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, показанную в SEQ ID NO: 1; и последовательность VL, показанную в SEQ ID NO: 2; и Fc-сайлент область человека, необязательно имеющая изотип IgG1 или IgG4 и необязательно содержащая мутацию N297Q.

[0013] В некоторых вариантах осуществления антитело включает все 3 CDR тяжелой цепи из последовательности, показанной в SEQ ID NO:7, и все 3 CDR легкой цепи из последовательности, показанной в SEQ ID NO:8.

[0014] В некоторых вариантах осуществления антитело включает замену А на Т в положении 97 последовательности, показанной в SEQ ID NO:7, и замену К на R в положении 98 последовательности, показанной в SEQ ID NO:7.

[0015] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, показанную в SEQ ID NO: 1, 3 или 5.

[0016] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, показанную в SEQ ID NO: 1, 3 или 5, и последовательность VL, показанную в SEQ ID NO: 2, 4 или 6.

[0017] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, показанную в SEQ ID NO: 1.

[0018] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, показанную в SEQ ID NO: 1, и последовательность VL, показанную в SEQ ID NO: 2.

[0019] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело 37012.

[0020] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность легкой цепи, показанную в SEQ ID NO: 25; и последовательность легкой цепи, показанную в SEQ ID NO: 26.

[0021] В другом аспекте в настоящем документе описано выделенное антитело, связывающееся с TREM2 человека (SEQ ID NO:15), причем антитело конкурирует за связывание с TREM2 мыши (SEQ ID NO:17) с антителом 37017 (SEQ ID NO: 31 и 32); и содержит активную Fc-область человека.

[0022] В некоторых вариантах осуществления антитело является человеческим, гуманизированным или химерным.

[0023] В некоторых вариантах осуществления антитело является гуманизированным.

[0024] В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с TREM2 человека с K_D менее или равной около 1, 2, 3, 4 или 5×10^{-9} при измерении в анализе поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

[0025] В некоторых вариантах осуществления антитело способно специфически уничтожать, истощать или блокировать TREM2+ миелоидные клетки; необязательно нестимулирующие миелоидные клетки.

[0026] В некоторых вариантах осуществления антитело обладает активностью антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). В некоторых вариантах осуществления антитело обладает активностью антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ). В некоторых вариантах осуществления антитело обладает активностью комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ).

[0027] В некоторых вариантах осуществления антитело уничтожает, блокирует или истощает миелоидные клетки посредством антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ) или комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ).

[0028] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой по меньшей мере одно из: моноклонального антитела, нейтрального антитела, антагонистического антитела, агонистического антитела, поликлонального антитела, антитела IgG1, антитела IgG3, афукозилированного антитела, биспецифического антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, полноразмерного антитела и их антигенсвязывающего фрагмента.

[0029] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело.

[0030] В некоторых вариантах осуществления антитело является мультиспецифическим.

[0031] В некоторых вариантах осуществления антитело является афукозилированным.

[0032] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой его антигенсвязывающий фрагмент, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, (scFv)₂, молекулу одноцепочечного антитела, антитело с двумя переменными доменами, антитело с одним переменным доменом, линейное антитело или антитело с V-доменом.

[0033] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит каркас, необязательно, при этом каркас представляет собой Fc, необязательно Fc человека.

[0034] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи класса, выбранного из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.

[0035] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи класса IgG, и подкласс выбран из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[0036] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG1.

[0037] В некоторых вариантах осуществления Fc содержит одну или более модификаций, при этом одна или более модификаций приводят к увеличению периода полувыведения, активности АЗКЦ, увеличению активности АЗКФ или увеличению активности КЗЦ по сравнению с Fc без такой одной или более модификаций.

[0038] В некоторых вариантах осуществления Fc связывает рецептор Fcγ, выбранный из группы, состоящей из: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa и FcγRIIIb.

[0039] В другом аспекте в настоящем документе описано выделенное антитело для

применения при лечении фиброзирующего заболевания.

[0040] В другом аспекте в настоящем документе описано выделенное антитело, которое конкурирует за связывание с человеческим TREM2 с антителом, описанным в настоящем документе.

[0041] В другом аспекте в настоящем документе описано выделенное антитело, которое связывает эпитоп человеческого TREM2, связываемый описанным в настоящем документе антителом.

[0042] В другом аспекте в настоящем документе описан выделенный полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующих описанное в настоящем документе антитело, его V_H , его V_L , его легкую цепь, его тяжелую цепь или его антигенсвязывающую часть; необязательно кДНК.

[0043] В другом аспекте в настоящем документе описан вектор или набор векторов, содержащих полинуклеотид или набор полинуклеотидов, описанных в данном документе.

[0044] В другом аспекте в настоящем документе описана клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или набор полинуклеотидов, описанных в данном документе, или вектор или набор векторов, описанных в данном документе.

[0045] В другом аспекте в настоящем документе описан способ получения антитела, включающий экспрессию антитела с помощью клетки-хозяина, описанной в данном документе, и выделение экспрессированного антитела.

[0046] В другом аспекте в настоящем изобретении описана фармацевтическая композиция, содержащая антитело, описанное в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0047] В другом аспекте в настоящем изобретении описан способ лечения или предотвращения фиброзирующего заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, связывающей TREM2, например, как описано в данном документе.

[0048] В некоторых вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние представляет собой заболевание печени. В некоторых вариантах осуществления уничтожение, отключение или истощение нестимулирующих миелоидных клеток приводит к лечению заболевания печени. В некоторых вариантах осуществления заболевание печени представляет собой неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП) или неалкогольный стеатогепатит (НАСГ). В некоторых вариантах осуществления заболевание не является онкологическим.

[0049] В некоторых вариантах осуществления антитело уничтожает, блокирует или истощает миелоидные клетки посредством антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ) или комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ). В некоторых вариантах осуществления антитело обладает блокирующей, агонистической или антагонистической активностью в отношении взаимодействия рецептор-лиганд.

[0050] В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

[0051] В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт усиливает иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.

[0052] В некоторых вариантах осуществления антитело уничтожает миелоидные клетки по меньшей мере одним из механизмов АЗКЦ, КЗЦ и АЗКФ. В некоторых вариантах осуществления антитело блокирует миелоидные клетки по меньшей мере одним из механизмов АЗКЦ, КЗЦ и АЗКФ. В некоторых вариантах осуществления антитело истощает миелоидные клетки по меньшей мере одним из механизмов АЗКЦ, КЗЦ и АЗКФ. В некоторых вариантах осуществления антитело обладает активностью антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). В некоторых вариантах осуществления антитело обладает активностью комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ). В некоторых вариантах осуществления антитело обладает активностью антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ). В некоторых вариантах осуществления антитело обладает блокирующей, агонистической или антагонистической активностью в отношении взаимодействия рецептор-лиганд.

[0053] В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки представляют собой стимулирующие миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки представляют собой нестимулирующие миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки включают по меньшей мере одну из дендритных клеток, опухлеассоциированных макрофагов (TAM), нейтрофилов или моноцитов. В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки представляют собой нейтрофилы. В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки представляют собой опухлеассоциированные макрофаги. В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, содержащей стимулирующие миелоидные клетки и нестимулирующие миелоидные клетки. В некоторых аспектах миелоидные клетки представляют собой TREM2+ миелоидные клетки. В некоторых аспектах TREM2+ миелоидные клетки включают по меньшей мере одну из TREM2+ макрофагов, TREM2+ CD9+ макрофагов, макрофагов, рубцово-ассоциированных макрофагов (SAM), дендритных клеток, опухлеассоциированных макрофагов (TAM), нейтрофилов или моноцитов.

[0054] В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт усиливает иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.

[0055] В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал, получает

одновременно или будет получать в дальнейшем иммунотерапию.

[0056] В другом аспекте, в настоящем документе описаны способы уничтожения, блокирования или истощения TREM2+ миелоидных клеток субъекта, страдающего фиброзирующим заболеванием, включающие приведение в контакт миелоидных клеток с антителом против TREM2, например, как описано в настоящем документе, или фармацевтической композицией, описанной в настоящем документе.

[0057] В некоторых вариантах осуществления уничтожение, блокирование или истощение нестимулирующих миелоидных клеток приводит к лечению фиброза путем усиления иммунного ответа к фиброзирующему заболеванию.

[0058] В другом аспекте в настоящем документе описан способ обнаружения TREM2 у субъекта, у которого имеется или есть подозрение на наличие заболевания или патологического состояния, способ включает в себя: (а) получение образца от субъекта; и (b) обнаружение присутствия или уровня TREM2 в образце путем приведения в контакт образца с антителом, предложенным в данном документе.

[0059] В некоторых вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние представляет собой заболевание печени.

[0060] В другом аспекте в настоящем документе описан набор, содержащий антитело или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, и инструкции по применению.

Краткое описание графических материалов

[0061] **ФИГ. 1.** Помимо окрашивания гематоксилином и эозином (H&E), ткани также окрашивали на наличие макрофагов с использованием антител к CD68. Внутриклеточный маркер CD68 широко используется в литературе как надежный цитохимический маркер для иммуноокрашивания моноцитов/макрофагов в воспаленных тканях и опухолях. В легких (изображение E), как и в других анализируемых тканях, не наблюдалось заметных изменений в количестве CD68+ макрофагов ни в одной из групп лечения по сравнению с контролями, что указывает на то, что опосредованное антителами к TREM2 истощение происходило именно в TME.

[0062] **ФИГ. 2А.** Окрашивание антителами к CD68 залитой парафином и фиксированной формалином (FFPE) ткани легких из указанных групп лечения. **ФИГ. 2В.** Восемь-девять полей каждого среза использовались для количественной оценки с помощью световой микроскопии.

[0063] **ФИГ. 3.** На клетках в отдельных тканях экспрессия TREM2 отсутствовала или была очень низкой. Заштрихованные гистограммы получены с помощью TREM2KO, а незаштрихованные гистограммы - с помощью мышей дикого типа. Антитело, использованное для окрашивания антителом к TREM2, было клоном 237920 от компании R&D Systems.

[0064] **ФИГ. 4.** Экспрессия TREM2 на поверхности клеток (незаштрихованная гистограмма) была значительно выше на TAM по сравнению с гранулоцитарными или моноцитарными MDSC в опухолях MC38 и CT26. Лимфоциты не экспрессируют TREM2.

Окрашивание изотипным контролем показано на гистограмме с серой заливкой.

[0065] **ФИГ. 5.** Экспрессия TREM2 на поверхности клеток (незаштрихованная гистограмма) была значительно выше на CD14-производных макрофагах по сравнению с любой субпопуляцией МКПК. Человеческие МКПК или макрофаги окрашивали по TREM2 (незаштрихованная гистограмма) или по изотипному контролю (серая гистограмма). Субпопуляции МКПК были разделены на нейтрофилы, моноциты или Т-клетки с использованием предварительно валидированной многоцветной панели FACS.

[0066] **ФИГ. 6.** Экспрессия TREM2 на поверхности клеток (незаштрихованная гистограмма) была значительно выше на TAM по сравнению с другими инфильтратами или не-CD45 положительными клетками. Суспензии из одного типа клеток, полученные из тканей человеческих опухолей, поверхность которых была окрашена по TREM2 (незаштрихованная гистограмма) или по изотипному контролю (серая гистограмма). Иммунные и неиммунные субпопуляции различались с использованием предварительно валидированной многоцветной панели FACS.

[0067] **ФИГ. 7.** Относительная цитотоксичность в процентах, измеренная по высвобождению лактатдегидрогеназы (LDH), была значительно выше в клетках-мишенях НЕК-293, обработанных афукозилированным mAb против TREM2 (PI37012), по сравнению с клетками, обработанными изотипным контрольным Ab при разных концентрациях Ab.

[0068] **ФИГ. 8.** Относительная люминесценция, измеряющая репортерную активность NFAT как имитация индукции АЗКЦ, показала дозозависимое увеличение в клетках, обработанных возрастающими концентрациями афукозилированного mAb против TREM2 (Afuc-PI-7012) и неафукозилированного mAb против TREM2 (PI-7012). В клетках, обработанных любой концентрацией Fc-сайлент mAb, не наблюдалось заметной относительной люминесценции.

[0069] **ФИГ. 9.** На левом изображении показано окрашивание H&E клеток печени мышей после получения антитела изотипного контроля IgG2a или афукозилированного mAb против TREM2 (Afuc-PI-7012). На правом изображении показано восстановление коллагена в печени мышей после обработки антителом изотипного контроля IgG2a, афукозилированным mAb против TREM2 (Afuc-PI-7012) или ОХК. У мышей, получавших афукозилированное mAb против TREM2 (Afuc-PI-7012), наблюдалось статистически значимое уменьшение фиброза (**** $p < 0,0001$) по сравнению с мышами, не получавшими или получавшими IgG2a.

Подробное описание сущности изобретения

[0070] Для целей интерпретации данного описания будут применяться следующие определения, и, когда это уместно, термины, используемые в единственном числе, также будут включать множественное число и наоборот. В случае, если любое изложенное определение противоречит любому документу, включенному в настоящий документ посредством ссылки, изложенное ниже определение имеет преимущественную силу.

[0071] Понятно, что аспекты и варианты осуществления изобретения, описанные в

данном документе, включают «содержащий», «состоящий» и/или «состоящий преимущественно из» аспектов и вариантов осуществления.

[0072] Для всех композиций, описанных в настоящем документе, и всех способов с использованием композиций, описанных в настоящем документе, композиции могут либо включать перечисленные компоненты или этапы, либо «состоять по существу из» перечисленных компонентов или этапов. Когда композиция описана как «состоящая по существу из» перечисленных компонентов, композиция содержит перечисленные компоненты и может содержать другие компоненты, которые не оказывают существенного влияния на подлежащее лечению состояние, но не содержит никаких других компонентов, которые существенно влияют на подлежащее лечению состояние, кроме тех компонентов, которые прямо перечислены; или, если композиция содержит дополнительные компоненты, кроме перечисленных, которые существенно влияют на подлежащее лечению состояние, композиция не содержит достаточной концентрации или количества дополнительных компонентов для существенного влияния на подлежащее лечению состояние. Когда способ описан как «состоящий по существу из» перечисленных этапов, способ содержит перечисленные этапы и может содержать другие этапы, которые не оказывают существенного влияния на подлежащее лечению состояние, но способ не содержит никаких других этапов, оказывающих существенное влияние на подлежащее лечению состояние, кроме тех этапов, которые явно перечислены. В качестве неограничивающего конкретного примера, когда композиция описывается как «состоящая по существу из» некоторого компонента, она может дополнительно содержать любое количество фармацевтически приемлемых носителей, транспортных средств или разбавителей и других подобных компонентов, которые не оказывают существенного влияния на подлежащее лечению состояние.

[0073] Термин «необязательно» при последовательном использовании включает от одной до всех перечисленных комбинаций и подразумевает все подкомбинации.

[0074] «Эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество», используемые в настоящем документе, относятся к количеству терапевтического соединения, такого как антигенсвязывающий агент против TREM2 или антитело против TREM2, вводимого человеку, либо в виде одной дозы, либо в составе серии доз, которое эффективно для получения или усиления желаемого терапевтического эффекта, как отдельно, так и в комбинации с другим терапевтическим средством. Примерами желаемого терапевтического эффекта являются усиление иммунного ответа, стабилизация заболевания, облегчение одного или более симптомов. Эффективное количество может доставляться в одном или более введениях.

[0075] Термин «лечение», используемый в настоящем документе, означает замедление или обращение вспять прогрессирования патологического состояния. Термин «лечение», используемый в настоящем документе, также означает замедление или обращение вспять прогрессирования патологического состояния, такого как фиброзирующее заболевание. Термин «лечение», используемый в настоящем документе,

также означает действие лечения патологического состояния, такого как фиброзирующее заболевание.

[0076] Фиброзирующее заболевание или фиброз представляет собой накопление молекул внеклеточного матрикса. Это накопление может создавать рубцовую ткань или рубцовые участки, что является общей чертой хронических повреждений тканей. Примерами фиброза являются легочный фиброз, почечный фиброз и цирроз печени. Органы, которые могут быть поражены фиброзом, включают в себя печень, легкие, почки и кожу. Фиброзирующее заболевание может включать в себя такое заболевание печени, как НАСГ.

[0077] Термин «индивидуум» или «субъект» в целях лечения, профилактики или снижения риска относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая в себя людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных зоопарка, спортивных или домашних животных, таких как собаки, лошади, кролики, крупный рогатый скот, свиньи, хомяки, песчанки, мыши, хорьки, крысы, кошки и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой мышь.

[0078] Термины «модулировать» и «модуляция» относятся к снижению или ингибированию или, альтернативно, активации или увеличению указанной переменной.

[0079] Термины «увеличивать» и «активировать» относятся к увеличению на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз или на большее значение в указанной переменной.

[0080] Термины «снижать» и «ингибировать» относятся к уменьшению на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное, 10-кратное, 20-кратное, 50-кратное, 100-кратное или большее значение в указанной переменной.

[0081] Термин «агонизировать» относится к активации передачи сигналов рецептора для индукции биологического ответа, связанного с активацией рецептора. «Агонист» представляет собой вещество, которое связывается с рецептором и усиливают его ответ.

[0082] Термин «антагонизировать» относится к ингибированию передачи сигналов рецептора для ингибирования биологического ответа, связанного с активацией рецептора. «Антагонист» представляет собой вещество, которое связывается с рецептором и подавляет его ответ.

[0083] Термин «около», используемый в настоящем документе, относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известного специалисту в данной области техники. Примерный диапазон погрешности составляет плюс-минус 5%. Упоминание «около» в отношении значения или параметра в настоящем документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые относятся непосредственно к этому значению или параметру, как таковому.

[0084] Следует отметить, что используемые в описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не указывает иное.

[0085] Для любой из структурных и функциональных характеристик, описанных в настоящем документе, способы определения этих характеристик известны в данной области техники.

Антитела

Структура

[0086] В настоящей заявке представлены антитела и композиции, включающие антитело, которое связывает белок TREM2, в том числе антитела, которые блокируют нестимулирующие миелоидные клетки.

[0087] Термин «антитело» используется в данном документе в самом широком смысле и включает в себя определенные типы молекул иммуноглобулинов, содержащих один или более антигенсвязывающих доменов, которые специфически связываются с антигеном или эпитопом. Антитело, в частности, включает интактные антитела (например, интактные иммуноглобулины), фрагменты антител и мультиспецифичные антитела.

[0088] Распознанные гены иммуноглобулинов включают гены константных областей каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эпсилон и мю, а также множество генов переменных областей иммуноглобулинов. Легкие цепи классифицируют на каппа или лямбда. «Класс» антитела или иммуноглобулина относится к типу константного домена или константной области, содержащейся в его тяжелой цепи. Есть пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут дополнительно разделять на подклассы (изоотипы), 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.

[0089] Структурная единица типового иммуноглобулина (антитела) состоит из двух пар полипептидных цепей, каждая пара содержит одну «легкую» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). N-концевой домен каждой цепи определяет переменную область от около 100 до 110 или более аминокислот, в основном ответственных за распознавание антигена. Термины переменная легкая цепь (VL) и переменная тяжелая цепь (VH) относятся к этим доменам легкой и тяжелой цепи соответственно. Тяжелая цепь IgG1 состоит из доменов VH, CH1, CH2 и CH3 соответственно от N- до C-конца. Легкая цепь состоит из доменов VL и CL от N- до C-конца. Тяжелая цепь IgG1 содержит шарнир между доменами CH1 и CH2. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновые конструкции содержат по меньшей мере один иммуноглобулиновый домен из IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, связанный с терапевтическим полипептидом. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновый домен, обнаруженный в представленной в данном документе антигенсвязывающей конструкции получен или происходит из конструкции на основе

иммуноглобулина, такой как диатело или нанотело. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновые конструкции, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере один иммуноглобулиновый домен из антитела, состоящего только из тяжелой цепи, такого как антитело верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновые конструкции, представленные в данном документе, содержат по меньшей мере один иммуноглобулиновый домен из антитела млекопитающего, такого как антитело быка, антитело человека, антитело верблюдовых, антитело мыши или любое химерное антитело.

[0090] В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в данном документе, содержат тяжелую цепь. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой IgA. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой IgD. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой IgE. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой IgG. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой IgM. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой IgG1. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой IgG2. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой IgG3. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой IgG4. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой IgA1. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой IgA2.

[0091] Термин «гипервариабельная область» или «HVR», используемый в данном документе, относится к каждой из областей вариабельного домена антитела, являющихся гипервариабельными по последовательности и/или образующих структурно определенные петли (гипервариабельные петли). В целом, нативные четырехцепочечные антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). HVR обычно содержат аминокислотные остатки из гипервариабельных петель и/или из определяющих комплементарность областей (CDR), причем последние характеризуются высочайшей изменчивостью последовательности и/или участвуют в распознавании антигенов. За исключением CDR1 в VH, CDR обычно содержат аминокислотные остатки, образующие гипервариабельные петли. Термин «гипервариабельные области» (HVR), часто называемые «определяющие комплементарность области» (CDR), используются в данном документе взаимозаменяемо касательно частей вариабельной области, которая образует антигенсвязывающие участки. Эта конкретная область была описана в Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) and by Chothia et al., J Mol Biol, 196:901-917 (1987), где определения выключают перекрывание или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, применение любого из определений для обозначения CDR антитела или его вариантов охватываются в пределах объема указанного термина в соответствии с обозначением и использованием в настоящем документе. Точное количество остатков, которые охватывают конкретную CDR, зависит от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники могут в обычном порядке определять, какие

остатки составляют конкретную CDR, учитывая аминокислотную последовательность варибельной области антитела.

[0092] Границы аминокислотной последовательности CDR могут определяться специалистом в данной области техники с использованием любого количества из известных схем нумерации, включая схемы, описанные в Kabat et al., *выше* (схема нумерации «Kabat»); Al-Lazikani et al., 1997, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948 (схема нумерации «Chothia»); MacCallum et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (схема нумерации «Contact»); Lefranc et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 2003, 27:55-77 (схема нумерации «IMGT»); и Honegge and Plückthun, *J. Mol. Biol.*, 2001, 309:657-70 (схема нумерации «АНО»); каждая из которых полностью включена посредством ссылки.

[0093] В таблице А приведены положения CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, определенные по схемам Kabat и Chothia. Для CDR-H1 нумерация остатков представлена с использованием схем нумерации Kabat и Chothia.

[0094] CDR могут быть определять, например, с использованием программного обеспечения для нумерации антител, такого как Abnum, доступного по адресу www.bioinf.org.uk/abs/abnum/, и описанного в Abhinandan and Martin, *Immunology*, 2008, 45:3832-3839, полностью включенной посредством ссылки.

Таблица А. Остатки в CDR в соответствии со схемами нумерации Kabat и Chothia.

CDR	Kabat	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97
H1 (нумерация по Kabat)	H31-H35B	H26-H32 или H34*
H1 (нумерация по Chothia)	H31-H35	H26-H32
H2	H50-H65	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102

* С-конец CDR-H1 при нумерации по системе нумерации Kabat варьирует между H32 и H34, в зависимости от длины CDR.

[0095] «Схема нумерации EU» обычно используется для обозначения остатка в константной области тяжелой цепи антитела (например, как сообщается в Kabat et al., *выше*). Если не указано иное, схема нумерации EU используется для обозначения остатков в константных областях тяжелой цепи антитела, описанных в данном документе.

[0096] Используемый в настоящем документе, термин «одноцепочечная» относится к молекуле, содержащей аминокислотные мономеры, линейно связанные пептидными связями. В конкретном таком варианте осуществления С-конец легкой цепи Fab может быть связан с N-концом тяжелой цепи Fab в одноцепочечной молекуле Fab. Как описано более подробно в данном документе, scFv содержит варибельный домен легкой цепи (VL), соединенный от своего С-конца с N-концом варибельного домена тяжелой цепи (VH) полипептидной цепью. Альтернативно, scFv может представлять собой

полипептидную цепь, в которой С-концевой конец V_H соединен с N-концевым концом V_L полипептидной цепью.

[0097] «Фрагмент Fab» (также называемый как антигенсвязывающий фрагмент) содержит константный домен (CL) легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи наряду с переменными доменами V_L и V_H, соответственно на легкой и тяжелой цепях. Переменные домены содержат определяющую комплементарность петли (CDR, также называемую гиперпеременная область), которые вовлечены в связывании антигена. Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab добавлением нескольких остатков на карбоксильном конце домена CH1 тяжелой цепи, в том числе одного или более цистеинов из шарнирной области антитела.

[0098] Фрагменты «F(ab')₂» содержат два фрагмента Fab, соединенных около шарнирной области дисульфидными связями. Фрагменты F(ab')₂ можно получать, например, рекомбинантными методами или ферментативным расщеплением пепсином интактного антитела. Фрагменты F(ab') можно диссоциировать, например, обработкой β-меркаптоэтанолом.

[0099] Фрагменты «Fv» содержат нековалентно связанный димер одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи.

[00100] Термины «одноцепочечные Fv» или «scFv» включают домены V_H и V_L антитела, причем эти домены находятся в одной полипептидной цепи. В одном варианте осуществления полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L, позволяющий scFv образовывать требуемой структуре для связывания антигена. Для получения 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 № 5 571 894 и патенте США № 5 587 458.

[00101] Фрагменты «scFv-Fc» содержат scFv, присоединенный к Fc-домену. Например, Fc-домен может быть присоединен к С-концу scFv. Fc-домен может следовать за V_H или V_L, в зависимости от ориентации переменных доменов в scFv (т. е., V_H-V_L и V_L-V_H). Может быть использован любой подходящий Fc-домен, известный в данной области техники или описанный в данном документе. В некоторых случаях Fc-домен включает в себя Fc-домен IgG4.

[00102] Термин «однодоменное антитело» или «sdAb» относится к молекуле, в которой один переменный домен антитела специфически связывается с антигеном в отсутствие другого переменного домена. Однодоменные антитела и их фрагменты описаны в Arabi Ghahroudi et al., *FEBS Letters*, 1998, 414:521-526 и Muyldermans et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 2001, 26:230-245, каждый из которых включен в полном объеме посредством ссылки. Однодоменные антитела также известны как sdAb или нанотела. Sdab достаточно стабильны и легко экспрессируются в качестве партнера по слиянию 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).

[00103] Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «полное антитело» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, по существу аналогичную структуре антитела природного происхождения, и имеющего тяжелые цепи, которые содержат Fc-область. Например, «полноразмерное антитело», когда используется для обозначения молекулы IgG, представляет собой антитело, которое содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи.

[00104] Термин «эпитоп» означает часть антигена, которая специфически связывается с антителом. Эпитопы часто содержат доступные на поверхности аминокислотные остатки и/или боковые цепи сахаров и могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первым, но не со вторым, может быть потеряно в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, которые непосредственно участвуют в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании. Эпитоп, с которым связывается антитело, могут определяться с использованием известных методов определения эпитопа, таких как, например, тестирование связывания антитела с вариантами TREM2 с различными точечными мутациями или с химерными вариантами TREM2.

[00105] «Мультиспецифичное антитело» представляет собой антитело, которое содержит два или более разных антигенсвязывающих домена, которые вместе специфически связывают два или более разных эпитопов. Два или более разных эпитопов могут быть эпитопами одного и того же антигена (например, одна молекула TREM2, экспрессируемая клеткой) или разных антигенов (например, разные молекулы TREM2, экспрессируемые одной и той же клеткой, или молекула TREM2 и молекула, отличная от TREM2). В некоторых аспектах мультиспецифичное антитело связывает два разных эпитопа (т. е. «биспецифичное антитело»). В некоторых аспектах мультиспецифичное антитело связывает три разных эпитопа (т. е. «триспецифичное антитело»).

[00106] «Моноспецифичное антитело» представляет собой антитело, которое содержит один или более сайтов связывания, которые специфически связываются с одним эпитопом. Примером моноспецифичного антитела является встречающаяся в природе молекула IgG, которая, будучи двухвалентной (т. е. имеющей два антигенсвязывающих домена), распознает один и тот же эпитоп в каждом из двух антигенсвязывающих доменов. Специфичность связывания может иметь любую подходящую валентность.

[00107] Термин «моноклональное антитело» относится к антителу из популяции по существу гомогенных антител. Популяция по существу гомогенных антител включает антитела, которые по существу сходны и связывают один и тот же эпитоп(-ы), за исключением вариантов, которые обычно могут возникать во время продукции моноклонального антитела. Такие варианты, как правило, присутствуют только в незначительных количествах. Моноклональное антитело, как правило, получают с

помощью процесса, который включает отбор одного антитела из множества антител. Например, процесс отбора может представлять собой отбор уникального клона из множества клонов, таких как пул гибридных клонов, фаговых клонов, дрожжевых клонов, бактериальных клонов или других клонов рекомбинантной ДНК. Выбранное антитело можно дополнительно изменять, например, для улучшения аффинности к мишени (созревание аффинности), для гуманизации антитела, для улучшения его продукции в культуре клеток и/или для снижения его иммуногенности у субъекта.

[00108] «Эффекторные функции» относятся к тем биологическим активностям, опосредованным Fc-областью антитела, которые могут варьировать в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают в себя связывание C1q для активации комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ), связывание с рецептором Fc для активации антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) и антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ), блокирования, агонизма или антагонизма связывания лиганда с рецептором.

[00109] Антитела против TREM2 могут включать в себя антитела, описанные в настоящем документе, например представленные в таблицах клоны. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит альтернативный каркас. В некоторых вариантах осуществления антитело состоит из альтернативного каркаса. В некоторых вариантах осуществления антитело по существу состоит из альтернативного каркаса. В некоторых аспектах антитело содержит фрагмент антитела. В некоторых аспектах антитело состоит из фрагмента антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело по существу состоит из фрагмента антитела. «Антитело к TREM2», «антитело против TREM2» или «TREM2-специфическое антитело» является антителом, предложенным в настоящем документе, которое специфически связывается с антигеном TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с внеклеточным доменом TREM2. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело к TREM2 связывается с эпитопом на TREM2, который является консервативным между или среди белков TREM2 разных биологических видов.

[00110] Термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи получена из конкретного источника или биологического вида, в то время как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи получены из другого источника или биологического вида.

[00111] «Гуманизированные» формы антител, не относящихся к человеку видов, представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из антитела, не относящегося к человеку вида. Гуманизированное антитело обычно представляет собой антитело человека (реципиентное антитело), в котором остатки из одной или более CDR заменены остатками из одной или более CDR антитела, не относящегося к человеку вида (донорское антитело). Донорским антителом может быть любое подходящее антитело, не относящегося к человеку вида, такое как антитело мыши, крысы, кролика, курицы или примата, не являющегося

человеком, имеющее желаемую специфичность, аффинность или биологическое действие. Гуманизированное антитело с меньшей вероятностью вызывает иммунный ответ и/или вызывает менее выраженный иммунный ответ по сравнению с антителом, не относящегося к человеку вида, когда его вводят субъекту-человеку. В некоторых случаях выбранные остатки каркасной области реципиентного антитела заменяются соответствующими остатками каркасной области донорского антитела. Гуманизированные антитела могут также содержать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в донорском антителе. Такие модификации могут создавать для дальнейшего уточнения функции антитела. Примеры способов получения гуманизированных антител можно найти в патентах США № 6 054 297, 5 886 152 и 5 877 293, каждый из которых включен в полном объеме посредством ссылки. Для получения дополнительной информации см., Jones et al., *Nature*, 1986, 321:522-525; Riechmann et al., *Nature*, 1988, 332:323-329 и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, 2:593-596, каждая из которых включена в полном объеме посредством ссылки.

[00112] В одном варианте осуществления константный(-ые) домен(-ы) человеческого антитела сливается(-ются) с переменным(-и) доменом(-ами) не относящихся к человеку видов. В другом варианте осуществления один или более аминокислотных остатков в одной или более последовательностях CDR нечеловеческого антитела изменяют для снижения вероятной иммуногенности нечеловеческого антитела при его введении субъекту-человеку, причем измененные аминокислотные остатки либо не являются критическими для иммуноспецифического связывания антитела с антигеном, либо созданные изменения аминокислотной последовательности являются такими консервативными изменениями, что связывание гуманизированного антитела с антигеном не оказывается значимо хуже, чем связывание нечеловеческого антитела с указанным антигеном.

[00113] «Антитело человека» представляет собой антитело, которое обладает аминокислотной последовательностью, соответствующей аминокислотной последовательности антитела, продуцируемого человеком или клеткой человека, или полученного из не являющегося человеком источника, в котором используется репертуар человеческих антител или последовательности, кодирующие антитела человека (например, полученные из источников человеческого происхождения или созданные *de novo*). Антитела человека конкретно исключают гуманизированные антитела. В одном варианте осуществления все переменные и константные домены получены из последовательностей иммуноглобулина человека (полностью человеческое антитело). Такие антитела могут получать различными способами, включая иммунизацию интересующим антигеном мыши, генетически модифицированной для экспрессии антител, полученных из генов, кодирующих тяжелую и/или легкую цепи человека.

[00114] В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в настоящем документе, содержат фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в настоящем документе, состоят из фрагмента

антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в настоящем документе, по существу состоят из фрагмента антитела. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fv. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент F(ab')₂. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab'. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой scFv (sFv). В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент scFv-Fc. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент однодоменного антитела.

Последовательности антител к TREM2

Домены V_H

[00115] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO:5. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO:7.

[00116] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H, имеющую по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичности с иллюстративной последовательностью V_H, представленной в SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H, представленную в SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, содержащих до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислотных замен. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, выделяться *de novo* согласно представленным в данном документе способам получения антител.

Домены V_L

[00117] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном

документе, содержит последовательность V_L , выбранную из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_L SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_L SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_L SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_L SEQ ID NO:8.

[00118] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичности с иллюстративной последовательностью V_L , представленной в SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_L , представленную в SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8, с до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, выделяться *de novo* согласно представленным в данном документе способам получения антител.

Комбинации V_H - V_L

[00119] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H , выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7; и последовательность V_L , выбранную из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8.

[00120] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO:1 и последовательность V_L SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO:3 и последовательность V_L SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO:5 и последовательность V_L SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO:7 и последовательность V_L SEQ ID NO:8. В определенных аспектах любую из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7 можно комбинировать с любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. Например SEQ ID NO:1 можно комбинировать с любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6 или 8. В другом примере SEQ ID NO:2

можно комбинировать с любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 7.

[00121] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичности с иллюстративной последовательностью V_H , предложенной в SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7; и последовательность V_L , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичности с иллюстративной последовательностью V_L , предложенной в SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H , предложенную в SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, содержащих до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислотных замен, и последовательность V_L , предложенную в SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8, содержащих до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислотных замен. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, выделяться *de novo* согласно представленным в данном документе способам получения антител.

CDR

[00122] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит от одной до трех CDR домена V_H , выбранных из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит от двух до трех CDR домена V_H , выбранных из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит три CDR домена V_H , выбранные из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7. В некоторых аспектах CDR представляют собой типичные CDR. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Kabat. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Chothia. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно AbM. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Contact. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно IMGT.

[00123] CDR для V_H из SEQ ID NO: 1 и V_L из SEQ ID NO: 2, определены с использованием систем Kabat, Chothia, AbM, Contact и IMGT, как показано ниже в **таблице В**. Примеры CDR для V_H , представлены в виде SEQ ID NO: 9, 10 и 11. Примеры CDR для V_L , представлены в виде SEQ ID NO: 12, 13 и 14.

Таблица В			
Область	Определение	Фрагмент последовательности	SEQ ID NO

CDR-H1	Chothia	GFTFSNY---	43
	AbM	GFTFSNYYYMA	37
	Kabat	-----NYYMA	44
	Contact	----SNYYMA	45
	IMGT	GFTFSNYY--	46
CDR-H2	Chothia	----TNSGGS-----	47
	AbM	---SLTNSGGSTY-----	10 и 38
	Kabat	---SLTNSGGSTYYADSVKG	48
	Contact	WVSSLTNSGGSTY-----	49
	IMGT	----LTNSGGST-----	50
CDR-H3	Chothia	--EWAGSGYFDY	39
	AbM	--EWAGSGYFDY	39
	Kabat	--EWAGSGYFDY	39
	Contact	TREWAGSGYFD-	51
	IMGT	TREWAGSGYFDY	52
CDR-L1	Chothia	KASQNVGNNLA--	40
	AbM	KASQNVGNNLA--	40
	Kabat	KASQNVGNNLA--	40
	Contact	-----GNNLAWY	53
	IMGT	---QNVGNN----	54
CDR-L2	Chothia	----YTSNRFT	13
	AbM	----YTSNRFT	13
	Kabat	----YTSNRFT	13
	Contact	LLIYYTSNRF-	55
	IMGT	----YT-----	
CDR-L3	Chothia	QRIYNSPWT	42
	AbM	QRIYNSPWT	42
	Kabat	QRIYNSPWT	42
	Contact	QRIYNSPW-	57
	IMGT	QRIYNSPWT	42

[00124] В некоторых вариантах осуществления CDR представляют собой CDR, по меньшей мере на около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичные CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3 из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7. В некоторых вариантах осуществления CDR-H1 представляет собой CDR-H1 домена VH, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, содержащих до 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен. В некоторых вариантах

осуществления CDR-H2 представляет собой CDR-H2 домена VH, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, содержащих до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3 домена VH, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, содержащих до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, выделяться *de novo* согласно представленным в данном документе способам получения антител.

[00125] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит от одной до трех CDR домена VL, выбранных из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит от двух до трех CDR домена VL, выбранных из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит три CDR домена VL, выбранные из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых аспектах CDR представляют собой типичные CDR. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Kabat. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Chothia. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно AbM. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Contact. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно IMGT.

[00126] В некоторых вариантах осуществления CDR представляют собой CDR, по меньшей мере на около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичные CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3 из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 представляет собой CDR-L1 домена VL, выбранную из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8, содержащих до 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления CDR-L2 представляет собой CDR-L2 домена VL, выбранную из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8, содержащих до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления CDR-L3 представляет собой CDR-L3 домена VL, выбранную из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8, содержащих до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники

или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, выделяться *de novo* согласно представленным в данном документе способам получения антител.

[00127] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит от одной до трех CDR домена VH, выбранных из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, и от одной до трех CDR домена VL, выбранных из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит от двух до трех CDR домена VH, выбранных из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, и от двух до трех CDR домена VL, выбранных из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит три CDR домена VH, выбранные из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, и три CDR домена VL, выбранные из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых аспектах CDR представляют собой типичные CDR. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Kabat. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Chothia. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно AbM. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Contact. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно IMGT.

[00128] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит CDR-H3, выбранную из SEQ ID NO: 11, 39, 51 или 52. В некоторых аспектах CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 из SEQ ID NO: 11, 39, 51 или 52. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3, выбранную из SEQ ID NO: 11, 39, 51 или 52, содержащих до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, выделяться *de novo* согласно представленным в данном документе способам получения антител.

[00129] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит CDR-H2 из SEQ ID NO: 10, 47, 48, 49 или 50. В некоторых аспектах CDR-H2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 из SEQ ID NO: 10, 47, 48, 49 или 50. В некоторых вариантах осуществления CDR-H2 представляет собой CDR-H2 из SEQ ID NO: 10, 47, 48, 49 или 50, содержащих до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен. В некоторых аспектах аминокислотные замены

представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, выделяться *de novo* согласно представленным в данном документе способам получения антител.

[00130] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит CDR-H1 из SEQ ID NO: 9, 37, 43, 44, 45 или 46. В некоторых аспектах CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 из SEQ ID NO: 9, 37, 43, 44, 45 или 46. В некоторых вариантах осуществления CDR-H1 представляет собой CDR-H1 из SEQ ID NO: 9, 37, 43, 44, 45 или 46, содержащих до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, выделяться *de novo* согласно представленным в данном документе способам получения антител.

[00131] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит CDR-H3 из SEQ ID NO: 11, 39, 51 и 52, и CDR-H2 из SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит CDR-H3 из SEQ ID NO: 11, 39, 51 или 52, CDR-H2 из SEQ ID NO: 10, 47, 48, 49 или 50, и CDR-H1 из SEQ ID NO: 9, 37, 43, 44, 45 или 46. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 из SEQ ID NO: 11, 39, 51 или 52, CDR-H2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 из SEQ ID NO: 10, 47, 48, 49 или 50, и CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 из SEQ ID NO: 9, 37, 43, 44, 45 или 46. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3 из SEQ ID NO: 11, 39, 51 или 52, содержащих вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен; CDR-H2 представляет собой CDR-H2 из SEQ ID NO: 10, 47, 48, 49 или 50, содержащих вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен; и CDR-H1 представляет собой CDR-H1 из SEQ ID NO: 9, 37, 43, 44, 45 или 46, содержащих вплоть до 1, 2, 3, 4 или 5

аминокислотных замен. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в этом абзаце, называют в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, выделяться *de novo* согласно представленным в данном документе способам получения антител.

[00132] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит CDR-L3 из SEQ ID NO: 14, 42 или 57. В некоторых аспектах CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 из SEQ ID NO: 14, 42 или 57. В некоторых вариантах осуществления CDR-L3 представляет собой CDR-L3 из SEQ ID NO: 14, 42 или 57, содержащих до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, выделяться *de novo* согласно представленным в данном документе способам получения антител.

[00133] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит CDR-L2 из SEQ ID NO: 13 или 55. В некоторых аспектах CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 из SEQ ID NO: 13 или 55. В некоторых вариантах осуществления CDR-L2 представляет собой CDR-L2 из SEQ ID NO: 13 или 55, содержащих до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, выделяться *de novo* согласно представленным в данном документе способам получения антител.

[00134] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит CDR-L1 из SEQ ID NO: 12. В некоторых аспектах CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 из SEQ ID NO: 12, 40, 53 или 54. В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 представляет собой CDR-L1 из SEQ ID NO: 12, 40, 53 или 54, содержащих до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, выделяться *de novo* согласно представленным в данном документе способам получения антител.

[00135] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит CDR-L3 из SEQ ID NO: 14, 42 или 57, и CDR-L2 из SEQ ID NO: 13 или 55. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит CDR-L3 из SEQ ID NO: 14, 42 или 57, CDR-L2 из SEQ ID NO: 13 или 55, и CDR-L1 из SEQ ID NO: 12, 40, 53 или 54. В некоторых вариантах осуществления CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 из SEQ ID NO: 14, 42 или 57, CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 из SEQ ID NO: 13 или 55, и CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 из SEQ ID NO: 12, 40, 53 или 54. В некоторых вариантах осуществления CDR-L3 представляет собой CDR-L3 из SEQ ID NO: 14, 42 или 57, содержащих вплоть до 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен; CDR-L2 представляет собой CDR-L2 из SEQ ID NO: 13 или 55, содержащих вплоть до 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен; и CDR-L1 представляет собой CDR-L1 из SEQ ID NO: 12, 40, 53 или 54, содержащих до 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, выделяться *de novo* согласно представленным в данном документе способам получения антител.

[00136] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном

документе, содержит CDR-H3 из SEQ ID NO: 11, 39, 51 или 52, CDR-H2 из SEQ ID NO: 10, 47, 48, 49 или 50, CDR-H1 из SEQ ID NO: 9, 37, 43, 44, 45 или 46, CDR-L3 из SEQ ID NO: 14, 42 или 57, CDR-L2 из SEQ ID NO: 13 или 55, и CDR-L1 из SEQ ID NO: 12, 40, 53 или 54. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 из SEQ ID NO: 11, 39, 51 или 52, CDR-H2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 из SEQ ID NO: 10, 47, 48, 49 или 50, CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 из SEQ ID NO: 9, 37, 43, 44, 45 или 46, CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 из SEQ ID NO: 14, 42 или 57, CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 из SEQ ID NO: 13 или 55, CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 из SEQ ID NO: 12, 40, 53 или 54. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3 из SEQ ID NO: 11, 39, 51 или 52, содержащих вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен; CDR-H2 представляет собой CDR-H2 из SEQ ID NO: 10, 47, 48, 49 или 50, содержащих вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен; CDR-H1 представляет собой CDR-H1 из SEQ ID NO: 9, 37, 43, 44, 45 или 46, содержащих вплоть до 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен; CDR-L3 представляет собой CDR-L3 из SEQ ID NO: 14, 42 или 57, содержащих вплоть до 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен; CDR-L2 представляет собой CDR-L2 из SEQ ID NO: 13 или 55, содержащих вплоть до 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен; и CDR-L1 представляет собой CDR-L1 из SEQ ID NO: 12, 40, 53 или 54, содержащих до 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, выделяться *de novo* согласно представленным в данном документе способам получения антител.

[00137] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит CDR-H1 из SEQ ID NO:9, CDR-H2 из SEQ ID NO: 10, CDR-H3 из SEQ ID NO: 11, CDR-L1 из SEQ ID NO:12, CDR-L2 из SEQ ID NO:13 и CDR-L1 из SEQ ID NO:14.

Fc-область

[00138] Термин «Fc-домен» или «Fc-область» в данном документе используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Термин включает Fc-области с нативной

последовательностью и вариантные Fc-области. Если не указано иное, нумерация аминокислотных остатков Fc-области или константной области соответствует системе нумерации EU, также называемой EU-индексом, как описано в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Термин «полипептид Fc» из димерного Fc в контексте данного документа относится к одному из двух полипептидов, образующих димерный Fc-домен, то есть полипептиду, содержащему C-концевые константные области тяжелой цепи иммуноглобулина, способные к стабильной самоассоциации. Например, полипептид Fc димерного Fc IgG содержит последовательность константных доменов CH2 IgG и CH3 IgG. Fc может быть представлен классом IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут дополнительно подразделяться на подклассы (изотипы), например IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂.

[00139] Термины «Fc-рецептор» или «FcR» используются для описания рецептора, который связывается с Fc-областью антитела. Например, FcR может представлять собой FcR с нативной человеческой последовательностью. В целом FcR представляет собой рецептор, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает в себя рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, в том числе аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают в себя FcγRIIA (активирующий рецептор) и FcγRIIB (ингибирующий рецептор), которые содержат аналогичные аминокислотные последовательности, отличающиеся преимущественно своими цитоплазматическими доменами. С определенными FcR также могут связываться иммуноглобулины других изотипов (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 активирующий мотив (ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIB в своем цитоплазматическом домене содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) (см., например, M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Обзор FcR приведен 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). Другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем, охватываются термином «FcR», описанным в данном документе. Этот термин также включает в себя неонатальный рецептор, FcRn, отвечающий за перенос материнских IgG плоду (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587 (1976); и Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

[00140] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG1.

[00141] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG3.

[00142] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG2.

[00143] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG4.

[00144] Модификации в домене CH2 могут влиять на связывание FcR с Fc. В данной области известен ряд аминокислотных модификаций в Fc-области для избирательного изменения аффинности Fc для различных рецепторов Fc-гамма (Fcγ). В некоторых вариантах осуществления Fc содержит одну или более модификаций для изменения связывания рецепторов Fc-гамма с конструкцией антител. В другом варианте осуществления Fc содержит одну или более модификаций для снижения аффинности связывания рецепторов Fc-гамма.

[00145] Примеры мутаций, изменяющих связывание FcRs с Fc, перечислены ниже:

[00146] 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);

[00147] F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L (Stavenhagen 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);

[00148] 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);

[00149] 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);

[00150] S239D/S267E, S267E/L328F (Chu SY, Vostiar I, Karki S, et al. Mol Immunol. 2008 Sep;45(15):3926-33);

[00151] 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 *Therapeutic Antibody Engineering* (William R. Strohl and Lila M. Strohl, Woodhead Publishing series in Biomedicine No 11, ISBN 1 907568 37 9, Oct 2012) на странице 283 перечислены мутации.

[00152] В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, включает модификации, улучшающие его способность опосредовать эффекторную функцию. Такие модификации известны в данной области и включают афукозилирование или конструирование аффинности Fc в направлении активации рецептора, в основном FCGR3a, в отношении AЗКЦ, и в направлении C1q в отношении КЗЦ. Ниже, в таблице С обобщены различные конструкции, представленные в литературе, в отношении конструирования эффекторной функции.

[00153] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит Fc-область с одной или более аминокислотными заменами, которые улучшают АЗКЦ, например заменой в одном или более положениях 298, 333 и 334 Fc-области. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном

документе, содержит Fc-область с одной или более аминокислотными заменами в положениях 239, 332 и 330, как описано в Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006,103: 4005-4010, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[00154] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит одно или более изменений, которые улучшают или уменьшают связывание C1q и/или КЗЦ. См. патент США № 6 194 551; WO 99/51642; и Idusogie et al., *J. Immunol.*, 2000, 164:4178-4184; каждое из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[00155] Таким образом, в одном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, может включать в себя димерный Fc, который содержит одну или более аминокислотных модификаций, как указано в таблице В, которые обеспечивают повышенную эффекторную функцию. В другом варианте осуществления антитела может быть афукозилированным для улучшения эффекторной функции.

Таблица С. Домены CH2 и конструирование эффекторной функции

Таблица В		
Ссылка	Мутации	Эффект
Lu, 2011, Ferrara 2011, Mizushima 2011	Афукозилированное	Увеличенная АЗКЦ
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A	Увеличенная АЗКЦ
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A/K326A	Увеличенная АЗКЦ
Stavenhagen, 2007	F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L	Увеличенная АЗКЦ
Nordstrom, 2011	F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L	Увеличенная АЗКЦ
Stewart, 2011	F243L	Увеличенная АЗКЦ
Shields, 2001	S298A/E333A/K334A	Увеличенная АЗКЦ
Lazar, 2006	S239D/I332E/A330L	Увеличенная АЗКЦ
Lazar, 2006	S239D/I332E	Увеличенная АЗКЦ
Bowles, 2006	AME-D, не указанные мутации	Увеличенная АЗКЦ
Heider, 2011	37,1, мутации не раскрыты	Увеличенная АЗКЦ
Moore, 2010	S267E/H268F/S324T	Увеличенная КЗЦ

[00156] Модификации Fc, снижающие связывание FcγR и/или комплемента, и/или эффекторную функцию, известны в данной области техник. Антитела, содержащие такие модификации, называются «Fc-сайлент» антитела. В различных публикациях описаны стратегии, использованные для конструирования антител со сниженной или заглушенной 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 эффекторной функции путем модификации гликозилирования, использования каркасы IgG2/IgG4 или введения мутаций в области шарнира или СН2 из Fc. Например, в патентной публикации США № 2011/0212087 (Strohl), международной патентной публикации № WO 2006/105338 (Xencor), патентной публикации США № 2012/0225058 (Xencor), патентной публикации США № 2012/0251531 (Genentech), патентной публикации США № 2011/0059075 (Rockefeller University/MIT), и в Strop et al ((2012) J. Mol. Biol. 420: 204-219) описывают конкретные модификации для снижения связывания FcγR или комплемента с Fc.

[00157] Конкретные неограничивающие примеры известных аминокислотных модификаций для снижения связывания FcγR или комплемента с Fc включают в себя примеры, представленные в таблице D:

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

Компания	Мутации
GSK	N297A
Rockefeller/MIT	N297Q
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 E.coli, негликозил.
Medimune	L234F/L235E/P331S
Trubion	Мутант по шарниру, возможно C226S/P230S

[00158] Способы продуцирования антител с незначительным содержанием фукозы или без нее на сайте гликозилирования Fc (Asn 297, нумерация EU) без изменения

аминокислотной последовательности хорошо известны в данной области. Технология GlymaxX® (ProBioGen AG) основана на введении гена фермента, который отклоняет клеточный путь биосинтеза фукозы, в используемые для производства антител клетки. Это предотвращает добавление сахара «фукозы» к N-связанной углеводной части антитела клетками, продуцирующими антитела. (von Horsten et al. (2010) *Glycobiology*. 2010 Dec; 20 (12):1607-18.) Примеры линий клеток, способных продуцировать дефукозилированное антитело, включают в себя CHO-DG44 со стабильной сверхэкспрессией бактериальной оксидоредуктазы ГДФ-6-дезоксид-Д-ликсо-4-гексилоредуктазы (RMD) (см. Henning von Horsten et al., *Glycobiol* 2010, 20:1607-1618) или клетки Lec13 CHO, у которых отсутствует фукозилирование белка (см. Ripka et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, 249:533-545; патентная публикация США № 2003/0157108; WO 2004/056312; каждая из которых полностью включена посредством ссылки), и линии клеток с нокаутом, такой как ген альфа-1,6-фукозилтрансферазы, или клетки CHO с нокаутом FUT8 (см. Yamane-Ohnuki et, *Biotech. Bioeng.*, 2004, 87: 614-622; Kanda et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 94:680-688 и WO 2003/085107; каждый из которых включен в полном объеме посредством ссылки). Другой подход к получению антител с пониженным уровнем фукозилирования можно найти в патенте США 8 409 572, в котором представлены подходы по отбору клеточных линий для продукции антител с учетом их способности давать более низкий уровень фукозилирования в антителах

[00159] Антитела могут быть полностью афукозилированы (в значении, что они не содержат выявляемой фукозы), или они могут быть частично афукозилированы в значении, что антитело содержит менее 95%, менее 85%, менее 75%, менее 65%, менее 55%, менее 45%, менее 35%, менее 25%, менее 15% или менее 5% количества фукозы, обычно выявляемого для аналогичного антитела, продуцируемого экспрессионной системой млекопитающих.

[00160] В некоторых аспектах антитело, предложенное в данном документе, содержит домен IgG1 с пониженным содержанием фукозы в положении Asn 297 по сравнению с доменом IgG1 природного происхождения. Известно, что такие домены Fc улучшают АЗКЦ. См. Shields et al., *J. Biol. Chem.*, 2002, 277:26733-26740, включенную в полном объеме посредством ссылки. В некоторых аспектах такие антитела не содержат фукозу в положении Asn 297. Количество фукозы можно определять с использованием любого подходящего метода, например, как описано в WO 2008/077546, включенную в полном объеме посредством ссылки.

[00161] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, включает разделенный пополам олигосахарид, такой как двухантенный олигосахарид, присоединенный к Fc-области антитела, которая разделена пополам GlcNAc. Такие варианты антител могут иметь пониженное фукозилирование и/или улучшенную функцию АЗКЦ. Примеры таких вариантов антител описаны, например, в WO 2003/011878; патенте США № 6 602 684; и патентной публикации США № 2005/0123546; каждое из которых в полном объеме включено в данный документ

посредством ссылки.

[00162] Другие иллюстративные варианты гликозилирования, которые могут включать в представленные в данном документе антитела, описаны, например, в патентных публикациях США № 2003/0157108, 2004/0093621, 2003/0157108, 2003/0115614, 2002/0164328, 2004/0093621, 2004/0132140, 2004/0110704, 2004/0110282, 2004/0109865; международных патентных публикациях № 2000/61739, 2001/29246, 2003/085119, 2003/084570, 2005/035586, 2005/035778; 2005/053742, 2002/031140; Okazaki et al., *J. Mol. Biol.*, 2004, 336:1239-1249; и Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.*, 2004, 87: 614-622; каждое из которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

[00163] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит Fc-область с по меньшей мере одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенным к Fc-области. Такие варианты антител могут иметь улучшенную функцию КЗЦ. Примеры таких вариантов антител описаны, например, в WO 1997/30087; WO 1998/58964 и WO 1999/22764, каждая из которых включена в полном объеме посредством ссылки.

[00164] Примеры линий клеток, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают в себя CHO-DG44 со стабильной сверхэкспрессией бактериальной оксидоредуктазы ГДФ-6-дезоксид-Д-ликсо-4-гексилоредуктазы (RMD) (см. Henning von Horsten et al., *Glycobiol* 2010, 20:1607-1618) или клетки Lec13 CHO, у которых отсутствует фукозилирование белка (см. Ripka et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, 249:533-545; патентная публикация США № 2003/0157108; WO 2004/056312; каждая из которых полностью включена посредством ссылки), и линии клеток с нокаутом, такой как ген альфа-1,6-фукозилтрансферазы, или клетки CHO с нокаутом FUT8 (см. Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.*, 2004, 87: 614-622; Kanda et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 94:680-688 и WO 2003/085107; каждый из которых включен в полном объеме посредством ссылки).

[00165] В некоторых вариантах осуществления антитело обладает активностью антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ). АЗКФ может возникать, когда антитела связываются с антигенами на поверхности клеток-мишеней. Фагоцитирующие клетки, несущие на своей поверхности Fc-рецепторы, в том числе моноциты и макрофаги, распознают и связывают Fc-область антител, связанных с клетками-мишенями. После связывания Fc-рецептора с клеткой-мишенью, связанной с антителом, может начинаться фагоцитоз клетки-мишени. АЗКФ можно считать одной из форм АЗКЦ.

[00166] В некоторых вариантах осуществления антитела способны образовывать иммунный комплекс. Например, иммунный комплекс может представлять собой клетку, покрытую антителами.

[00167] В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой моноклональные антитела.

[00168] В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой поликлональные антитела.

[00169] В некоторых вариантах осуществления антитела продуцируют с помощью гибридом. В других вариантах осуществления антитела производятся рекомбинантными клетками, сконструированными для экспрессии желаемых переменных и константных доменов.

[00170] В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть одноцепочечными антителами или другими производными антител, сохраняющими антигенную специфичность и нижнюю шарнирную область или ее вариант.

[00171] В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть полифункциональными антителами, рекомбинантными антителами, человеческими антителами, гуманизированными антителами, их фрагментами или вариантами. В конкретных вариантах осуществления фрагмент антитела или его производное выбирают из фрагмента Fab, фрагмента Fab'2, CDR и ScFv.

[00172] В некоторых вариантах осуществления антитела специфичны к поверхностным антигенам, таким как белок TREM2. В некоторых вариантах осуществления терапевтические антитела специфичны для антигенов (например, молекул, специфически экспрессируемых антигенсодержащими клетками-мишенями). В конкретных вариантах осуществления терапевтические антитела могут иметь Fc-части IgG1 или IgG3 человека или не являющегося человеком примата.

Связывание

[00173] Что касается связывания антитела с молекулой-мишенью, термины «связывает», «специфическое связывание», «специфически связывается с», «специфический в отношении», «избирательно связывается» и «селективный в отношении» для конкретного антигена (например, полипептида-мишени) или эпитопа на конкретном антигене означает связывание, которое заметно отличается от неспецифического или неселективного взаимодействия (например, с молекулой, не являющейся мишенью). Специфическое связывание можно измерять, например, путем измерения связывания с молекулой-мишенью и сравнения его со связыванием с молекулой, не являющейся мишенью. Специфическое связывание также можно определять путем конкуренции с контрольной молекулой, которая имитирует эпитоп, распознаваемый на молекуле-мишени. В этом случае указывается специфическое связывание, если связывание антитела с молекулой-мишенью конкурентно ингибируется контрольной молекулой.

[00174] «Аффинность» относится к силе суммарного количества нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном или эпитопом). Если не указано иное, используемый в настоящем документе термин «аффинность» относится к собственной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие в соотношении 1:1 между членами пары по связыванию (например, антителом и антигеном или эпитопом). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y может быть выражена в виде константы диссоциации (K_D). Кинетические компоненты, которые влияют на константу

равновесия диссоциации, более подробно описаны ниже. Аффинность можно измерять обычными методами, известными в данной области техники, в том числе описанными в данном документе, такими как технология поверхностного плазмонного резонанса (ППР)(например, BIACORE[®]) или биослойная интерферометрия (например, FORTEBIO[®]).

[00175] Термин « k_d » (сек^{-1}), используемый в данном документе, относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Это значение также называют значение k_{off} .

[00176] Термин « k_a » ($\text{M}^{-1} \times \text{сек}^{-1}$), используемый в данном документе, относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Это значение также называют значение k_{on} .

[00177] Термин « K_D » (M), используемый в данном документе, относится к константе равновесия диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. $K_D = k_d/k_a$. В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела описывается в терминах K_D для взаимодействия между таким антителом и его антигеном. Для ясности, как известно в данной области техники, меньшее значение K_D указывает на более высокое аффинное взаимодействие, тогда как большее значение K_D указывает на более низкое аффинное взаимодействие.

[00178] Термин « K_A » (M^{-1}), используемый в данном документе, относится к константе равновесия ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. $K_A = k_a/k_d$.

[00179] При использовании в данном документе в контексте двух или более антител термин «конкурирует с» или «перекрестно конкурирует с» указывает на то, что два или более антител конкурируют за связывание с антигеном (например, TREM2). В одном примере анализа TREM2 наносят на поверхность и приводят его в контакт с первым антителом к TREM2, после чего добавляют второе антитело к TREM2. В другом примере анализе сначала на поверхность наносят антитело к TREM2 и приводят его в контакт с TREM2, а затем добавляют второе антитело к TREM2. Если присутствие первого антитела к TREM2 снижает связывание второго антитела к TREM2 в любом анализе, тогда антитела конкурируют друг с другом. Термин «конкурирует с» также включает комбинации антител, в которых одно антитело снижает связывание другого антитела, но при этом не наблюдается конкуренции, когда антитела добавляются в обратном порядке. Однако в некоторых вариантах осуществления первое и второе антитела ингибируют связывание друг друга независимо от порядка, в котором они добавлены. В некоторых вариантах осуществления одно антитело снижает связывание другого антитела с его антигеном по меньшей мере на 25%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%. Квалифицированный специалист может выбирать концентрации антител, используемых в конкурентных анализах, на основании значений аффинности антител к TREM2 и валентности антител. Анализы, описанные в этом определении, являются иллюстративными, и квалифицированный специалист может

использовать любой подходящий анализ для определения конкуренции антител друг с другом. Подходящие анализы описаны, например, в Cox et al., «Immunoassay Methods», в *Assay Guidance Manual [Интернет]*, обновленная на дату 24 декабря 2014 г. (www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/; по состоянию на 29 сентября 2015 г.); Silman et al., *Cytometry*, 2001, 44:30-37; и Finco et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, 54:351-358, каждое из которых включено в полном объеме посредством ссылки.

[00180] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, связывает человеческий TREM2 с K_D меньшей или равной около 0,001; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 1,95; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 или 10×10^{-9} М, как измерено анализом Biacore. В некоторых вариантах осуществления значение K_D антитела, предложенного в настоящем документе, находится в пределах около 0,001-0,01; 0,01-0,1; 0,01-0,05; 0,05-0,1; 0,1-0,5; 0,5-1; 0,25-0,75; 0,25-0,5; 0,5-0,75; 0,75-1; 0,75-2; 1,1-1,2; 1,2-1,3; 1,3-1,4; 1,4-1,5; 1,5-1,6; 1,6-1,7; 1,7-1,8; 1,8-1,9; 1,9-2; 1-2; 1-5; 2-7; 3-8; 3-5; 4-6; 5-7; 6-8; 7-9; 7-10 или $5-10 \times 10^{-9}$ М, как измерено анализом Biacore.

[00181] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, связывает человеческий TREM2 со значением K_D меньшим или равным около 2; 1,98; 1,95; 1,9; 1,85; 1,8; 1,75; 1,7; 1,65; 1,6; 1,55; 1,50; 1,45 или $1,4 \times 10^{-9}$ М, или меньше, как измерено анализом Biacore. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, связывает человеческий TREM2 со значением K_D в пределах 1,9-1,8; 1,8-1,7; 1,7-1,6; 1,6-1,5 или $1,9-1,5 \times 10^{-9}$ М, как измерено анализом Biacore. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, связывает человеческий TREM2 со значением K_d меньшим или равным около 10; 9,56; 9,5; 9,0; 8,88; 8,84; 8,5; 8; 7,5; 7,32; 7; 6,5; 6; 5,5; 5; 4,5; 4; 3,5; 3; 2,5; 2; 1,5 или 1×10^{-4} (1/с), или меньше, как измерено анализом Biacore. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, связывает человеческий TREM2 со значением K_d меньшим или равным около 7-10, 7-8, 8-9, 9-10, 7-7,5, 7,5-8, 8-8,5, 8,5-9, 9-9,5 или $9,5-10 \times 10^{-4}$ (1/с), как измерено анализом Biacore. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, связывает человеческий TREM2 со значением K_a большим или равным около 4; 4,1; 4,2; 4,3; 4,4; 4,5; 4,6; 4,7; 4,8; 4,9; 45; 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6; 7; 8; 9 или 10×10^5 (1/Мс), как измерено анализом Biacore. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, связывает человеческий TREM2 со значением K_a в пределах 4-7; 4-4,5; 4,5-5; 5-5,5; 5,5-6; 6-6,5 или 6,5-7; 7-8; 8-9 или $9-10 \times 10^5$ (1/Мс), как измерено анализом Biacore.

[00182] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, связывает человеческий TREM2 со значением EC50 меньшим или равным 2; 1,9; 1,8; 1,7; 1,6; 1,5; 1,4; 1,3; 1,2; 1,1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 или 0,1 нМ, как измерено методом проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления антитело связывает человеческий TREM2 со значением EC50 в пределах 0,6-1,4 нМ, как

измерено методом проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления антитело связывает человеческий TREM2 со значением EC50 около 0,5; 0,6; 0,9; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4 или 1,5 нМ, как измерено методом проточной цитометрии.

[00183] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, связывает мышинный TREM2 со значением EC50 меньшим или равным 2; 1,9; 1,8; 1,7; 1,6; 1,5; 1,4; 1,3; 1,2; 1,1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 или 0,1 нМ, как измерено методом проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления антитело связывает мышинный TREM2 со значением EC50 в диапазоне 0,6-1,4 нМ, как измерено методом проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления антитело связывает мышинный TREM2 со значением EC50 около 0,5; 0,6; 0,9; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4 или 1,5 нМ, как измерено методом проточной цитометрии.

[00184] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, не связывает человеческий TREM2 со значением EC50 большим или равным 20 нМ, или больше, как измерено методом проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, не связывает мышинный TREM2 со значением EC50 большим или равным 3 нМ, или больше, как измерено методом проточной цитометрии.

[00185] Для скрининга антител, которые связываются с эпитопом на целевом антигене, связанном интересующим антителом (например, TREM2), можно проводить рутинный анализ с перекрестным блокированием, такой как описанный в *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Альтернативно или дополнительно, картирование эпитопов может выполняться методами, известными в данной области.

[00186] Конкуренцию между антителами определяют с помощью анализа, в котором исследуемое антитело ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 50:1495, 1990; Fendly et al. *Cancer Research* 50: 1550-1558; пат. США 6 949 245). Тестируемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если избыток тестируемого антитела (например, по меньшей мере кратно 2х, 5х, 10х, 20х или 100х) ингибирует связывание эталонного антитела, например, по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания. Антитела, идентифицируемые в конкурентном анализе (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся со смежным эпитопом, расположенным достаточно близко к эпитопу, связываемому эталонному антителу, для появления стерического затруднения для антител. Например, можно идентифицировать второе конкурирующее антитело, которое конкурирует за связывание с TREM2 с первым антителом, описанным в настоящем документе. В некоторых случаях второе антитело может блокировать или ингибировать связывание первого антитела, например, по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания. В некоторых случаях второе антитело

может замещать первое антитело на более чем 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%.

Функция

[00187] В некоторых вариантах осуществления антитело обладает активностью антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). АЗКЦ может возникать, когда антитела связываются с антигенами на поверхности клеток-мишеней. Эффекторные клетки, несущие на своей клеточной поверхности Fc гамма-рецепторы (FcγR или FCGR), в том числе цитотоксические Т-клетки, естественные клетки-киллеры (NK), макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, дендритные клетки или моноциты, распознают и связывают Fc-область антител, связанных с клетками-мишенями. Такое связывание может запускать активацию внутриклеточных сигнальных путей, приводящих к гибели клеток. В конкретных вариантах осуществления подтипы (изотипы) Fc-области иммуноглобулина антитела включают человеческие IgG1 и IgG3. Используемая в настоящем документе, АЗКЦ относится к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (FcR) (*например*, естественные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис этой клетки-мишени. Первичные клетки, опосредующие АЗКЦ, естественные клетки-киллеры, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопозитических клетках обобщены в таблице 3 на странице 464 в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Для оценки активности АЗКЦ представляющей интерес молекулы может проводиться анализ АЗКЦ *in vitro*, такой как описанный в патенте США № 5 500 362 или 5 821 337. Эффекторные клетки, пригодные для такого анализа, включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и естественные клетки-киллеры (NK). В качестве альтернативы или дополнения, АЗКЦ-активность представляющей интерес молекулы можно оценивать *in vivo*, *например*, в животной модели, такой как описано в Clynes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998).

[00188] В некоторых вариантах осуществления антитело обладает активностью комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ). Индуцированная антителами КЗЦ опосредуется через белки классического каскада комплемента и запускается связыванием белка комплемента C1q с антителом. Связывание Fc-области антитела с C1q может индуцировать активацию каскада комплемента. В конкретных вариантах осуществления подтипы (изотипы) Fc-области иммуноглобулина антитела включают человеческие IgG1 и IgG3. Используемая в данном документе КЗЦ относится к способности молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (*например*, полипептидом (*например*, антителом)), образующей 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).

[00189] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой агонистическое антитело. Агонистическое антитело может индуцировать (например, усиливать) одну или более активностей или функций NSM после того, как антитело свяжет белок TREM2, экспрессированный на клетке. Агонистическое антитело может связываться с NSM и активировать их, вызывая изменения в пролиферации клеток или изменяя их способность к презентации антигена. Агонистическое антитело может связываться с NSM и активировать их, запуская внутриклеточные сигнальные пути, которые приводят к изменению клеточного роста или апоптозу клеток.

[00190] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антагонистическое антитело. Антагонистическое антитело может блокировать (например, усиливать) одну или более активностей или функций NSM после того, как антитело свяжет белок TREM2, экспрессированный на клетке. Например, антагонистическое антитело может связывать лиганд и блокировать его связывание с одним или более белками NSM, предотвращая дифференцировку и пролиферацию клетки или изменяя способность к презентации антигена. Антагонистическое антитело может связываться с белком TREM2 и предотвращать активацию его лигандом, изменяя внутриклеточные сигнальные пути, которые способствуют росту и выживанию клеток.

[00191] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой истощающее антитело. Истощающее антитело представляет собой антитело, которое уничтожает нестимулирующую миелоидную клетку при контакте с ней за счет взаимодействия антитела с другими иммунными клетками и молекулами. Например, антитела, связываясь с клетками, несущими белки TREM2, могут вовлекать белки комплемента и индуцировать комплемент-зависимый лизис клеток. Антитела, связываясь с клетками, несущими белки TREM2, могут также инициировать уничтожение соседних клеток, несущих Fc-рецепторы, путем антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ).

[00192] В некоторых вариантах осуществления антитело является нейтрализующим антителом, и данное антитело нейтрализует одну или более биологических активностей NSM. В некоторых вариантах осуществления белок TREM2 экспрессируется на поверхности нестимулирующих миелоидных клеток, и данное антитело распознает внеклеточный домен белка TREM2.

[00193] В некоторых вариантах осуществления антитело является селективным по отношению к NSM (предпочтительно связывается с TREM2). В некоторых вариантах осуществления антитело, селективно связывающееся с NSM, имеет константу диссоциации (K_d) в диапазоне от 0,0001 нМ до 1 мкМ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело специфически связывается с эпитопом на белке TREM2, который является консервативным белком у разных биологических видов. В другом варианте осуществления понятие «селективное связывание» включает в себя «исключительное связывание», но не требует такой трактовки.

[00194] В одном варианте осуществления антитело против TREM2, связанное со своей мишенью, вызывает истощение *in vivo* нестимулирующих миелоидных клеток, с которыми оно связано. В некоторых вариантах осуществления эффекторные белки, индуцируемые кластерными антителами, могут вызывать различные реакции, включая высвобождение воспалительных цитокинов, регуляцию продуцирования антигена, эндоцитоз или уничтожение клеток. В одном варианте осуществления антитело способно рекрутировать и активировать комплемент или опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) *in vivo*, или опосредовать фагоцитоз путем связывания Fc-рецепторов *in vivo*. Антитело также может уничтожать нестимулирующие миелоидные клетки, индуцируя апоптоз или некроз нестимулирующей миелоидной клетки после связывания.

[00195] В некоторых вариантах осуществления блокирование нестимулирующих миелоидных клеток происходит *in vitro* и достигается: а) уничтожением нестимулирующих миелоидных клеток; б) истощением нестимулирующих миелоидных клеток с помощью магнитных гранул; или в) сортировкой нестимулирующих миелоидных клеток с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

[00196] В некоторых вариантах осуществления антитело связано или конъюгировано с эффекторной молекулой.

[00197] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с лекарственным веществом.

Нестимулирующие миелоидные клетки (NSM)

[00198] В настоящем документе представлены способы и композиции для блокирования и/или обнаружения нестимулирующих миелоидных клеток (NSM), включающие использование антитела против TREM2. Также в настоящем документе представлены методы и композиции для нацеливания и/или обнаружения нестимулирующих миелоидных клеток, экспрессирующих белок NSM.

[00199] В настоящем документе предложены способы и композиции для отключения и/или обнаружения нестимулирующих миелоидных клеток, включающие использование антитела, направленного на нечеловеческий гомолог человеческого белка NSM, у данного не являющегося человеком индивидуума.

[00200] Используемые в настоящем документе нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой миелоидные клетки, которые недостаточно эффективны при стимуляции иммунного ответа (например, не так эффективны при стимуляции иммунного ответа по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками). В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки не так эффективны при презентации антигена Т-клеткам или не так эффективны при стимуляции антигенспецифических Т-клеточных ответов по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки могут демонстрировать пониженную способность поглощать, процессировать и/или представлять антигены Т-клетке по сравнению со стимулирующими

миелоидными клетками. Нестимулирующие миелоидные клетки могут обладать пониженной способностью или вообще не обладать способностью повторно праймировать цитотоксические Т-лимфоциты, или в некоторых случаях не могут стимулировать эффективное уничтожение клеток. Нестимулирующие миелоидные клетки могут демонстрировать более низкую экспрессию генов и маркеров клеточной поверхности, участвующих в процессинге антигена, презентации антигена и/или ко-стимуляции антигеном, включая, без ограничения, CD80, CD86, МНСI и МНСII, по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками.

[00201] Нестимулирующие миелоидные клетки, по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками, могут демонстрировать более низкую экспрессию генов, связанных с перекрестной презентацией, ко-стимуляцией и/или стимулирующими цитокинами, включая, 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, IL12b, XCR1, CCR7, CCR2, CCL22, CXCL9 и CCL5, и повышенную экспрессию противовоспалительного цитокина IL-10. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки для дифференцировки и выживания зависят от транскрипционного фактора IRF4 и цитокинов GM-CSF или CSF-1. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки могут способствовать ангиогенезу, секретировав фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и синтазу оксида азота (NOS), и поддерживать клеточный рост, секретировав эпидермальный фактор роста (EGF).

[00202] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой опухолеассоциированные макрофаги (TAM), нейтрофилы, моноциты или дендритные клетки (DC). В некоторых вариантах осуществления нестимулирующая миелоидная клетка не является дендритной клеткой (ДК). В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой нейтрофилы.

[00203] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки различают на основе маркеров, которые они экспрессируют, или маркеров, которые они селективно экспрессируют. Экспрессия маркеров клеточной поверхности может описываться как «+» или «положительная». Отсутствие маркера клеточной поверхности может описываться как «-» или «отрицательная» экспрессия. Экспрессия маркера клеточной поверхности может дополнительно описываться 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 может определяться различными методами, известными в данной области, например иммуноокрашиванием и анализом FACS, или гель-электрофорезом и Вестерн-блоттингом.

[00204] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные

клетки представляют собой дендритные клетки (DC). В некоторых вариантах осуществления дендритные клетки можно отличать по шиповидной или дендритной морфологии. В одном варианте осуществления нестимулирующая дендритная клетка является по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14-, CD11c+ и BDCA1+ (также называемые клетками DC1). В одном варианте осуществления нестимулирующая дендритная клетка не является CD45+, HLA-DR+, CD14-, CD11c+ и BDCA3+ (также называемые клетками DC2). В одном варианте осуществления дендритная клетка, являющаяся CD45+, HLA-DR+, CD14-, CD11c+ и BDCA3+, является стимулирующей миелоидной клеткой.

[00205] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой нестимулирующие макрофаги. В некоторых вариантах осуществления, например у людей, нестимулирующие макрофаги являются по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие макрофаги являются по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, CD11b+. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие макрофаги являются по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, CD11c+. В некоторых вариантах осуществления, например у людей, нестимулирующие макрофаги являются по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, BDCA3-. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие макрофаги являются по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, BDCA3-, CD11b+. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие макрофаги являются по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, BDCA3-, CD11c+. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие макрофаги являются по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, CD11b+ и CD11c+. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие макрофаги являются по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, BDCA3-, CD11b+ и CD11c+.

[00206] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции по настоящему изобретению пригодны для нацеливания на TAM и DC у других млекопитающих, например у мышей. В таких вариантах осуществления мышинные TAM и DC контактируют с антителом к TREM2. В одном варианте осуществления, например у мышей, макрофаг является по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, CD11b^{высокий} и CD11c^{низкий} (также называемые клетками TAM1). В одном варианте осуществления, например у мышей, макрофаги являются по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14+, CD11b^{низкий} и CD11c^{высокий} (также называемые клетками TAM2). Термин «макрофаги CD11b^{высокий}», используемый в данном документе, относится к макрофагам, экспрессирующим высокие уровни CD11b. Термин «макрофаги CD11b^{низкий}», используемый в данном документе, относится к макрофагам, экспрессирующим на своей поверхности такой уровень CD11b, который по существу ниже чем уровень у макрофагов CD11b^{высокий}. Термин «CD11c^{высокий}», используемый в данном документе, относится к макрофагам, экспрессирующим высокие уровни CD11c. Термин «макрофаги CD11c^{низкий}», используемый в данном документе, относится к макрофагам, экспрессирующим на своей

поверхности такой уровень CD11c, который по существу ниже чем уровень у макрофагов Cd11c^{высокий}.

[00207] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки по данному изобретению включают одну или более клеток TAM и DC1.

[00208] В некоторых вариантах осуществления, например у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки по данному изобретению включают одну или более клеток TAM1, TAM2 и DC1. В таких вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные по данному изобретению приводятся в контакт с антителом к TREM2.

[00209] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой миелоидные клетки, являющиеся внутривоопухолевыми.

[00210] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, содержащей стимулирующие миелоидные клетки и нестимулирующие миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, содержащей только нестимулирующие миелоидные клетки. Популяции иммунных клеток по настоящему изобретению могут быть чистыми, гомогенными, гетерогенными, полученными из различных источников (например, больной ткани, здоровой ткани, банка клеток), поддерживаться в первичных клеточных культурах, поддерживаться в иммортализованных культурах и/или поддерживаться в культурах *ex vivo*.

[00211] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой опухолеассоциированные макрофаги.

[00212] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой дендритные клетки.

[00213] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺ и BDCA1⁺. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки включают в себя клетки, являющиеся CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺ и BDCA1⁺. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки состоят из клеток, являющихся CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺ и BDCA1⁺. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки по существу состоят из клеток, являющихся CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺ и BDCA1⁺.

[00214] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, BDCA3⁻. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки включают в себя клетки, являющиеся CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, BDCA3⁻. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки состоят из клеток, являющихся CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, BDCA3⁻. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки по существу состоят из клеток, являющихся CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, BDCA3⁻.

[00215] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b⁺. В некоторых вариантах

осуществления нестимулирующие миелоидные клетки состоят из клеток, являющихся CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, B2CA3⁻, CD11b⁺ и CD11c⁺. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки по существу состоят из клеток, являющихся CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, B2CA3⁻, CD11b⁺ и CD11c⁺.

[00221] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки не являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺ и B2CA3⁺. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки включают в себя клетки, не являющиеся CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺ и B2CA3⁺.

[00222] В некоторых вариантах осуществления, например у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b^{высокий} и CD11c^{низкий}. В некоторых вариантах осуществления, например у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки включают в себя клетки, являющиеся CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b^{высокий} и CD11c^{низкий}. В некоторых вариантах осуществления, например у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки состоят из клеток, являющихся CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b^{высокий} и CD11c^{низкий}. В некоторых вариантах осуществления, например у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки по существу состоят из клеток, являющихся CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b^{высокий} и CD11c^{низкий}. В таких вариантах осуществления нестимулирующие мышечные миелоидные клетки приводятся в контакт с антителом к TREM2.

[00223] В некоторых вариантах осуществления, например у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b^{низкий} и CD11c^{высокий}. В некоторых вариантах осуществления, например у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки включают в себя клетки, являющиеся CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b^{низкий} и CD11c^{высокий}. В некоторых вариантах осуществления, например у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки состоят из клеток, являющихся CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b^{низкий} и CD11c^{высокий}. В некоторых вариантах осуществления, например у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки по существу состоят из клеток, являющихся CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b^{низкий} и CD11c^{высокий}. В таких вариантах осуществления нестимулирующие мышечные миелоидные клетки приводятся в контакт с антителом к TREM2.

[00224] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки находятся в фиброзной ткани. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки находятся в ткани печени.

[00225] В некоторых вариантах осуществления популяция иммунных клеток находится в фиброзной ткани. В некоторых вариантах осуществления популяция иммунных клеток находится в ткани печени.

[00226] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие и стимулирующие миелоидные клетки находятся в фиброзной ткани. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие и стимулирующие миелоидные клетки находятся в ткани печени.

[00227] В некоторых вариантах осуществления биологический образец содержит популяцию иммунных клеток, содержащую нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки.

[00228] Под клетками NSM могут собирательно обозначать клетки DC1, TAM1 и TAM2, присутствующие в опухолевых тканях, которые можно отличать от других типов клеток по экспрессии маркеров клеток NSM. Например, гены и связанные с ними белки, которые экспрессируются или транслируются в большем количестве в клетках NSM, чем в клетках SDC, и могут выступать в качестве маркеров NSM. Типовым маркером NSM является CD11b. Дополнительные типовые маркеры NSM перечислены в таблице A. Клетки NSM на своей клеточной поверхности могут экспрессировать TREM2, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK и TMEM119. в некоторых аспектах клетки NSM не экспрессируют по меньшей мере одно из KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, CLEC9A, BDCA3 и XCR1.

[00229] В одном варианте осуществления клетки NSM экспрессируют один или более маркерных генов NSM, перечисленных в таблице A. В другом варианте осуществления клетки NSM экспрессируют 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или более маркеров NSM, перечисленных в таблице D. В другом варианте осуществления клетки NSM экспрессируют большинство или все маркеры NSM, перечисленные в таблице D. В другом варианте осуществления клетки NSM идентифицируются как экспрессирующие MRC1, MS4A7, C1QC, APOE, C1QB, C1QA и C5AR1.

Таблица D	
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

	<p>APOE</p> <p>CYP4F18</p> <p>TREM2</p> <p>TLR7</p> <p>LILRB4</p>
--	---

Стимулирующие миелоидные клетки

[00230] Используемые в настоящем документе стимулирующие миелоидные клетки (также называемые, в некоторых аспектах, SDC) представляют собой миелоидные клетки, которые эффективны при стимуляции иммунного ответа (например, более эффективны при стимуляции иммунного ответа по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками). В некоторых вариантах осуществления стимулирующие миелоидные клетки эффективны при презентации антигена Т-клеткам или эффективны при стимуляции специфических Т-клеточных ответов по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками. В некоторых вариантах осуществления стимулирующие миелоидные клетки могут демонстрировать увеличенную способность поглощать, процессировать и/или представлять антигены Т-клетке по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками. Стимулирующие миелоидные клетки могут обладать повышенной способностью к повторному праймингу цитотоксических Т-лимфоцитов или, в некоторых случаях, стимулировать эффективное уничтожение клеток по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками. Стимулирующие миелоидные клетки могут демонстрировать более высокую экспрессию генов и маркеров клеточной поверхности, участвующих в процессинге антигена, презентации антигена и/или ко-стимуляции антигеном, включая, без ограничения, CD80, CD86, МНСI и МНСII, по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками.

[00231] Типичные маркеры стимулирующих миелоидных клеток приведены в таблице А. Например, в SDC человека экспрессия Xcr1, Clec9a и BDCA3 (CD141) является маркером идентичности SDC. Следует отметить, что у мышей CD103 также может использоваться в качестве сильного маркера идентичности SDC, хотя он не экспрессируется в SDC человека.

[00232] В одном варианте осуществления SDC представляют собой миелоидные клетки, обладающие идентичностью дендритных клеток и также экспрессирующие один или более маркеров SDC, перечисленных в таблице А. В другом варианте осуществления SDC представляют собой миелоидные клетки, обладающие идентичностью дендритных клеток и также экспрессирующие два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или все маркеры SDC, перечисленные в таблице А. В другом варианте осуществления SDC определяются как миелоидные дендритные клетки, экспрессирующие BDCA3, KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, XCR1 и CLEC9A. Клетки SDC могут экспрессировать по меньшей мере одно из KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, CLEC9A, BDCA3 и XCR1. В некоторых вариантах осуществления SDC не

могут по существу экспрессировать TREM2, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK и/или TMEM119. В некоторых вариантах осуществления SDC не могут по существу экспрессировать C5AR1, LYVE1, ABCC3, MRC1, SIGLEC1, STAB1, C1QB, C1QA, TMEM37, MERTK, C1QC, TMEM119, MS4A7, APOE, CYP4F18, TREM2, TLR7 и/или LILRB4. Для оценки экспрессии маркера, раскрытого в настоящем документе, могут использовать проточную цитометрию и ПЦР, а также другие известные в данной области анализы.

[00233] Стимулирующие миелоидные клетки могут быть представлены CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺ и BDCA3⁺. Стимулирующие миелоидные клетки могут быть представлены CD45⁺, HLA-DR⁺ и BDCA3⁺. Стимулирующие миелоидные клетки могут быть представлены CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻ и BDCA3⁺. Стимулирующие миелоидные клетки могут быть представлены CD45⁺, HLA-DR⁺, CD11c⁺ и BDCA3⁺.

Белки, нуклеотиды и гомологи

[00234] В настоящем документе представлены способы и композиции для блокирования и/или обнаружения нестимулирующих миелоидных клеток человека, экспрессирующих белки NSM. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение направлено на блокирование и/или обнаружение нестимулирующих миелоидных клеток из клеток млекопитающих, не являющихся людьми, которые экспрессируют гомолог белка NSM. Например, белки NSM у мыши могут экспрессировать сравнимый ограниченный профиль экспрессии, как и их гомолог у человека. Таким образом, в одном варианте осуществления, в настоящем документе представлены способы и композиции для блокирования и/или обнаружения нестимулирующих миелоидных клеток мыши, экспрессирующих белок NSM. В настоящем документе также представлены аналогичные способы и композиции для блокирования и/или обнаружения нестимулирующих клеток, полученных любого индивидуума, у которого экспрессируется гомолог белка NSM, с аналогичным профилем экспрессии, клетки которого демонстрируют профиль экспрессии, сопоставимый с таким профилем белка NSM.

[00235] Белки или нуклеотиды NSM могут включать в себя по меньшей мере одно или более из C5AR1, LYVE1, ABCC3, MRC1, SIGLEC1, STAB1, C1QB, C1QA, TMEM37, MERTK, C1QC, TMEM119, MS4A7, APOE, CYP4F18, TREM2, TLR7 и LILRB4, и их гомологи. Белки или нуклеотиды SDC могут включать в себя по меньшей мере одно или более из KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, CLEC9A, BDCA3 и XCR1, и их гомологи. Белки клеточной поверхности NSM могут включать в себя по меньшей мере одно или более из TREM2, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK и TMEM119. Белки клеточной поверхности NSM могут быть мишенью для одного или более антител против TREM2, отдельно или в комбинации. Как правило, NSM положительны в отношении белков или нуклеотидов NSM и отрицательны в отношении белков или нуклеотидов SDC; и наоборот, SDC, как правило, положительны в отношении белков или нуклеотидов SDC и

отрицательны в отношении белков или нуклеотидов NSM.

[00236] Описанные в настоящем документе антитела состоят по меньшей мере из одного полипептида, хотя обычно они состоят из димера HC/LC, т. е. из четырех полипептидов. Описаны также полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, описанные в данном документе. Антитела обычно являются выделенными.

[00237] Используемый в данном документе термин «выделенный» означает агент (например, полипептид или полинуклеотид), который был идентифицирован и отделен и/или выделен из компонентов своего естественного окружения клеточной культуры. Загрязняющие компоненты его естественной среды представляют собой материалы, которые могут помешать диагностическому или терапевтическому применению антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворители. Термин «выделенный» также относится к агенту, который был произведен синтетически, например, в результате вмешательства человека.

[00238] Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимера состоящего из аминокислотных остатков. То есть описание, направленное на полипептид, в равной степени применимо к описанию пептида и описанию белка, и наоборот. Эти термины применимы к встречающимся в природе аминокислотным полимерам, а также к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой не кодируемую в природе аминокислоту. Используемые в данном документе термины охватывают аминокислотные цепи любой длины, включая полноразмерные белки, в которых аминокислотные остатки связаны ковалентными пептидными связями.

[00239] Термин «аминокислота» относится к аминокислотам природного и синтетического происхождения, а также к аналогам аминокислот и имитаторам аминокислот, которые функционируют подобно аминокислотам природного происхождения. Естественно кодируемые аминокислоты представляют собой 20 распространенных аминокислот (аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутамин, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, триптофан, тирозин и валин), а также пирролизин и селеноцистеин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют такую же основную химическую структуру, что и аминокислоты природного происхождения, т. е. атом углерода, связанный с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и группой R, такие как гомосерин, норлейцин, сульфоксид метионина, метилсульфоний метионин. Такие аналоги имеют модифицированные группы R (такие как норлейцин) или модифицированные пептидные скелеты, но сохраняют ту же основную химическую структуру, что и аминокислота природного происхождения. Ссылка на аминокислоту 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,

обладающие свойствами, которые, как известно в данной области техники, являются характерными для аминокислот. Примеры искусственных аминокислот включают, но не ограничиваются ими, α -метиламинокислоты (например, α -метилаланин), D-аминокислоты, гистидиноподобные аминокислоты (например, 2-аминогистидин, β -гидроксигистидин, гомогистидин), аминокислоты, имеющие дополнительный метилен в боковой цепи («гомо» аминокислоты) и аминокислоты, у которых функциональная группа карбоновой кислоты в боковой цепи заменена группой сульфоновой кислоты (например, цистеиновая кислота). Включение искусственных аминокислот, включая синтетические ненативные аминокислоты, замещенные аминокислоты или одну или более D-аминокислот, в описанные в данном документе белки может быть выгодным в ряду различных способов. Пептиды, содержащие D-аминокислоты и т. п. демонстрируют повышенную стабильность *in vitro* или *in vivo* по сравнению с содержащими L-аминокислоты аналогами. Таким образом, создание пептидов и т. д., включающих в себя D-аминокислоты, может быть особенно полезным, когда желательна или требуется более высокая внутриклеточная стабильность. Более конкретно, D-пептиды и т. д. устойчивы к эндогенным пептидазам и протеазам, тем самым обеспечивая улучшенную биодоступность молекулы и продленные периоды существования *in vivo*, когда такие свойства желательны. В дополнение к этому, D-пептиды и т. д. не могут эффективно процессироваться для ограниченной основным комплексом гистосовместимости II класса презентации для Т-хелперных клеток и, поэтому, менее вероятно, индуцируют гуморальные иммунные реакции во всем организме.

[00240] Аминокислоты могут называться в данном документе или своими общеизвестными трехбуквенными обозначениями, или однобуквенными обозначениями, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Аналогично, нуклеотиды могут называться по их обычно принятым однобуквенным кодам.

[00241] В изобретение также включены полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антител. Термин «полинуклеотид» или «нуклеотидная последовательность» предназначен для обозначения последовательного участка из двух или более нуклеотидных молекул. Нуклеотидная последовательность может иметь геномное, кДНК, РНК, полусинтетическое или синтетическое происхождение или любую их комбинацию.

[00242] Термин «нуклеиновая кислота» относится к дезоксирибонуклеотидам, дезоксирибонуклеозидам, рибонуклеозидам или рибонуклеотидам и их полимерам в одноцепочечной или двухцепочечной форме. Если не указано иное, термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые имеют свойства связывания, аналогичные свойствам эталонной нуклеиновой кислоты, и метаболизируются аналогично нуклеотидам природного происхождения. Если специально не установлено иное, термин также относится к аналогам олигонуклеотидов, включая ПНК (пептидонуклеиновую кислоту), аналоги ДНК, используемые в антисмысловой технологии (фосфоротиоаты, фосфоамидаты и т. п.). Если не указано иное, конкретная

последовательность нуклеиновой кислоты также неявно включает ее консервативно модифицированные варианты (включая, но не ограничиваясь, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также явно указанную последовательность. Конкретно, вырожденные замещения кодонов могут достигаться путем создания последовательностей, в которых третья позиция одного или большего числа выбранных (или всех) кодонов замещена на остатки смешанных оснований и/или дезоксиинозина (Batzet 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)).

[00243] «Консервативно модифицированные варианты» относится как аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновых кислот. Что касается конкретных последовательностей нуклеиновых кислот, «консервативно модифицированные варианты» относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или, если нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, - к по существу идентичным последовательностям. Из-за вырожденности генетического кода большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот кодирует любой заданный белок. Например, все кодоны GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором аланин определен с помощью кодона, кодон может быть изменен на любой описанный соответствующий кодон без изменения кодируемого полипептида. Такие вариации нуклеиновой кислоты представляют собой «молчащие вариации», которые представляют собой один из видов консервативно модифицированных вариаций. Каждая последовательность нуклеиновой кислоты в данном документе, которая кодирует полипептид, также описывает все возможные молчащие изменения нуклеиновой кислоты. Специалист в данной области техники поймет, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (кроме AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован для получения функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждый молчащий вариант нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, неявно присутствует в каждой описанной последовательности.

[00244] Что касается аминокислотных последовательностей, специалист в данной области техники поймет, что отдельные замены, делеции или добавления к последовательности нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, которые изменяют, добавляют или удаляют одну аминокислоту или небольшое процентное содержание аминокислот в кодируемой последовательности представляет собой «консервативно модифицированный вариант», причем изменение приводит к делеции аминокислоты, добавлению аминокислоты или замене аминокислоты на химически подобную аминокислоту. Таблицы консервативных замен, содержащие функционально подобные аминокислоты, известны специалистам в данной области техники. Такие консервативно модифицированные варианты дополняют и не исключают описанные в

данном документе полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели.

[00245] Таблицы консервативных замен, содержащие функционально подобные аминокислоты, известны специалистам 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))).

[00246] 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 имеют процент одинаковых аминокислотных остатков или нуклеотидов (т. е. идентичность около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности в указанной области) при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или обозначенной области, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей (или других алгоритмов, доступных специалистам в данной области техники) или ручным выравниванием и визуальным просмотром. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть осуществлено различными способами, находящимися в компетенции специалиста в данной области техники, например с помощью общедоступного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN, MEGALIGN (DNASTAR), CLUSTALW, CLUSTAL OMEGA или MUSCLE. Это определение также относится к комплементарной последовательности для тестовой последовательности. Идентичность может существовать в области длиной не менее 50 аминокислот или нуклеотидов, или в области длиной 75-100 аминокислот или нуклеотидов, или, если не указано иное, во всей последовательности полинуклеотида или полипептида. Полинуклеотид, кодирующий полипептид, описанный в данном документе, включая гомологи из других видов, кроме человека, может быть получен способом, включающим стадии скрининга библиотеки в строгих условиях гибридизации с меченым зондом, имеющим описанную в данном документе полинуклеотидную последовательность или ее фрагмент, и выделение полноразмерной кДНК и геномных клонов, содержащих указанную полинуклеотидную последовательность. Такие методики гибридизации хорошо известны специалистам в данной области техники.

[00247] Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность служит эталонной последовательностью, с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости,

обозначают координаты последовательности и указывают программные параметры алгоритма для работы с последовательностями. Можно использовать программные параметры по умолчанию или указывать альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательностей для исследуемых последовательностей по сравнению с эталонной последовательностью на основании программных параметров.

[00248] Термин «окно сравнения», используемый в данном документе, включает ссылку на сегмент любого из числа смежных позиций, выбранных из группы, состоящей из от 20 до 600, обычно от около 50 до около 200, более обычно от около 100 до около 150, в которых последовательность может быть сравнена с эталонной последовательностью с таким же количеством смежных положений после того, как две последовательности оптимально выровнены. Способы выравнивания последовательностей для сравнения известны специалистам в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно провести, например, с помощью алгоритма поиска локальной гомологии Smith & Waterman, (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482с, с помощью алгоритма гомологического выравнивания по Needleman & Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, с помощью способа поиска подобия по Pearson and Lipman (1988) *Proc. Nat'l. USA* 85: 2444, путем компьютеризированной осуществления этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) или путем ручного выравнивания и визуального просмотра (см., например, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 supplement)).

[00249] Другим примером алгоритма, который подходит для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в 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 выполнения анализов BLAST общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации, доступный в интернете по адресу ncbi.nlm.nih.gov. Параметры W, T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует по умолчанию длину (W) равную 11, математическое ожидание (E) равное 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей в программе BLASTP по умолчанию используют длину слова равную 3, и ожидание (E) равное 10, и матрицу замен BLOSUM62 (см., Henikoff and Henikoff, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915), выравнивания (B) равные 50, ожидание (E) равное 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей. Алгоритм BLAST обычно выполняется с выключенным фильтром «низкой сложности».

[00250] Алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства двух последовательностей (см., например, Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). Одно измерение сходства, проводимое алгоритмом BLAST, заключается в

определении наименьшей суммарной вероятности ($P(N)$), которая указывает на вероятность, при которой совпадение двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей будет происходить случайно. Например, нуклеиновая кислота считается подобной эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее чем около 0,2, или менее чем около 0,01, или менее чем около 0,001.

[00251] Фраза «селективно (или конкретно) гибридизируется с» относится к связыванию, дуплексированию или гибридизации молекулы только с конкретной нуклеотидной последовательностью в жестких условиях гибридизации, когда эта последовательность присутствует в сложной смеси (включая, помимо прочего, общей клеточной или библиотечной ДНК или РНК).

[00252] Фраза «жесткие условия гибридизации» 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 зонд будет гибридизоваться со своей подпоследовательностью-мишенью в сложной смеси нуклеиновых кислот (включая, помимо прочего, общую клеточную или библиотечную ДНК или РНК), но не будет гибридизоваться с другими последовательностями в сложной смеси. Жесткие условия зависят от последовательности и будут разными в разных обстоятельствах. Более длинные последовательности специфически гибридизуются при более высоких температурах. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в 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).

[00253] Используемые в данном документе термины «конструировать, сконструированный, конструирование» включают любые манипуляции с пептидным остовом или посттрансляционные модификации встречающегося в природе или рекомбинантного полипептида или его фрагмента. Конструирование включает модификации аминокислотной последовательности, профиля гликозилирования или группы боковой цепи отдельных аминокислот, а также комбинации этих подходов. Сконструированные белки экспрессируются и продуцируются стандартными методиками молекулярной биологии.

[00254] Под «выделенной молекулой нуклеиновой кислоты или полинуклеотидом» подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которая была выделена из своего природного окружения. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащийся в векторе, считается выделенным. Дополнительные примеры выделенного полинуклеотида включают рекомбинантные полинуклеотиды, содержащиеся в гетерологичных клетках-хозяевах, или очищенные (частично или существенно) полинуклеотиды в растворе. Выделенный полинуклеотид включает молекулу полинуклеотида, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат

молекулу полинуклеотида, но молекула полинуклеотида присутствует вне хромосомы или в хромосомном местоположении, которое отличается от ее естественного хромосомного местоположения. Выделенные молекулы РНК включают транскрипты РНК *in vivo* или *in vitro*, а также формы с положительной и отрицательной цепью и двухцепочечные формы. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе, дополнительно включают такие молекулы, полученные синтетическим путем, например, с помощью ПЦР или химического синтеза. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота в некоторых вариантах осуществления включают регуляторный элемент, такой как промотор, сайт связывания рибосомы или терминатор транскрипции.

[00255] Термин «полимеразная цепная реакция» или «ПЦР» обычно относится к способу амплификации желаемой нуклеотидной последовательности *in vitro*, как описано, например, в патенте США № 4 683 195. Как правило, метод ПЦР включает повторяющиеся циклы синтеза удлинения праймера с использованием олигонуклеотидных праймеров, способных гибридизоваться преимущественно с матричной нуклеиновой кислотой.

[00256] Под нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом, имеющим нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, например, на 95% «идентичную» эталонной нуклеотидной последовательности настоящего изобретения, подразумевается, что нуклеотидная последовательность полинуклеотида идентична эталонной последовательности, за исключением того, что полинуклеотидная последовательность может включать до пяти точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов контрольной нуклеотидной последовательности. Другими словами, для получения полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную эталонной нуклеотидной последовательности, до 5% нуклеотидов в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены другим нуклеотидом, или количество нуклеотидов до 5% всех нуклеотидов в эталонной последовательности могут быть вставлены в эталонную последовательность. Эти изменения эталонной последовательности могут происходить в 5'-или 3'-концевых положениях эталонной нуклеотидной последовательности или в любом месте между этими концевыми положениями, с введением либо индивидуально среди остатков в эталонной последовательности, либо в одной или более смежных группах в эталонной последовательности. На практике, является ли какая-либо конкретная полинуклеотидная последовательность идентичной по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению, можно определять обычным образом, используя известные компьютерные программы, такие как описанные выше для полипептидов (например, ALIGN-2).

[00257] Производное или вариант полипептида, как говорят, имеют общую «гомологию» или являются «гомологичными» с пептидом, если аминокислотные последовательности производного или варианта идентичны по меньшей мере на 50% последовательности длиной 100 аминокислот из исходного пептида. В некоторых

вариантах осуществления производное или вариант по меньшей мере на 75% идентичны либо пептиду, либо фрагменту пептида, имеющего такое же количество аминокислотных остатков, что и производное. В некоторых вариантах осуществления производное или вариант по меньшей мере на 85% идентичны либо пептиду, либо фрагменту пептида, имеющего такое же количество аминокислотных остатков, что и производное. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность производного по меньшей мере на 90% идентична пептиду или фрагменту пептида, имеющего такое же количество аминокислотных остатков, что и производное. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность производного по меньшей мере на 95% идентична пептиду или фрагменту пептида, имеющего такое же количество аминокислотных остатков, что и производное. В некоторых вариантах осуществления производное или вариант по меньшей мере на 99% идентичны либо пептиду, либо фрагменту пептида, имеющего такое же количество аминокислотных остатков, что и производное.

[00258] Термин «модифицированный», используемый в данном документе, относится к любым изменениям, внесенным в данный полипептид, таким как изменения длины полипептида, аминокислотной последовательности, химической структуры, котрансляционной модификации или посттрансляционной модификации полипептида. Формы термина «модифицированный» означают, что обсуждаемые полипептиды необязательно модифицированы, то есть обсуждаемые полипептиды могут быть модифицированными или немодифицированными.

[00259] В некоторых аспектах полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична релевантной (например, полипептидной и/или антительной) аминокислотной последовательности или ее фрагменту, приведенным в таблице(-ах) или номере(-ах) доступа в базы данных, раскрытых в данном документе. В некоторых аспектах выделенные антитело или белок, описанные в данном документе, содержат аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом, который по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичный соответствующей нуклеотидной последовательности или ее фрагменту, приведенным в таблице(-ах) или номере(-ах) доступа в базы данных, раскрытых в данном документе. В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична нуклеотидной последовательности, раскрытой в данном документе, такой как последовательности, приведенные в таблице(-ах) или номере(-ах) доступа в базы данных, раскрытых в данном документе.

Фармацевтические композиции

[00260] В настоящей заявке представлены композиции, включающие антитела, в том числе фармацевтические композиции, включающие любое одно или более антител, описанных в настоящем документе, с одним или более фармацевтически приемлемыми

вспомогательными веществами. В некоторых вариантах осуществления указанная композиция является стерильной. Фармацевтическая композиция, в целом, содержащая эффективное количество антитела.

[00261] Эти композиции могут содержать в дополнение к одному или более антителам, описанным в данном документе, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор или другие вещества, хорошо известные специалистам в данной области техники. Такие вещества должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Точная природа носителя или другого вещества может зависеть от способа введения, например пероральный, внутривенный, кожный или подкожный, назальный, внутримышечный, внутрибрюшинный пути.

[00262] Независимо от полипептида, антитела (например, антитела против TREM2), нуклеиновой кислоты, малой молекулы или другого фармацевтически полезного соединения, которые необходимо вводить человеку, введение предпочтительно осуществляется в «терапевтически эффективном количестве» или «профилактически эффективном количестве» (в зависимости от ситуации, хотя профилактика может считаться терапией), которое является достаточным для достижения пользы для человека. Фактическое вводимое количество, а также скорость и время введения будут зависеть от характера и тяжести заболевания, связанного с агрегацией белков, подлежащего лечению. Назначение лечения, например, принятие решений о дозировке и т. п. входит в обязанности врачей общей практики и других врачей, и, как правило, учитывает нарушение, подлежащее лечению, состояние конкретного пациента, место доставки, способ применения и другие факторы, известные практикующим врачам. Примеры вышеупомянутых техник и протоколов можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980.

[00263] Композиция может назначаться отдельно или в комбинации с другими видами лечения, одновременно или последовательно, в зависимости от патологического состояния, подлежащего лечению.

Способы

Способы получения

[00264] Описанные в данном документе антитела могут получать с использованием рекомбинантных способов и композиций, например, как описано в патенте США № 4 816 567.

[00265] В некоторых вариантах осуществления предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая описанное в данном документе антитело. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела), или аминокислотную последовательность, содержащую VHH однодоменного антитела. В дополнительном варианте осуществления предложен один или более векторов (например, экспрессионных

векторов), содержащих такую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержится в мультицистронном векторе. В дополнительном варианте осуществления предложена клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном таком варианте осуществления клетка-хозяин содержит (например, была трансформирована им): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антигенсвязывающего полипептида, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VH антигенсвязывающей полипептидной конструкции. В одном варианте осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например клеткой яичника китайского хомяка (CHO) или эмбриональной клеткой почки человека (HEK), или лимфоидной клеткой (например, клеткой Y0, NS0, Sp20). В одном варианте осуществления предложен способ получения антитела, причем способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующей антитело, как указано выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и необязательно выделение антитела из клетки-хозяина (или из среды для культивирования клетки-хозяина).

[00266] Для рекомбинантной продукции антитела нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и вставляют в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такая нуклеиновая кислота может быть легко выделена и секвенирована с использованием общепринятых способов (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

[00267] Термин «по существу очищенный» относится к конструкции, описанной в данном документе, или ее варианту, которые могут быть по существу или практически свободны от компонентов, которые обычно сопровождают или взаимодействуют с белком, обнаруживаемым в его естественной среде, т. е. в нативной клетке или же в клетке-хозяине, в случае рекомбинантно продуцированного гетеромультимера, которые в некоторых вариантах осуществления по существу не содержат клеточного материала, термин включает препараты белка, содержащие менее чем около 30%, менее чем около 25%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5%, менее чем около 4%, менее чем около 3%, менее чем около 2% или менее чем около 1% (по сухой массе) загрязняющего белка. Если гетеромультимер или его вариант рекомбинантно продуцируется клетками-хозяевами, то в некоторых вариантах осуществления белок составляет около 30%, около 25%, около 20%, около 15%, около 10%, около 5%, около 4%, около 3%, около 2%, или около 1% или меньше сухой массы клеток. Если гетеромультимер или его вариант рекомбинантно продуцируется клетками-

хозяевами, то в некоторых вариантах осуществления белок присутствует в культуральной среде в концентрации около 5 г/л, около 4 г/л, около 3 г/л, около 2 г/л, около 1 г/л, около 750 мг/л, около 500 мг/л, около 250 мг/л, около 100 мг/л, около 50 мг/л, около 10 мг/л, или около 1 мг/л или менее сухой массы клеток. В некоторых вариантах осуществления термин «по существу очищенный» гетеромультимер, продуцированный описанными в данном документе способами, обладает уровнем чистоты по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, конкретно уровень чистоты составляет по меньшей мере около 75%, 80%, 85%, и конкретнее уровень чистоты составляет по меньшей мере около 90%, уровень чистоты составляет по меньшей мере около 95%, уровень чистоты по меньшей мере составляет около 99% или более, при определении соответствующими методами, такими как электрофорез с ДСН/ПААГ, ОФ-ВЭЖХ, ЭХ и капиллярный электрофорез.

[00268] Клетки-хозяева, подходящие для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитело, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в данном документе.

[00269] Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» или «клетка-хозяин» относится к клетке, которая включает экзогенный полинуклеотид, независимо от примененного для вставки способа, например прямое поглощение, трансдукция, f-спаривание или других способов, известных в данной области техники для создания рекомбинантных клеток-хозяев. Экзогенный полинуклеотид может сохраняться в виде неинтегрированного вектора, например плазмиды, или, альтернативно, может быть интегрирован в геном хозяина. Клетки-хозяева могут включать CHO, производные CHO, NS0, Sp2O, CV-1, VERO-76, HeLa, HepG2, Per.C6 или ВНК.

[00270] Используемый в данном документе термин «эукариот» относится к организмам, принадлежащим филогенетическому домену Eucarya, таким как животные (включающие, но ограничивающиеся ими, млекопитающие, насекомые, рептилии, птицы и т. д.), реснитчатые, растения (включающие, но ограничивающиеся ими, однодольные, двудольные, водоросли и т. д.), грибы, дрожжи, жгутиковые, микроспоридии, протисты и т. д.

[00271] Используемый в данном документе термин «прокариот» относится к прокариотическим организмам. Например, неэукариотический организм может принадлежать филогенетическому домену Eubacteria (включая, но ограничиваясь *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* и т. п.) или филогенетическому домену Archaea (включая, но ограничиваясь, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, такой как *Haloferax volcanii* и *Halobacterium species NRC-1*, *Archaeoglobus fui gidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuryopyrum pernix* и т. п.).

[00272] Например, антитела могут продуцироваться в бактериях, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не нужны. Для экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, патенты США № 5 648 237, 5 789 199 и 5 840 523. (См. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (ВКС Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, описывающую экспрессию фрагментов антител в *E. coli*). После экспрессии антитело может быть выделено из биомассы бактериальных клеток в растворимую фракцию и может быть дополнительно очищено.

[00273] Помимо прокариот, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, являются эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, чьи метаболические пути гликозилирования были «гуманизированы», что приводит к продукции антител с частично или полностью человеческим профилем гликозилирования. См. Gemgross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) и Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

[00274] Клетки-хозяева, подходящие для экспрессии гликозилированных антител, также можно получать из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, которые можно использовать в сочетании с клетками насекомых, особенно для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

[00275] В качестве хозяев также можно использовать культуры растительных клеток. Например, в патентах США № 5 959 177, 6 040 498, 6 420 548, 7 125 978 и 6 417 429 (описана технология PLANTIBODIES™ для продукции антител в трансгенных растениях).

[00276] Клетки позвоночных могут также использоваться в качестве хозяев. Например, могут быть применяться клеточные линии млекопитающих, которые приспособлены для роста в суспензии. К другим примерам используемых линий клеток млекопитающих в качестве клеток-хозяев относятся линия клеток CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7); линия эмбриональных клеток почки человека (293 или клетки 293, которые описаны, например, в Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (ВНК); клетки Сертоли мыши (клетки ТМ4, как описано, например, в Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK; клетки печени крысы линии buffalo (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, как описано, например, в Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другие пригодные линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR⁻CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и линии миеломных клеток, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Для обзора некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продукции

антигенсвязывающих конструкций, см., например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003).

[00277] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе антитела продуцируют в стабильных клетках млекопитающих способом, включающим: трансфекцию по меньшей мере одной стабильной клетки млекопитающих с нуклеиновой кислотой, кодирующей антитело в предварительно заданном соотношении, и экспрессию данной нуклеиновой кислоты в по меньшей мере одной клетке млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления предварительно заданное соотношение нуклеиновой кислоты определяют в экспериментах по временной трансфекции для определения относительного соотношения входящих нуклеиновых кислот, которое приводит к наибольшему процентному содержанию антитела в экспрессированном продукте.

[00278] В некоторых вариантах осуществления предложен способ продуцирования антитела в стабильных клетках млекопитающих, как описано в данном документе, в котором продукт экспрессии по меньшей мере одной стабильной клетки млекопитающего содержит большой процент желаемого гликозилированного антитела по сравнению с мономерными полипептидами тяжелой или легкой цепи или другими антителами.

[00279] В некоторых вариантах осуществления способ получения гликозилированного антитела в стабильных клетках млекопитающих, описанных в данном документе, включает в себя идентификацию и очистку желаемого гликозилированного антитела. В некоторых вариантах осуществления указанную идентификацию выполняют одним или обоими методами жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии.

[00280] При необходимости антитела могут быть очищены или выделены после экспрессии. Белки могут быть выделены или очищены различными способами, известными специалистам в данной области. Стандартные методы очистки включают хроматографические методы, в том числе использующие ионный обмен, гидрофобное взаимодействие, аффинность, эксклюзионную или гель-фильтрацию, а также обращенно-фазовую хроматографию, проводимую при атмосферном давлении или при высоком давлении с использованием таких систем, как FPLC и ВЭЖХ. Методы очистки также включают электрофоретические, иммунологические методики, методики осаждения, диализа и хроматофокусирования. Применимы также методики ультрафильтрации и диафильтрации в сочетании с концентрированием белков. Как хорошо известно специалистам в данной области, множество природных белков связывают Fc и антитела, и эти белки могут найти применение в настоящем изобретении для очистки антител. Например, бактериальные белки A и G связываются с Fc-областью. Аналогичным образом бактериальный белок L связывается с Fab-областью некоторых антител. Очистка часто может быть осуществлена с помощью конкретного партнера по слиянию. Например, антитела можно очищать, применяя смолу с глутатионом, если применяется GST-гибридизация, аффинная хроматография с Ni^{+2} , если применяется His-маркер, или иммобилизованное антитело антифлаг, если применяется flag-маркер. Для получения

общего руководства по подходящим методикам очистки, см., например, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994, включенную в полном объеме посредством ссылки. Необходимая степень очистки будет варьироваться в зависимости от применения антител. В некоторых случаях очистка не требуется.

[00281] В некоторых вариантах осуществления антитела очищают с использованием анионообменной хроматографии, включая, но не ограничиваясь ими, хроматографию на колонках с Q-сефарозой, DEAE-сефарозой, poros HQ, poros DEAF, Toyopearl Q, Toyopearl QAE, Toyopearl DEAE, Resource/Source Q и DEAE, Fractogel Q и DEAE.

[00282] В конкретных вариантах осуществления описанные в данном документе белки очищают с использованием катионообменной хроматографии, включая, но не ограничиваясь ими, колонки с SP-сефарозой, CM-сефарозой, poros HS, poros CM, Toyopearl SP, Toyopearl CM, Resource/Source S и CM, Fractogel S и CM, и их эквиваленты и аналоги.

[00283] Кроме того, описанные в данном документе антитела могут быть химически синтезированы с использованием методик, известных в данной области техники (например, см. Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman & Co., N.Y and Hunkapiller et al., *Nature*, 310:105-111 (1984)). Например, полипептид, соответствующий фрагменту полипептида, можно синтезировать с использованием синтезатора пептидов. Кроме того, при желании неклассические аминокислоты или химические аналоги аминокислот могут быть введены в качестве замены или добавления в полипептидную последовательность. Неклассические аминокислоты включают, но не ограничиваются ими, D-изомеры обычных аминокислот, 2,4-диаминомасляную кислоту, альфа-аминоизомасляную кислоту, 4-аминомасляную кислоту, Abu, 2-аминомасляную кислоту, g-Abu, e-Ahx, 6-аминогексановую кислоту, Aib, 2-аминоизомасляную кислоту, 3-аминопропионовую кислоту, орнитин, норлейцин, норвалин, гидроксипролин, саркозин, цитруллин, гомоцитруллин, цистеиновую кислоту, трет-бутилглицин, трет-бутилаланин, фенилглицин, циклогексилаланин, аланин, фтораминокислоты, сконструированные аминокислоты, такие как метиламинокислоты, C-метиламинокислоты, N-метиламинокислоты и, в целом, аналоги аминокислот. Кроме того, аминокислоты могут быть D (правовращающими) или L (левовращающими).

Способы применения

[00284] В одном аспекте, в настоящей заявке предлагаются способы лечения фиброзирующего заболевания или состояния у субъекта, включающие введение выделенного антитела, которое связывается с человеческим TREM2 (SEQ ID NO:15) и конкурирует за связывание с мышинным TREM2 (SEQ ID NO:17) с антителом 37017 (SEQ ID NO: 31 и 32); или способ уничтожения, блокирования или истощения TREM2+ миелоидных клеток субъекта, страдающего фиброзирующим заболеванием или состоянием, включающий приведение в контакт миелоидных клеток с выделенным антителом, которое связывается с человеческим TREM2 (SEQ ID NO:15) и необязательно

конкурирует за связывание с мышинным TREM2 (SEQ ID NO:17) с антителом 37017 (SEQ ID NO: 31 и 32).

[00285] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит:

CDR-H1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, 37, 43, 44, 45 или 46,

CDR-H2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10, 47, 48, 49 или 50,

CDR-H3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, 39, 51 или 52,

CDR-L1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, 40, 53 или 54,

CDR-L2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13 или 55,
и

CDR-L3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14, 42 или 57.

[00286] В некоторых вариантах осуществления введение антитела TREM2 уменьшает фиброз у субъекта по сравнению с введением изотипного контрольного антитела. Например, введение антитела TREM2 может уменьшать фиброз у субъекта по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз или более, или в 1-2 раза, 2-3 раза, 3-4 раза, 4-5 раз, 5-6 раз, 6-7 раз, 7-8 раз, 8-9 раз, 9-10 раз, 10-20 раз, 20-30 раз, 30-40 раз, 40-50 раз, 50-60 раз, 60-70 раз, 70-80 раз, 80-90 раз, 90-100 раз или более по сравнению с введением изотипного контрольного антитела. В других примерах введение антитела TREM2 может уменьшать фиброз у субъекта по меньшей мере на около 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% или более, или в пределах 1-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, или 90-100%, 100-200%, 200-300%, 300-400%, 400-500%, 500-600%, 600-700%, 700-800%, 800-900%, 900-1000% или более, по сравнению с введением изотипного контрольного антитела. Уменьшение фиброза могут определять с помощью биопсии печени или любого неинвазивного анализа, известного специалистам в данной области, например анализа сыворотки крови на биомаркеры печени или визуализации. Такие неинвазивные анализы описаны в Papastergiou et al, *Non-invasive assessment of liver fibrosis*, *Ann Gastroenterol.* 2012; 25(3): 218-231, тем самой включенной в полном объеме посредством ссылки.

[00287] В некоторых аспектах в настоящем документе предложены способы лечения фиброза у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение эффективного количества средства для связывания с экспрессирующими TREM2 (TREM2+) клетками и с целью их истощения, блокирования или уничтожения, и при этом количество средства для связывания с TREM2+ клетками и с целью истощения, блокирования или уничтожения эффективно для стимулирования апоптоза в TREM2+ клетке, тем самым истощая,

блокируя или уничтожая клетку и тем самым обеспечивая лечение фиброза у субъекта. В некоторых аспектах в данном документе предложены способы лечения фиброза у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение эффективного количества ингибитора TREM2, причем ингибитор представляет собой средство для связывания TREM2, и при этом TREM2, с которым связывается ингибитор, включает в себя последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

[00288] В одном аспекте в настоящей заявке предлагаются способы приведения в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом против TREM2, например человеческим антителом, что приводит к блокированию нестимулирующих миелоидных клеток.

[00289] В другом аспекте в настоящей заявке предлагаются способы приведения в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с мышинным антителом против TREM2, что приводит к блокированию нестимулирующих миелоидных клеток.

[00290] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие клетки представляют собой одну или более из клеток DC1 и клеток TAM.

[00291] В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке предлагаются способы блокирования нестимулирующих миелоидных клеток, включающие приведение в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом к TREM2, тем самым обеспечивая уничтожение нестимулирующих миелоидных клеток. Блокирование означает частичное или полное прекращение функционирования клеток. В некоторых вариантах осуществления блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к индуцированию остановки роста данных клеток. В некоторых вариантах осуществления блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к апоптозу данных клеток. В некоторых вариантах осуществления блокирование нестимулирующих клеток приводит к лизису данных клеток, например, с помощью комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ) или антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). В некоторых вариантах осуществления блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к апоптозу данных клеток. В некоторых вариантах осуществления блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к индуцированию остановки роста данных клеток. В некоторых вариантах осуществления блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к инактивации данных клеток. В некоторых вариантах осуществления блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к нейтрализации активности белка TREM2 в данных клетках. В некоторых вариантах осуществления блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к ослаблению пролиферации данных клеток. В некоторых вариантах осуществления блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к дифференцировке данных клеток. В некоторых вариантах осуществления блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к снижению способности клеток действовать в качестве ингибирующих антигенпрезентирующих клеток или к повышению способности клеток действовать в качестве активирующих антигенпрезентирующих клеток. В некоторых

вариантах осуществления блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к нарушению локализации данных клеток внутри опухолевой ткани или опухолевого микроокружения (ТМЕ). В некоторых вариантах осуществления блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к изменению пространственной организации данных клеток внутри опухолевой ткани или опухолевого микроокружения. В некоторых вариантах осуществления блокирование нестимулирующих миелоидных клеток приводит к изменению временной экспрессии данных клеток внутри опухолевой ткани или ТМЕ. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает удаление нестимулирующих миелоидных клеток.

[00292] В любом и всех аспектах блокирование нестимулирующих миелоидных клеток, как описано в настоящем документе, любое увеличение или уменьшение или изменение аспекта характеристики (характеристик) или функции(-й) сравнивается с клеткой, не приведенной в контакт с антителом против TREM2.

[00293] В другом аспекте в настоящей заявке предложены способы приведения в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом против TREM2, что приводит к модуляции функции нестимулирующих миелоидных клеток. Модуляция может проявляться одним или более из следующих. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие клетки представляют собой одну или более из клеток DC1, клеток TAM1 и клеток TAM2. В некоторых вариантах осуществления модуляция функции приводит к блокированию нестимулирующих миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления модуляция функции нестимулирующих миелоидных клеток приводит к увеличению способности клеток стимулировать как нативные, так и активированные CD8+ Т-клетки, например, путем увеличения способности нестимулирующих клеток перекрестно представлять антиген на молекулах МНСI наивным CD8+ Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления модуляция повышает стимулирующую Т-клетки функцию нестимулирующих миелоидных клеток, включая, например, способность клеток запускать передачу сигнала Т-клеточного рецептора (TCR), пролиферацию Т-клеток или продукцию Т-клеточных цитокинов. В одном варианте осуществления уменьшается выживаемость нестимулирующей клетки или уменьшается пролиферация нестимулирующей клетки. В одном варианте осуществления увеличивается соотношение стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам.

[00294] В любом и всех аспектах уменьшение функции нестимулирующих миелоидных клеток, как описано в настоящем документе, любое увеличение или уменьшение или изменение аспекта характеристики (характеристик) или функции(-й) сравнивается с клеткой, не приведенной в контакт с антителом против TREM2.

[00295] В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке предлагаются способы уничтожения (также называемые индуцированием клеточной смерти) нестимулирующих миелоидных клеток, включающие приведение в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом против TREM2, что тем самым приводит к уничтожению нестимулирующих миелоидных клеток. В некоторых вариантах

осуществления изобретения уничтожение увеличивается по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками, с которыми не контактировало антитело против TREM2. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт индуцирует апоптоз у нестимулирующих миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт индуцирует апоптоз у нестимулирующих миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, состоящей из нестимулирующих миелоидных клеток и стимулирующих миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает удаление нестимулирующих миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки уничтожаются 10%-80% клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения уничтожается по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% клеток.

[00296] В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке предлагаются способы увеличения соотношения стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам в популяции иммунных клеток, включающей стимулирующие миелоидные клетки и нестимулирующие миелоидные клетки, включая приведение в контакт популяции иммунных клеток с антителом против TREM2. В некоторых вариантах осуществления соотношение увеличено по сравнению с популяцией клеток, с которыми не контактировало антитело против TREM2. В одном варианте осуществления увеличено соотношение клеток DC2 к клеткам DC1. В одном варианте осуществления увеличено соотношение клеток DC2 к клеткам TAM1. В одном варианте осуществления увеличено соотношение клеток DC2 к клеткам TAM2. В одном варианте осуществления увеличено соотношение клеток DC2 к клеткам TAM1+TAM2. В одном варианте осуществления увеличено соотношение клеток DC2 к клеткам TAM1+DC1. В одном варианте осуществления увеличено соотношение клеток DC2 к клеткам DC1+TAM2. В одном варианте осуществления увеличено соотношение клеток DC2 к клеткам DC1+TAM1+TAM2. В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение увеличено по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 80%, 90% или 100%.

[00297] В некоторых вариантах осуществления соотношение стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам до приведения в контакт находится в диапазоне от 0,001:1 до 0,1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам после приведения в контакт находится в диапазоне от 0,1:1 до 100:1.

[00298] В некоторых вариантах осуществления изобретения количество нестимулирующих миелоидных клеток уменьшается. В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки представляют собой клетки DC2. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки уничтожаются, например, путем некроза или апоптоза. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки индуцируют на достижение остановки роста. В

некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки перестают пролиферировать. В некоторых вариантах осуществления изменяется пространственная локализация нестимулирующих миелоидных клеток, и в определенной зоне TME увеличивается соотношение. В некоторых вариантах осуществления изменяется временная экспрессия нестимулирующих миелоидных клеток, и в определенной зоне увеличивается соотношение.

[00299] В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляют *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт происходит *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт происходит *in vivo* у человека. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляется путем введения антитела против TREM2. В некоторых вариантах осуществления фиброзирующее заболевание не является онкологическим.

[00300] В некоторых вариантах осуществления индивидуум, получающий антитело (например, человек), страдает фиброзирующим заболеванием, например заболеванием печени. В некоторых вариантах осуществления заболевание печени представляет собой фиброз, неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП), неалкогольный жировой гепатит (НАЖГ), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), цирроз или рак печени. В некоторых вариантах осуществления заболевание печени является жировой болезнью печени, такой как жировая болезнь печени, возникающая вследствие гепатита, жировая болезнь печени, возникающая вследствие ожирения, жировая болезнь печени, возникающая вследствие диабета, жировая болезнь печени, возникающая вследствие инсулинорезистентности, жировая болезнь печени, возникающая вследствие гипертриглицеридемии, абеталипопротеинемии, заболеваний накопления гликогена, болезни Вебера - Крисчена, болезни Вольмана, острой жировой дистрофии печени беременных и липодистрофии.

[00301] НАСГ характеризуется наличием воспаления, гепатоцеллюлярного повреждения и различных степеней фиброза. Механизмы, лежащие в основе патогенеза НАСГ, до конца не установлены. Было показано, что макрофаги печени контролируют как прогрессирование НАСГ, так и восстановление после нее. Активация макрофагов печени во время прогрессирования НАСГ - это динамический процесс, зависящий от различных стимулов, таких как цитокины, липидные метаболиты и другие сигнальные молекулы. В сочетании с окружающими клетками макрофаги печени могут запускать реакцию воспаления, фиброгенез, ремоделирование сосудов и так далее. Известно, что в развитии НАСГ участвуют межклеточные сигналы между макрофагами печени и окружающими клетками. Макрофаги печени являются привлекательной мишенью для лечения НАСГ.

[00302] Экспрессия TREM2 оказалась тесно связана с тяжестью НАСГ: чем сильнее печень поражена заболеванием, тем больше TREM2 вырабатывали клетки. Макрофаги присутствовали в значительно большем количестве в пораженной печени и активнее вырабатывали TREM2. В печени и мышей, и людей с НАСГ была обнаружена специфическая для НАСГ популяция макрофагов, характеризующаяся высокой

экспрессией TREM2 и названная НАСГ-ассоциированными макрофагами (NAM). В фиброзной нише печени человека с НАСГ также была выявлена патогенная субпопуляция TREM2+CD9+ макрофагов, названная рубцово-ассоциированными макрофагами (SAMac). Увеличение количества SAMac положительно коррелировало со степенью фиброза печени, вызванного НАСГ.

[00303] В некоторых вариантах осуществления способы лечения фиброзирующего заболевания у индивидуума, включающие введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело против TREM2.

[00304] В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение или терапия фиброзирующего заболевания у человека включает одно или более из такого как: (1) предотвращение или снижение риска развития фиброзирующего заболевания, т. е. предотвращение развития клинических симптомов фиброзирующего заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к фиброзирующему заболеванию, но еще не испытывает или не проявляет симптомы фиброзирующего заболевания (т. е., профилактика); (2) ингибирование фиброзирующего заболевания, т. е. остановка или уменьшение развития фиброзирующего заболевания или ее клинических симптомов; и/или (3) облегчение фиброзирующего заболевания, т. е. способствование регрессу, обращению или ослаблению фиброзирующего заболевания или уменьшение количества, частоты, продолжительности или тяжести ее клинических симптомов.

[00305] В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение или терапия болезни печени, такой как НАЖБП или НАСГ, у человека включает одно или более из такого как: (1) предотвращение или снижение риска развития НАЖБП или НАСГ, т. е. предотвращение развития клинических симптомов НАЖБП или НАСГ у субъекта, который может быть предрасположен к НАЖБП или НАСГ, но еще не испытывает или не проявляет симптомы НАЖБП или НАСГ (т. е., профилактика); (2) ингибирование НАЖБП или НАСГ, т. е. остановка или уменьшение развития НАЖБП или НАСГ или ее клинических симптомов; и (3) облегчение НАЖБП или НАСГ, т. е. способствование регрессу, обращению или ослаблению НАЖБП или НАСГ или уменьшение количества, частоты, продолжительности или тяжести ее клинических симптомов.

[00306] Терапевтически эффективное количество для конкретного субъекта варьируется в зависимости от состояния здоровья и физического состояния субъекта, подлежащего лечению, степени НАЖБП или НАСГ, оценки медицинской ситуации и других соответствующих факторов. Ожидается, что терапевтически эффективное количество будет находиться в относительно широком диапазоне, который может быть определен в ходе обычных исследований. Специалист в области лечения фиброзирующего заболевания, сможет определить терапевтически эффективное количество для конкретной стадии заболевания, чтобы получить терапевтически эффективное количество без чрезмерных экспериментов и полагаясь на личные знания и раскрытие данной заявки.

[00307] В другом аспекте в данном изобретении предложены способы лечения связанного с иммунной системой патологического состояния у индивидуума,

включающие введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело против TREM2. В другом аспекте в данном изобретении предложены способы усиления иммунного ответа у индивидуума, включающие введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело против TREM2. В некоторых вариантах осуществления изобретения эти способы применяются в комбинации с другими сопутствующими методами лечения, такими как терапия с блокадой PDL, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против PD-L2, терапия с блокадой CTLA4, антитела против CTLA-4, генерализованная терапия с блокадой контрольных точек, при которой блокируются ингибирующие молекулы на Т-клетках, адоптивная Т-клеточная терапия, CAR Т-клеточная терапия, применение дендритных клеток или другие клеточные методы лечения, а также обычные химиотерапевтические средства.

[00308] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня экспрессии белка TREM2 в биологическом образце, полученном от индивидуума. В некоторых вариантах осуществления биологический образец включает в себя, но не ограничивается этим, жидкость организма, образец ткани, образец органа, мочу, кал, кровь, слюну, СМЖ и любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления биологический образец получен из ткани. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии включает уровень экспрессии мРНК для мРНК, кодирующей белок TREM2. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии белка TREM2 включает уровень экспрессии белка NSM. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии белка TREM2 определяют в образце с помощью метода, выбранного из группы, состоящей из FACS, вестерн-блота, ELISA, иммунопреципитации, иммуногистохимии, иммунофлуоресценции, радиоиммуноанализа, дот-блоттинга, методов иммунологического выявления, ВЭЖХ, поверхностного плазмонного резонанса, оптической спектроскопии, масс-спектрометрии, ВЭЖХ, кПЦР, ОТ-кПЦР, мультиплексной кПЦР или ОТ-кПЦР, РНК-секвенирования, анализа с использованием микрочипов, SAGE, методики MassARRAY, FISH, и их комбинаций.

[00309] В другом аспекте в настоящей заявке предлагаются способы определения наличия или отсутствия нестимулирующих миелоидных клеток, в целом, или определения наличия 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 TREM2; и количественное определение количества нестимулирующих миелоидных клеток. В другом аспекте в настоящей заявке предлагаются методы определения наличия или отсутствия нестимулирующих миелоидных клеток, включающие: приведение в контакт популяции иммунных клеток, содержащей нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки, с антителом против TREM2; обнаружение комплекса или фрагмента, указывающего на связывание антитела с клеткой, и необязательно количественное определение числа

нестимулирующих миелоидных клеток в популяции. В другом аспекте предложены методы 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 TREM2; количественное определение числа стимулирующих миелоидных клеток и нестимулирующих миелоидных клеток; и определение относительного соотношения нестимулирующих миелоидных клеток к стимулирующим миелоидным клеткам.

[00310] В описанных в данном документе вариантах осуществления для обнаружения и/или количественного определения антитело против TREM2 связывается с белком TREM2, но не обязательно должно влиять на биологический ответ, такой как АЗКЦ, хотя оно может влиять на биологический ответ.

[00311] В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложены методы идентификации индивидуума, который может отвечать на иммунотерапию (например, антителом против TREM2) для лечения связанного с иммунной системой патологического состояния, включающий: определение уровня экспрессии белка TREM2 в биологическом образце, полученном от индивидуума; и определение на основании уровня экспрессии белка TREM2 способности индивидуума отвечать на иммунотерапию, причем повышенный уровень белка TREM2 у индивидуума по сравнению с его уровнем у здорового индивидуума указывает на то, что данный индивидуум может отвечать на иммунотерапию. В некоторых вариантах осуществления эти методы также могут использоваться для диагностики у индивидуума связанного с иммунной системой патологического состояния и основаны на уровне экспрессии белка TREM2, причем повышенный уровень белка TREM2 у индивидуума по сравнению с его уровнем у здорового индивидуума указывает на то, что индивидуум страдает от фиброзирующего заболевания. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии включает уровень экспрессии мРНК для мРНК, кодирующей белок TREM2. В других вариантах осуществления уровень экспрессии белка TREM2 включает в себя белковый уровень экспрессии белка TREM2. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии белка TREM2 определяют в образце с помощью метода, выбранного из группы, состоящей из FACS, вестерн-блота, ELISA, иммунопреципитации, иммуногистохимии, иммунофлуоресценции, радиоиммуноанализа, дот-блоттинга, методов иммунологического выявления, ВЭЖХ, поверхностного плазмонного резонанса, оптической спектроскопии, масс-спектрометрии, ВЭЖХ, кПЦР, ОТ-кПЦР, мультиплексной кПЦР или ОТ-кПЦР, РНК-секвенирования, анализа с использованием микрочипов, SAGE, методики MassARRAY, FISH, и их комбинаций. В этих вариантах осуществления антитело против TREM2 связывается с белком TREM2, но не обязательно должно влиять на биологический ответ, такой как АЗКЦ. В некоторых вариантах осуществления биологический образец получен из ткани. В некоторых вариантах осуществления биологический образец включает в себя, но не ограничивается этим,

жидкость организма, образец ткани, образец органа, мочу, кал, кровь, слюну, СМЖ и любую их комбинацию.

[00312] В настоящем документе также раскрыт способ усиления иммунного ответа субъекта или повышения эффективности схем иммунотерапии. В целом, лечение, которое увеличивает количество SDC, улучшит исход лечения субъекта, такие как безрецидивная выживаемость, и повысит эффективность схем иммунотерапии. Лечение может увеличивать относительное или абсолютное количество клеток SDC у субъекта. Лечение может уменьшать относительное или абсолютное количество клеток NSM у субъекта.

[00313] Примеры способов общей стратегии лечения включают увеличение количества SDC путем системного введения Flt3L. Другой способ заключается в обработке аутологичного костного мозга или клеток крови субъекта с помощью Flt3L с одновременным блокированием CSF1. Может также использоваться экспрессия, например с помощью ретровируса, таких факторов транскрипции SDC, как IRF8, Mycl1 или BATF3, или ZBTB46 в популяциях предшественников костного мозга или клеток крови для стимулирования развития SDC. Другая стратегия лечения включает в себя систематическую элиминацию клеток NSM при селективном сохранении SDC. Это может приводить к общему благоприятному изменению соотношения этих популяций. Элиминация клеток NSM может достигаться любым способом, включающим введение антител против поверхностных белков TREM2.

[00314] В некоторых вариантах осуществления усиливающие SDC терапевтические подходы применяются в качестве терапевтического лечения для лучшего вовлечения врожденной иммунной системы субъекта в противодействие и устранение указанного заболевания. В другом варианте осуществления усиливающие SDC терапевтические подходы по данному изобретению применяются в комбинации с терапевтическим лечением, таким как иммунотерапия (до, одновременно или после иммунотерапии), причем усиливающий SDC терапевтический подход действует как вспомогательное или адьювантное средство для повышения эффективности терапевтического лечения.

Способы введения

[00315] В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы пригодны для лечения связанного с иммунитетом патологического состояния у индивидуума. В одном варианте осуществления индивидуум является человеком, и антитело - антителом к TREM2. В другом варианте осуществления индивидуумом является мышь, и антитело - антителом к TREM2.

[00316] Любое фиброзирующее заболевание можно лечить с помощью антител предложенных в данном документе антител. Заболевание может представлять собой фиброз, неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), цирроз или рак печени, известные в данной медицинской области. В некоторых вариантах осуществления изобретения связанное с иммунной системой патологическое состояние может быть фиброзирующим заболеванием, например болезнью печени.

[00317] В некоторых вариантах осуществления связанное с иммунной системой

патологическое состояние ассоциируется с экспрессией белка TREM2 на нестимулирующих миелоидных клетках (у человека) или с экспрессией гомолога белка TREM2 у биологических видов, не являющихся человеком. В некоторых вариантах осуществления связанное с иммунной системой патологическое состояние представляет собой связанное с иммунной системой патологическое состояние, ассоциированное со сверхэкспрессией белка TREM2 на нестимулирующих миелоидных клетках по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками. В некоторых вариантах осуществления сверхэкспрессия мРНК TREM2 или белка TREM2 по меньшей мере примерно в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 25 раз, 50 раз или 100 раз выше по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками.

[00318] В некоторых вариантах осуществления лечение усиливает иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.

[00319] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело вводят внутривенно, внутримышечно, подкожно, местно, перорально, трансдермально, внутрибрюшинно, внутриорбитально, путем имплантации, ингаляции, интратекально, внутрижелудочно или интраназально. Для лечения заболевания можно вводить эффективное количество антитела против TREM2. Подходящую дозу антитела против TREM2 можно определять на основании типа подлежащего лечению заболевания, типа антитела против TREM2, степени тяжести и течения заболевания, клинического состояния индивидуума, истории его болезни и ответа на лечение, а также по усмотрению лечащего врача.

Комбинированные терапии

[00320] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, вводят с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим агентом. Любой подходящий дополнительный терапевтический агент можно вводить с антителом, предложенным в данном документе.

[00321] Для лечения фиброзирующего заболевания антитело против TREM2 можно комбинировать с одним или более дополнительными терапевтическими агентами.

Наборы и готовые изделия

[00322] В настоящей заявке представлены наборы, включающие любую одну или более композиций антител, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно содержат компонент, выбранный из вторичных антител, реагентов для иммуногистохимического анализа, фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества, инструкции по применению и любой их комбинации. В одном конкретном варианте осуществления набор содержит фармацевтическую композицию, включающую любую одну или более композиций антител, описанных в настоящем документе, с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

[00323] В настоящей заявке также представлены готовые изделия, содержащие любую из композиций или наборов антител, описанных в настоящем документе. Примеры готовых изделий включают в себя флаконы (в том числе герметичные флаконы).

ПРИМЕРЫ

[00324] Ниже приведены примеры конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения. Примеры предложены исключительно с иллюстративными целями и никоим образом не подразумевают ограничения объема настоящего изобретения. Были приняты меры для того, чтобы сохранить точность в отношении используемых чисел (например, количеств, значений температуры и т. д.), однако, безусловно, следует допускать возможность некоторых экспериментальных ошибок и отклонений.

[00325] В практической реализации по настоящему изобретению будут использоваться, если не указано иное, стандартные методы химии белков, биохимии, методы рекомбинантной ДНК и фармакологии, доступные специалистам в данной области техники. Такие методики подробно описаны в литературе. См., например, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.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. Антитела против TREM2.

[00326] Антитела против TREM2 были получены в соответствии с описанием в USPN 10 836 828, которое включено в настоящий документ посредством ссылки для всех целей. В таблице 1A показаны последовательности VL, VH, а также полные последовательности тяжелой и легкой цепей гуманизированных вариантов антител против TREM2. Антитело 37017 представляет собой исходный гуманизированный клон, на основе которого, путем дополнительных мутаций, были созданы другие гуманизированные версии. В таблице 1B показаны последовательности CDR (см. вебсайт Dr. Andrew C. R. Martin www.bioinf.org.uk/abs/ для получения таблицы сравнения определений CDR).

Таблица 1A

SEQ ID NO	Название	Последовательность
1	37012_VH	EVQLLESGLLVQPGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPG KGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGLVTVSS
2	37012_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNNLAWYQQKPGKA

		PKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ RIYNSPWTFGQGTKLEIK
3	37013_ VH	EVQLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPG KGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGLVTVSS
4	37013_ VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCKASQNVGNLAWYQQKPGK APKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQRIYNSPWTFGQGTKLELK
5	37014_ VH	EVQLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPG KGLEWVASLTNSGGSTYYADSVKGRFTLSRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGLVTVSS
6	37014_ VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNLAWYQQKPGKA PKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ RIYNSPWTFGQGTKLEIK
7	37017_ VH	EVQLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPG KGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKEWAGSGYFDYWGQGLVTVSS
8	37017_ VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNLAWYQQKPGKA PKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ RIYNSPWTFGQGTKLEIK
25	Полное 37012_ H	EVQLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPG KGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
26	Полное 37012_ L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNLAWYQQKPGKA PKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ RIYNSPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC

		LLNNFYBPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
27	Полное 37013_H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPG KGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
28	Полное 37013_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCKASQNVGNNLAWYQQKPGK APKLLLYYTSNRFTGVPSRFGSGSGTDFTLTISVQPEDFATYY CQRIYNPWTFGQGTKLELKRVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYBPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
29	Полное 37014_H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPG KGLEWVASLTNSGGSTYYADSVKGRFTLSRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
30	Полное 37014_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNNLAWYQQKPGKA PKLLIYYTSNRFTGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ RIYNPWTFGQGTKLEIKRVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYBPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
31	Полное	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPG

	37017_H	KGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKEWAGSGYFDYWGGTLTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
32	Полное 37017_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNNLAWYQQKPGKA PKLLIYYTNSRFTGVPSRFSGSGGTDFLTITSSLPEDFATYYCQ RIYNSPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTSLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[00327] Таблица 1В. CDR гуманизированных антител

Таблица 1В		
CDR	Последовательность	SEQ ID NO
CDR-H1	FSNYMA	9
CDR-H2	SLTNSGGSTY	10
CDR-H3	EWAGSGY	11
CDR-L1	NVGNNLA	12
CDR-L2	YTSNRFT	13
CDR-L3	RIYNSPW	14

Выравнивание каркаса гуманизированных антител

Каркас H1

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMAWVRQAPGKGLEWVSSLTNSGGST
YY 60

Каркас H2

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMAWVRQAPGKGLEWVSSLTNSGGST
YY 60

Каркас H3

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMAWVRQAPGKGLEWVASLTNSGGST
YY 60

3-23*01

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY

Y 60

Каркас H1

ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEWAGSGYFDYWGQGLVTV
SS 119 (SEQ ID NO: 18)

Каркас H2

ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGLVTV
SS 119

(SEQ ID NO: 19)

Каркас H3

ADSVKGRFTLSRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGLVTV
VSS 119 (SEQ ID NO: 20)

3-23*01 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK-----

WGQGLVTVSS 109 (SEQ ID NO: 21)

Каркас L1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSNRFTGVP
S 60

Каркас L2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCKASQNVGNLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSNRFTGV
PS 60

1-39 01

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
60

Каркас L1 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQRIYNPWTFGQGTKLEIK 107
(SEQ ID NO: 22)

Каркас L2 RFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQRIYNPWTFGQGTKLELK
107 (SEQ ID NO: 23)

1-39*01 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP---PFGQGTKLEIK 106
(SEQ ID NO: 24)

[00328] В домене VL, в CDR, Asn28, Asn31, Asn32 и Asn53 обладают низким потенциалом для дезамидирования, исходя из последовательности и конформации. Asn93 обладает низким или средним потенциалом дезамидирования и может демонстрировать низкий уровень этой посттрансляционной модификации. В домене VH, Asn31 обладает низким потенциалом для дезамидирования, исходя из последовательности и конформации. В CDR-H2 Asn53 обладает средним потенциалом для дезамидирования; чтобы предотвращать посттрансляционную модификацию, Asn53 может быть заменен на Gln, Ser или Ala, и сохранение связывания определяется экспериментально. В CDR-H3 Trp100 может подвергаться воздействию растворителей и потенциально может окисляться, особенно в стрессовых условиях.

Расщепление эндопротеиназами в растворе

[00329] С целью анализа последовательности моноклонального антитела (mAb) в

растворе проводили расщепления эндопротеиназами mAb. Восстанавливали 50 мкг антитела с помощью ДТТ, алкилировали с использованием иодацетамида, осаждали ацетоном и восстанавливали в воде в концентрации 1 мкг/мкл. Для расщепления образца антитела в растворе использовали 5 отдельных ферментов для расщепления: Asp-N, химотрипсин, эластаза, трипсин и пепсин в соответствии с инструкциями производителя. Затем образцы лиофилизировали, ресуспендировали в 0,1% ТФУ и очищали с использованием C18 Zip-Tip. Затем образцы высушивали вакуумным центрифугированием и хранили в замороженном виде до проведения масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрия

[00330] Измерение интактных масс

[00331] Образец mAb денатурировали, восстанавливали и подкисляли. Затем белки анализировали с использованием ВЭЖХ Agilent 1100, соединенного с масс-спектрометром Waters QToF Ultima Global (ЖХ-ИЭР-ВП МС). Соответствующие спектры ЖХ-МС обрабатывали (объединяли, вычитали, сглаживали и деконволютировали) с помощью программного обеспечения Waters MassLynx 4.1.

[00332] Анализ ЖХ-МС/МС

[00333] Очищенные пептиды повторно суспендировали в 0,1% муравьиной кислоте и половину каждого из растворов после расщепления анализировали на анализаторе Orbitrap (Q-Exactive, Thermo Fisher Scientific), оснащенный источником с нанораспылением и системой EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific). Пептиды загружали на колонку EASY-Spray длиной 50 см (внутренний диаметр 75 мкм), заполненную смолой PerMap®RSLC 2 мкм C18 (Thermo Fisher Scientific), при давлении 800 бар. Пептиды элюировали со скоростью 250 нл/мин с использованием градиента 0%-30% ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоты в течение 60 мин. Пептиды вводили в масс-спектрометр Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) с помощью источника ионов с нанозлектрораспылением. Инструментальный метод состоял из одного полного сканирования МС (400-1600 m/z) в масс-анализаторе Orbitrap с автоматической регулировкой усиления (AGC) с целевым значением 1E6, максимальным временем инъекции ионов 120 мс и разрешением 70 000, затем 10 зависимых от данных МС/МС-сканирований с разрешением 17 500, целевым значением AGC равным 5E5, максимальным временем ионов 100 мс и одного микросканирования. Порог интенсивности для запуска МС/МС-сканирования был установлен на коэффициент незаполнения 1,0%. Фрагментация происходила в ячейке столкновения HCD с нормированной энергией столкновения, установленной на 30. Динамическое исключение применялось с настройкой 8 секунд.

[00334] В **таблице 2** обобщены биофизические характеристики гуманизированных клонов. Молекулярная масса и коэффициент экстинкции рассчитаны для суммы белковых цепей, входящих в четвертичную структуру. По умолчанию расчет предполагает равный и мономерный вклад от каждой цепи. Коэффициент поглощения представляет собой

прогнозируемую абсорбцию при 280 нм на моль белка в единицах $M^{-1}cm^{-1}$. Потенциальные посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование, фосфорилирование и протеолиз, не учитываются при оценке молекулярной массы и коэффициента поглощения.

Таблица 2				
Антитело	Коэффициент поглощения	Молекулярная масса (Да)	Изоэлектрическая точка	Титр (мг/л)
PI37012	226380	145004	8,41	255,9
PI37013	226380	145012	8,41	249,7
PI37014	226380	144972	8,41	259,9
PI37017	226380	144870	8,45	198,61

Пример 2. Продуцирование и определение характеристик антител против TREM2

Продуцирование и определение характеристик антител

[00335] Стандартные экспрессионные векторы белков трансфицировали в клетки НЕК293 с использованием стандартных методик, после чего клетки выращивали в течение 7 дней и собирали. Помимо НЕК293, антитела также были продуцировали в клетках 293, дефицитных по $\alpha 1,6$ -фукозилтрансферазе млекопитающих (FUT8) с помощью редактирования CRISPR/Cas9 (Alexander Weiss, Университет Торонто). Значение pH супернатанта корректировали с помощью 1 М раствора Neres с pH 7,4 и добавляли азид натрия для предотвращения роста микроорганизмов. Для захвата белков использовали смолу KanCar A, и антитела элюировали с помощью раствора 50 мМ цитрата с pH 3,5, 100 мМ NaCl после промывки фосфатно-солевым буфером (PBS), и раствор PBS содержал 1 М хлорид натрия. Сразу после элюирования раствор нейтрализовали 1 М Трис (pH 8), содержащим 0,5 М аргинина. Определение биофизических характеристик белка выполняли после замены буфера на PBS с использованием стандартных методик. Количественное определение белка проводили по ОП280, количество и концентрацию определяли по рассчитанному коэффициенту поглощения. Для определения чистоты и приблизительной молекулярной массы использовали электрофорез с ДСН-ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (Biorad criterion Трис/Глицин/ДСН, 4-20%) или систему капиллярного электрофореза Perkin Elmer GXII. Состояние агрегации определяли методом ВЭЖХ с детекцией при 280 нм с использованием колонки для эксклюзионной хроматографии Sepax Zenix-C SEC-300, 3 мкм, 300 Å, 4,6*150 мм и подвижного буфера PBS.

Измерение аффинности антител с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР)

[00336] Кинетику связывания определяли методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора Biacore T200 (GE Healthcare, Великобритания) с человеческим TREM2 His (Sino Biological, г. Пекин, КНР) или человеческим белком, захваченным на чипах Series S CM5 посредством антительного His захвата, или белком

слияния человеческого TREM2 и Fc IgG1 (очищенного в ЭХ до чистоты >95%), непосредственно иммобилизованным на чипах посредством аминного связывания. Серийные разведения указанных антител вводили со скоростью 30 мкл/мин в течение 2 минут. Затем вводили PBS или системный буфер со скоростью 30 мкл/мин в течение 400 секунд для наблюдения за диссоциацией. Ответы на связывание корректировали вычитанием значений ответов, полученных на пустой проточной кювете. Для анализа кинетики использовали модель Лэнгмюра 1:1 с общим подбором значений k_{on} и k_{off} . Значения K_d определяли из соотношений k_{on} и k_{off} .

[00337] В таблице 3 показана аффинность связывания антител с человеческим TREM2-His, измеренная методом ППР.

Таблица 3					
Антитело	k_a (1/М*с)	k_d (1/с)	KD (М)	Rmax (RU)	χ^2 (RU ²)
PI37012	1,70E+06	8,69E-03	5,12E-09	30,2053	1,1785
PI37013	1,14E+06	5,49E-03	4,82E-09	33,8282	1,3772
PI37014	5,11E+05	2,43E-03	4,74E-09	34,5363	1,3754

[00338] В таблице 4 показана аффинность связывания антител с человеческим TREM2-Fc, измеренная методом ППР.

Таблица 4					
Антитело	k_a (1/М*с)	k_d (1/с)	KD (М)	Rmax (RU)	χ^2 (RU ²)
PI37012	4,96E+05	9,56E-04	1,93E-09	185,50	16,25
Afuc PI37012	4,47E+05	8,84E-04	1,98E-09	174,90	13,83
PI37013	5,17E+05	8,88E-04	1,72E-09	190,63	19,07
PI37014	4,71E+05	7,32E-04	1,55E-09	184,88	17,65
PI37017	3,40E+05	6,14E-03	1,80E-08	35,05	4,58

[00339] При низкой плотности лиганда (RL=500 RU) кинетика связывания PI37017 с человеческим TREM2-Fc не давала хорошего соответствия.

Пример 3. Клеточное связывание антител против TREM2

Клеточное связывание (измерение EC50):

[00340] от 100 000 до 500 000 исходных клеток Eхр1 293 или клеток Eхр1 293 сверхэкспрессирующих человеческий или мышинный TREM2 высевали на 96-луночные планшеты и окрашивали мертвые клетки с помощью красителя Zombie Near Infrared (Biolegend). Инкубировали последовательные серии указанных неконъюгированных антител с этими клетками в диапазоне концентраций от 0 мкг/мл до 10 мкг/мл с разведением 1:3 по 8-10 точкам. В зависимости от изотипа (hIgG1 или mIgG2a) эти первичные неконъюгированные антитела выявляли с помощью вторичных антител с Alexa Fluor 647, конъюгированных с Fc против человеческого белка или Fc против мышинного

белка (Jackson Immunoresearch). Сигнал красителя Alexa Fluor 647 измеряли методом проточной цитометрии (BD Fortessa X-14, BD Biosciences). Значения EC50 рассчитывали путем подгонки кривой интенсивности сигнала, полученного в результате связывания антитела с сверхэкспрессирующими клетками, по сравнению с фоновой флуоресценцией, полученной на исходных клетках HEK293, в программе Graphpad Prism (Graphpad Software).

[00341] В таблице 5 показано половинное максимальное насыщение связывания антител против TREM2 с белком TREM2 поверхности клеток.

Таблица 5		
Антитело	Клеточная линия	EC50 (нМ)
PI37012	Expi-mTREM2	0,5
PI37012	Expi-hTREM2	1,3
PI37013	Expi-mTREM2	1,2
PI37013	Expi-hTREM2	1,4
PI37013	Expi-mTREM2	1,2
PI37014	Expi-hTREM2	1,4
PI37017	Expi-mTREM2	3,6
PI37017	Expi-hTREM2	23,3

Пример 4. Отсутствие явной токсичности, связанной с терапией антителами к TREM2

Материалы и методы

[00342] Ткани (легкие, печень, головной мозг, почки и сердце) мышей, обработанные антителом 7012 (содержащим CDR-последовательности PI37012 и мураинизированным в форму мышинового IgG2a), сохраняли в 10% нейтральном забуференном формалине по меньшей мере 24 часа, обрабатывали обычным образом для гистологии, нарезали по 5-6 мкм, и окрашивали срезы гематоксилином и эозином. Окрашенные препараты на стеклах исследовали с помощью световой микроскопии низкого разрешения (40-100x), и получали изображения с помощью программы HistoWiz. CD68-положительные клетки выявляли с помощью антитела против CD68 (AbD Serotec) и количественно оценивали 8-9 полей срезов с увеличением 40x с помощью светового микроскопа.

Результаты

[00343] Макроскопический патоморфологический анализ тканей мышей (легкие, печень, сердце, почки и головной мозг), окрашенных гематоксилином и эозином (H&E), после лечения не выявил каких-либо морфологических изменений у мышей, получивших PI-7012, afuc-PI-7012 и комбинацию антител к PD-1, по сравнению с мышами, получившими изотипный контроль (на ФИГ. 1 показано окрашивание ткани легких).

[00344] Помимо окрашивания гематоксилином и эозином (H&E), ткани также

окрашивали на наличие макрофагов с использованием антител к CD68. Внутриклеточный маркер CD68 широко используется в литературе как надежный цитохимический маркер для иммуноокрашивания моноцитов/макрофагов в воспаленных тканях и опухолях. В легком (ФИГ. 2А), а также в других анализируемых тканях, не наблюдалось заметных изменений в количестве CD68+ макрофагов (ФИГ. 2В) в любой из групп лечения по сравнению с контрольными, что указывает на то, что опосредованное антителами к TREM2 истощение происходило именно в TME.

Пример 5. Ограниченная экспрессия TREM2 в тканях здоровых мышей

Материалы и методы

[00345] Все исследования на животных были одобрены Комитетом по изучению животных Murigenics. Мышей C57BL/6J-*Trem2^{em2A^{dij}}*/J (далее называемых TREM2KO) и контрольных мышей C57BL/6J получали из The Jackson Laboratory. Собирали целые легкие, селезенку и кости и сразу же обрабатывали их для проведения проточной цитометрии. Параллельно отбирали кровь путем пункции сердца. Ткани обрабатывали до получения суспензии отдельных клеток с помощью наборов для диссоциации тканей Miltenyi MACS. Эритроциты лизировали с помощью 1x буфера для лизиса эритроцитов (Biolegend). Перед обработкой для окрашивания клеточной поверхности клетки окрашивали фиксируемым красителем для определения их жизнеспособности (ThermoFisher Scientific). Антимышьи антитела для иммунофенотипирования разводили в буфере для FACS (2% FBS, 2 mM ЭДТА, 1× PBS) вместе с Fc-блокирующим раствором и окрашивали в течение 30 минут на льду. После окрашивания клетки дважды промывали буфером для FACS, и затем фиксировали в 2% параформальдегиде в PBS в течение 15 минут. Все данные собирали на проточном цитометре LSR Fortessa (BD) или Attune (Thermo Fisher) и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo. Окрашивание клеток TREM2KO показано на заштрихованных графиках, окрашивание клеток дикого типа - на незаштрихованных графиках.

Результаты

[00346] TREM2 экспрессируется на активированных макрофагах, незрелых дендритных клетках, остеокластах и микроглиях^{2,3}. Считается, что клетки, экспрессирующие высокие уровни TREM2, участвуют в иммунном надзоре, межклеточном взаимодействии, очистке тканей от дебриса и разрешении латентных воспалительных реакций⁴. Отсутствие экспрессии TREM2 на этих клетках путем нокдауна или нокаута генов нарушает их способность фагоцитировать клеточный дебрис, а также увеличивает выработку ими регуляторных цитокинов⁵. В физиологических условиях экспрессия TREM2 в периферической крови, селезенке, печени или легких очень низкая или вообще не обнаруживается, что видно на графиках FACS (ФИГ. 3). Однако если выделить и окрасить по TREM2 макрофаги, находящиеся в легких или печени, как чистые клеточные популяции, экспрессия TREM2 становится выявляемой.

Пример 6. TREM2 преимущественно экспрессируется на мышинных TAM

Материалы и методы

[00347] Опухолевые ткани обрабатывали для выделения суспензии одиночных клеток стандартными методиками. Вкратце, опухоли мелко измельчали бритвенными лезвиями и расщепляли в среде RPMI-1640, содержащей ферменты из наборов для диссоциации Miltenyi MACS. Опухоли обрабатывали в GentleMACs в соответствии с рекомендациями производителя и инкубировали при 37 градусах Цельсия в течение примерно 40 минут. Смесь для расщепления гасили PBS, содержащим 2 мМ ЭДТА и 2% фетальной бычьей сыворотки (FBS). Затем суспензию одиночных клеток пропускали через фильтр с диаметром пор 70 мкм, после чего клетки промывали буфером для FACS. После центрифугирования осадок клеток ресуспендировали в для буфере FACS и окрашивали смесью антител для выявления опухолеассоциированных макрофагов и других популяций иммунных клеток⁶. Окрашивание клеток TREM2KO показано на заштрихованных графиках, окрашивание клеток дикого типа - на незаштрихованных графиках.

Результаты

[00348] Т-клетки, В-клетки, НК-клетки и другие популяции немиелоидных клеток, а также CD45-отрицательные клетки не экспрессируют выявляемую степень экспрессии TREM2 на своей клеточной поверхности. Однако подмножества миелоидных клеток, включая опухолеассоциированные макрофаги (TAM) и миелоидные супрессорные клетки (MDSC), в разной степени экспрессируют TREM2 на клеточной поверхности. Среди клеток разных типов, положительных по TREM2 в опухолевом микроокружении, плотность экспрессии рецептора на TAM была значительно выше, чем на других типах клеток, независимо от происхождения опухоли (CT26 и MC38 показаны на **ФИГ. 4**).

Пример 7. Ограниченная экспрессия TREM2 в лейкоцитах периферической крови человека

Материалы и методы

[00349] Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и негативно отсортированные по CD14⁺ моноциты, полученные у здоровых добровольцев-людей, были предоставлены компанией AllCells Inc. CD14⁺ моноциты дифференцировали *in vitro* с использованием стандартного протокола⁵. CD14⁺ моноциты культивировали в полной культуральной среде, состоящей из среды RPMI-1640 с добавлением 2 мМ L-глутамина, 100 мкг стрептомицина на мл, 100 Ед. пенициллина на мл и 10% инактивированной нагреванием FBS. Чтобы вызвать дифференцировку в макрофаги, в среду добавляли 50 нг/мл M-CSF. Среду добавляли каждые 2-3 дня. Через 7 дней макрофаги собирали пипетированием, и адгезировавшие клетки собирали последующим трипсинированием. Затем клетки центрифугировали и ресуспендировали в RPMI-1640, с добавлением антибиотиков, 2% FBS и рекомбинантного человеческого IFN- γ и 100 нг/мл LPS. Эти макрофаги окрашивали параллельно с МКПК, используя стандартную смесь для миелоидных клеток, чтобы оценить окрашивание TREM2 на поверхности клеток в клеточных субпопуляциях. Клетки, окрашенные контрольным mAb, показаны на заштрихованных графиках. Клетки, окрашенные mAb против TREM2, показаны на

незаштрихованных графиках.

Результаты

[00350] Как видно на **ФИГ. 5**, *ex vivo* дифференцированные макрофаги демонстрируют значительно более высокую плотность рецепторов TREM2 на клеточной поверхности по сравнению с любым другим типом клеток, происходящих из МКПК. В соответствии с литературными данными, моноциты и некоторые нейтрофилы экспрессируют более низкие уровни TREM2.

Пример 8. TREM2 преимущественно экспрессируется на человеческих TAM

Материалы и методы

[00351] Опухолевые ткани человека были получены у Cooperative Human Tissue Network (CHTN). Свежие опухолевые ткани человека диссоциировали в суспензию одиночных клеток с помощью набора для диссоциации Miltenyi MACS и протокола gentleMACS. Суспензии одиночных клеток опухолевых тканей человека окрашивали с использованием предварительно валидированной многоцветной панели FACS. Все данные собирали на проточном цитометре LSR Fortessa (BD) или Attune (Thermo Fisher) и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo. Цифрами обозначен индекс окрашивания для каждой популяции, определяемый как степень окрашивания антител к TREM2 минус степень окрашивания изотипного контроля.

Результаты

[00352] В опухолевом микроокружении экспрессия TREM2 дифференцируется и достигает высокого уровня на TAM (**ФИГ. 6**) по сравнению с другими клетками, что делает его трансляционно значимым маркером для TAM. Показаны репрезентативные гистограммы окрашивания антителом TREM2 (незаштрихованные) или изотипным контролем (заштрихованные) различных клеточных популяций при муцинозной аденокарциноме. В совокупности эти данные подтверждают гипотезу о том, что нацеливающие на TREM2 агенты будут способствовать специфическому истощению TAM при относительно низком или нулевом сопутствующем воздействии на периферические клетки или другие субпопуляции клеток тканевого иммунитета.

Пример 9. Индукция АЗКЦ антителами против TREM2

Материалы и методы

[00353] Как клетки-мишени использовали клетки НЕК-293, сверхэкспрессирующие человеческий TREM2, слитые с TYROBP (DAP12). Первичные НК-клетки человека, отсортированные до высокой чистоты и экспрессирующие CD16, использовали в качестве эффекторных клеток после адаптации к культивированию в среде, содержащей 100 нг/мл рекомбинантного IL-2. Сначала клетки-мишени инкубировали с указанными концентрациями антител (mAb P137012 против TREM2 или изотипный контроль) в 96-луночных планшетах с U-образным дном в течение 20 минут. Через 20 минут в культуральный планшет добавляли эффекторные клетки с получением соотношения эффекторных клеток и клеток-мишеней 1:5 (10 000 клеток-мишеней: 50 000 НК-клеток на лунку). Аналитические планшеты инкубировали при 37 °C в течение 4-6 часов, после чего

супернатанты тестировали на высвобождение лактатдегидрогеназы (ЛДГ) как показателя цитотоксичности мишени с помощью коммерческого набора в соответствии с инструкциями поставщика (Promega).

Результаты

[00354] Как видно на **ФИГ. 7**, Относительная цитотоксичность, измеренная по высвобождению LDH, была выше в клетках-мишенях, инкубированных с mAb против TREM2 (показано черными столбиками, слева) по сравнению с изотипным контролем (показано белыми столбиками, справа) при всех тестируемых концентрациях mAb. Эти результаты свидетельствуют о том, что антитела против TREM2 индуцируют АЗКЦ в клетках-мишенях, экспрессирующих TREM2.

Пример 10. Афукозилирование Fc-домена способствует индукции АЗКЦ

Материалы и методы

[00355] Клетки Eхr1293, стабильно экспрессирующие мышиний TREM2 или только GFP, меченные зеленым флуоресцентным белком (GFP), поддерживали в среде Eхr1293 (Gibco) при 8% CO₂ и температуре 37 °С. Для оценки FcγR-зависимой активности мышиных антител против TREM2 использовали линию клеток Jurkat, экспрессирующую мышиний FcγRIV и NFAT-люциферазный репортерный белок (Promega). Клетки-мишени ресуспендировали в аналитической среде (RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 55 мкМ 2-меркаптоэтанола) в количестве 1x10⁶ клеток на мл, и 25 мкл клеточной суспензии, содержащей 25 000 клеток, помещали в 96-луночные аналитические планшеты с белыми стенками и плоским дном (Corning). Титрование доз моноклональных антител (включая афукозилированное антитело PI-7012 против TREM2, PI-7012 против TREM2 и Fc-сайлент антитело PI-7012 против TREM2) готовили в 3х концентрации в аналитической среде, и к клеточной суспензии добавляли 25 мкл антител. После добавления антител в лунки добавляли по 25 мкл суспензии эффекторных клеток, содержащей 75 000 клеток, с получением соотношения эффекторных клеток к клеткам-мишеням 3:1. После совместного культивирования клеток в течение около 5,5 часов в инкубаторе, установленного на температуру 37 °С с 5% CO₂, в каждую лунку добавляли по 75 мкл реагента для количественного определения люциферазы Bio-Glo (Promega) и инкубировали в течение 15 минут в защищенном от света месте. Интенсивность люминесценции (RLU) оценивали в считывателе для планшетов Tecan Spark и ее значение использовали в качестве косвенного показателя активности АЗКЦ.

Результаты

[00356] Как видно на **Фиг. 8**, афукозилированное mAb против TREM2 (обозначено точками с кругами) вызывало наибольшую индукцию АЗКЦ, как измерено по активности репортера NFAT. Антитело против TREM2, которое не было афукозилированным, также индуцировало АЗКЦ, хотя и на более низком относительном уровне. В отличие от этого, в клетках-мишенях, обработанных Fc-сайлент mAb против TREM2, не наблюдалось заметной индукции АЗКЦ.

Пример 11. Лечение фиброза печени антителами против TREM2

[00357] Предыдущие исследования, проведенные на грызунах, выявили субпопуляции макрофагов, управляющие как прогрессированием, так и регрессией фиброза печени; при этом локальная пролиферация играет важную роль в увеличении численности макрофагов в очагах фиброза в моделях грызунов. Duffield JS, et al. J Clin Invest. 2005; 115:56-65.; Ramachandran P, et al. Proc Natl Acad Sci. 2012; 109:E3186-E3195.; Karlmark KR, et al. Hepatology. 2009; 50:261-274.; Minutti CM, et al. Science (80-). 2017; 356:1076-1080.

[00358] Взрослые самцы мышей C57BL/6JCrI возрастом 8-10 недель приобретают у Charles River. Мышей содержат в специальных условиях без возможности заражения патогенами. Все экспериментальные протоколы одобрены с этической точки зрения. Фиброз печени индуцируется 4-недельным (9 инъекций) внутрибрюшинным введением дважды в неделю четыреххлористого углерода (CCl₄) в дозе 0,4 мкл/г массы тела, разведенного 1:3 в оливковом масле, как описано ранее (Ramachandran P, et al. Proc Natl Acad Sci. 2012; 109:E3186-E3195.). Мышей рандомизированно распределяют в группы для получения CCl₄ или в качестве здорового контроля.

[00359] После введения CCl₄ мышам назначают лечение антителами. Антитела представляют собой антитела против TREM2 или изотипный контроль. Пример протокола введения антител представлен ниже в **таблице 6**. Продуцируют антитела PI-7012, Fc-сайлент PI-7012 и Afuc-PI-7012 (содержащие CDR-последовательности PI37012 и мураинизированные в форму мышинового IgG2a), как описано в USPN 10 836 828, включенном в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Таблица 6		
Группа	Лечение	Доза/Длительность
1	Мышиный IgG2a или соотв. изотип	10 мг/кг в.б., p5д x 4
2	Антитело к TREM2 [PI-7012]	10 мг/кг в.б., p5д x 4
3	Антитело к TREM2 [Afuc PI-7012]	10 мг/кг в.б., p5д x 4
4	Антитело к TREM2 [Fc сайлент]	10 мг/кг в.б., p5д x 4

[00360] Отбирают ткань печени в разные моменты времени после окончательного введения CCl₄.

[00361] Введение антитела против TREM2 приводит к регрессу фиброза или замедлению прогрессирования фиброза по сравнению с контролем.

[00362] Введение антитела против TREM2 приводит к уменьшению количества TREM2⁺ макрофагов в очагах рубцевания по сравнению с контролем.

[00363] Введение антитела против TREM2 приводит к уменьшению количества TREM2⁺ макрофагов в цирротической печени (например, внутри фиброзирующей ниши) по сравнению с контролем.

[00364] Кроме того, масса тела, масса печени, активность ферментов печени, выживаемость, гидроксипролин и/или гистопатологические показатели демонстрируют

улучшение в группах лечения антителами против TREM2 по сравнению с контролем.

Пример 12. Лечение антителами против TREM2 в дополнительных моделях фиброза

[00365] Испытываются дополнительные модели фиброза, включая легочный, НАСГ, дермальный и почечный.

Легочный

[00366] Легочный фиброз вызывается введением блеомицина (орофарингеально), как описано в Della Latta, V, et al. *Pharmacol Res.* 2015; 97:122-130; Izbicki, G, et al. *Int J Exp Pathol.* 2002; 83:111-119; и Mouratis, MA, et al. *Curr Opin Pul Med.* J. 2011; 17:355-361, которая тем самым включена посредством ссылки для всех целей. В качестве альтернативы фиброз легких индуцируется с помощью диоксида кремния, доставляемого орофарингеальным путем, как описано в Barbarin, V, et al. *Respir Res.* 2005; 6:112; и Brass, DM, et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physio* 2010; 200:L664-L671. После введения блеомицина мышам назначают лечение антителами. Антитела представляют собой антитела против TREM2 или изотипный контроль. Пример протокола введения антител представлен ниже в **таблице 7**.

Таблица 7		
Группа	Лечение	Доза/Длительность
1	Мышиный IgG2a или соотв. изотип	10 мг/кг в.б., р5д x 4
2	Антитело к TREM2 [PI-7012]	10 мг/кг в.б., р5д x 4
3	Антитело к TREM2 [Afus PI-7012]	10 мг/кг в.б., р5д x 4
4	Антитело к TREM2 [Fc сайлент]	10 мг/кг в.б., р5д x 4

[00367] Введение антитела против TREM2 приводит к регрессу фиброза или замедлению прогрессирования фиброза по сравнению с контролем.

[00368] Введение антитела против TREM2 приводит к уменьшению количества TREM2+ макрофагов в очагах рубцевания по сравнению с контролем.

[00369] Кроме того, масса тела, нормализованная масса легких, число лейкоцитов в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ), уровни цитокинов в БАЛ и/или результаты анализа на растворимый коллаген (Sircol) демонстрируют улучшение в группах лечения антителами против TREM2 по сравнению с контролем.

НАСГ

[00370] Неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) вызывают с помощью рациона питания с высоким содержанием жиров в течение 14 недель, как описано в Nakamura, A et al. *Int J Mol Sci.* 2013; 14:21240-21257; Xu, Z-J, et al. *Dig Dis Sci.* 2010; 55:931-940, и Larter, CZ, et al. *J Gastroen Hepatol.* J. 2008; 23:1635-1648, которая тем самым включена посредством ссылки для всех целей.

[00371] После выдерживания мышей на рационе с высоким содержанием жиров назначают лечение антителами. Антитела представляют собой антитела против TREM2

или изотипный контроль. Пример протокола введения антител представлен ниже в **таблице 8**.

Таблица 8		
Группа	Лечение	Доза/Длительность
1	Мышиный IgG2a или соотв. изотип	10 мг/кг в.б., р5д x 4
2	Антитело к TREM2 [PI-7012]	10 мг/кг в.б., р5д x 4
3	Антитело к TREM2 [Afus PI-7012]	10 мг/кг в.б., р5д x 4
4	Антитело к TREM2 [Fc сайлент]	10 мг/кг в.б., р5д x 4

[00372] Введение антитела против TREM2 приводит к регрессу фиброза или замедлению прогрессирования фиброза по сравнению с контролем.

[00373] Введение антитела против TREM2 приводит к уменьшению количества TREM2+ макрофагов в очагах рубцевания по сравнению с контролем.

[00374] Кроме того, масса тела, масса печени, активность ферментов печени, гистологические показатели, выживаемость, гидроксипролин, MCP1, коллаген, SMA-а, триглицериды, холестерин и/или гистопатологические показатели демонстрируют улучшение в группах лечения антителами против TREM2 по сравнению с контролем.

Дермальный

[00375] Дермальный фиброз вызывается введением блеомицина, как описано в Della Latta, V, et al. *Exp Dermatol.* 2005; 14:81-95; Ruzehaji, N, et al. *Arthritis Res Ther.* 2015; 17:145, и Yamamoto, T, et al. *J Invest Dermatol. J.* 1999; 112:456-462, которая тем самым включена посредством ссылки для всех целей.

[00376] После введения блеомицина мышам назначают лечение антителами. Антитела представляют собой антитела против TREM2 или изотипный контроль. Пример протокола введения антител представлен ниже в **таблице 9**.

Таблица 9		
Группа	Лечение	Доза/Длительность
1	Мышиный IgG2a или соотв. изотип	10 мг/кг в.б., р5д x 4
2	Антитело к TREM2 [PI-7012]	10 мг/кг в.б., р5д x 4
3	Антитело к TREM2 [Afus PI-7012]	10 мг/кг в.б., р5д x 4
4	Антитело к TREM2 [Fc сайлент]	10 мг/кг в.б., р5д x 4

[00377] Введение антитела против TREM2 приводит к регрессу фиброза или замедлению прогрессирования фиброза по сравнению с контролем.

[00378] Введение антитела против TREM2 приводит к уменьшению количества TREM2+ макрофагов в очагах рубцевания по сравнению с контролем.

[00379] Кроме того, масса тела, гистопатологические показатели и/или гидроксипролин демонстрируют улучшение в группах лечения антителами против

TREM2 по сравнению с контролем.

Почечный

[00380] Почечный фиброз вызывается обструкцией мочеточника, как описано в Chavalier, RL, et al. *Kidney Int.* 2009; 75:1145-1152 и Nogueira, A, et al. *In Vivo. J.* 2017; 31:1-22, которая тем самым включена посредством ссылки для всех целей. Кроме того, почечный фиброз вызывается посредством введения фолиевой кислотой, как описано в Yang, H-C, et al. *Drug Discov Today Dis Models.* 2010; 7:13-19 и Street, JM, et al. *Physiol Rep.* 2014; 2:e12088, которые тем самым полностью включены посредством ссылки для всех целей.

[00381] После обструкции мочеточника мышам назначают лечение антителами. Антитела представляют собой антитела против TREM2 или изотипный контроль. Пример протокола введения антител представлен ниже в **таблице 10**.

Таблица 10		
Группа	Лечение	Доза/Длительность
1	Мышиный IgG2a или соотв. изотип	10 мг/кг в.б., р5д x 4
2	Антитело к TREM2 [PI-7012]	10 мг/кг в.б., р5д x 4
3	Антитело к TREM2 [Аfus PI-7012]	10 мг/кг в.б., р5д x 4
4	Антитело к TREM2 [Fc сайлент]	10 мг/кг в.б., р5д x 4

[00382] Введение антитела против TREM2 приводит к регрессу фиброза или замедлению прогрессирования фиброза по сравнению с контролем.

[00383] Введение антитела против TREM2 приводит к уменьшению количества TREM2+ макрофагов в очагах рубцевания по сравнению с контролем.

[00384] Кроме того, масса почек, гистологические показатели и/или гидроксипролин демонстрируют улучшение в группах лечения антителами против TREM2 по сравнению с контролем.

Сердечный

[00385] Сердечный фиброз вызывается инфузией ангиотензина II, как описано в Kaur, H, et al. *Circ Res.* 2016; 118:1906-1917; Sopol, MJ, et al. *Lab Invest.* 2011; 91:565-578; и Wang, N-P, A, et al. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2017; 18: 1470320317706653, которые настоящим полностью включены посредством ссылки для всех целей.

[00386] После введения ангиотензина II мышам назначают лечение антителами. Антитела представляют собой антитела против TREM2 или изотипный контроль. Пример протокола введения антител представлен ниже в **таблице 11**.

Таблица 11		
Группа	Лечение	Доза/Длительность
1	Мышиный IgG2a или соотв. изотип	10 мг/кг в.б., р5д x 4

2	Антитело к TREM2 [PI-7012]	10 мг/кг в.б., р5д x 4
3	Антитело к TREM2 [Afuc PI-7012]	10 мг/кг в.б., р5д x 4
4	Антитело к TREM2 [Fc сайлент]	10 мг/кг в.б., р5д x 4

[00387] Введение антитела против TREM2 приводит к регрессу фиброза или замедлению прогрессирования фиброза по сравнению с контролем.

[00388] Введение антитела против TREM2 приводит к уменьшению количества TREM2+ макрофагов в очагах рубцевания по сравнению с контролем.

[00389] Кроме того, масса сердца, гистологические показатели и/или гидроксипролин демонстрируют улучшение в группах лечения антителами против TREM2 по сравнению с контролем.

Пример 13. Лечение фиброза печени антителами против TREM2

[00390] Материалы и методы

[00391] Самцов мышей C57BL/6J возрастом 6-8 недель, полученных у Jackson Laboratory, разделяли на 5 групп. Все группы питались рационом «западной диеты» с подслащенной водой (смесь фруктозы/глюкозы) с еженедельными инъекциями CCl₄ (0,2 мл, 100% CCl₄ /грамм массы тела) в течение 24 недель. См. Jiao, J., et al, 2012 Dendritic cell regulation of carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis regression. *Hepatology* 55, 244-255. По три животных в группе 3 (изотипный контроль) и группе 4 (антитело к TREM2 [Afuc PI-7012]) лечили в течение 22 недель. В качестве положительного контроля использовали обетихоловую кислоту (ОХК). Все группы мышей в течение 12 недель питались только диетой без лечения. Лечение антителами или ОХК начиналось на неделе 13. Протокол лечения представлен ниже в **таблице 12**.

Группа	Лечение	Доза/Длительность
1	Без лечения, n=5	12 нед.
2	Без лечения, n=5	24 нед.
3	PI-0002-afuc, соотв. изотипный контроль, n=13	в.б., р5д x 12
4	Антитело к TREM2 [Afuc PI-7012], n=12	в.б., р5д x 12
5	Лечение ОХК, n=13	30 мг/кг, перор. РД-5×12

[00392] Животных взвешивали раз в неделю перед введением инъекции CCl₄. Препараты и носитель вводили внутривенно, каждые 5 дней или один раз в день (группа 5) в течение 12 недель (недели 13-24). Количество препаратов подбирали в соответствии с массой тела. В период акклиматизации и лечения препаратами всех животных осматривали каждый день в течение периода введения доз. Фиксировали любые явные поведенческие/физиологические изменения или другие соответствующие наблюдения за состоянием животных.

[00393] По три животных в группе, получавшей носитель, и в группе лечения антителом против TREM2 умерщвляли на неделе 22, чтобы определить необходимость продолжения анализа на мцРНК. Печень этих животных взвешивали, фиксировали 10% формалином, делали срезы и окрашивали красителями H&E и Sirius Red. В конце эксперимента регистрировали массу мышцы, массу печени и селезенки. Отбирали кровь для анализа сыворотки крови, который включал: анализ сывороточных трансаминаз (АЛТ и АСТ), общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови; анализ воздействия антитела против TREM2 на 16 неделе до получения дозы и через 4 часа после получения дозы и в конце лечения (данные не показаны).

[00394] Доли печени фиксировали 10% формалином, заливали, делали срезы и окрашивали красителями H&E и Sirius Red. Общую морфологию оценивали патологоанатомом, работавший с маскированными препаратами, с определением баллов активности НАЖБП (лобулярное воспаление, стеатоз, вздутие гепатоцитов) и стадии фиброза. Количественное определение коллагена методом морфометрии проводили с помощью системы Bioquant™ в соответствии с инструкциями производителя. Замороженную ткань печени готовили для выделения мРНК и белка по стандартным протоколам. Проводили кПЦР для следующих фиброгенных генов: коллаген I, альфа-1 актин гладких мышц, бета-PDGF рецептор, MMP2 и TIMP2. Данные были нормализованы к соответствующему конститутивному гену. Проводили также вестерн-блоттинг для определения белка α -SMA и коллагена.

[00395] Результаты

[00396] Как показано на **ФИГ. 9**, наблюдалось значительное уменьшение печеночного фиброза после лечения антителом против TREM2 по сравнению с контролем. На левых изображениях **ФИГ. 9** показано окрашивание H&E печени мышей, обработанных изотипным контрольным антителом mIgG2a или антителом против TREM2. Значительное уменьшение печеночного фиброза наблюдали в печени мышей, обработанных антителом против TREM2. Количество коллагена в печени отдельных мышей также определяли с помощью окрашивания PSR. Как показано на правом изображении **ФИГ. 9**, лечение антителом против TREM2 значительно снижало уровень коллагена по сравнению с мышами, не получавшими лечения в течение 12 и 24 недель, а также мышами, получавшими изотипный контроль. Как также показано на правом изображении **ФИГ. 9**, обработка антителом против TREM2 снижала уровень коллагена в большей степени, чем у контрольных мышей, получавших ОХК. В **таблицах 13** и **14** представлена PSR-положительная зона у отдельных мышей, получавших лечение антителом к TREM2 (**таблица 13**) и ОХК (**таблица 14**).

Таблица 13		
Группа	№ мыши	Средняя PSR-положит. зона
Антитело к TREM2	25	0,01695932
	26	0,007608664

	27	0,014992593
	28	0,009197609
	29	0,018356672
	30	0,130453248
	31	0,011246354
	32	0,016481797
	33	0,018560936
	34	0,31591216
	35	0,016416529
	36	0,030107375
ОХК (30 мг/кг)	37	0,011399032
	38	0,014204561
	39	0,01590634
	40	0,036022515
	41	0,013090386
	42	0,255895264
	43	0,255258344
	44	0,021259561
	45	0,016269085
	46	0,240544185
	47	0,270161116
	48	0,21253184
	49	0,113031202

[00397] У двух мышей, получавших лечение антителом к TREM2, PSR-положительные зоны были меньше 0,01, и у десяти из двенадцати мышей, получавших лечение антителом к TREM2, PSR-положительные зоны были меньше 0,1 (83,3%). И наоборот, ни у одной из мышей, получавших лечение ОХК, PSR-положительные зоны были меньше 0,01, и только у семи из тринадцати мышей, получавших лечение ОХК, PSR-положительные зоны были меньше 0,1 (53,8%). Таким образом, лечение антителами к TREM2 было более эффективным в отношении уменьшения фиброза по сравнению с лечением ОХК.

[00398] Таким образом, лечение антителами против TREM2 успешно уменьшало фиброз в модели фиброза печени *in vivo*.

Литература

1. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Divergent Immunoglobulin G Subclass Activity Through Selective Fc Receptor Binding. *Science* (80-.). **310**, 1510 LP-1512 (2005).

2. Ford, J. W. & McVicar, D. W. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 38-46 (2009).

3. Colonna, M. TREMs in the immune system and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 445 (2003).

4. Takahashi, K., Rochford, C. D. P. & Neumann, H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J. Exp. Med.* **201**, 647 LP-657 (2005).

5. Piccio, L. *et al.* Blockade of TREM-2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **37**, 1290-1301 (2007).

6. 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 (2017).

[00399] Хотя изобретение было конкретно показано и описано со ссылкой на предпочтительный вариант осуществления и различные альтернативные варианты осуществления, специалистам в соответствующей области техники будет понятно, что в него могут быть внесены различные изменения по форме и в деталях, не выходя за рамки сущности и объема настоящего изобретения.

[00400] Все ссылки, выданные патенты и заявки на патенты, цитируемые в тексте данного описания, тем самым включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

Последовательности

SEQ ID NO	Название	Последовательность
1	37012_VH	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVR QAPGKGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQG TLVTVSS
2	37012_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNNLAWYQQ KPGKAPKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQRIYNSPWTFGQGGTKLEIK
3	37013_VH	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVR QAPGKGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQG TLVTVSS
4	37013_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCKASQNVGNNLAWYQ QKPGKAPKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS S VQPEDFATYYCQRIYNSPWTFGQGGTKLELK

5	37014_ VH	EVQLLES GG GLVQPGGSLRLS CA ASGFTFSNYYMAWVR QAPGKGLEWVASLTNSGGSTYYADSVKGRFTLSRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQG TLVTVSS
6	37014_ VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNNLAWYQQ KPGKAPKLLIYYTSNRFTGVPSRFS GS SGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQRIYNSPWTFGQGTKLEIK
7	37017_ VH	EVQLLES GG GLVQPGGSLRLS CA ASGFTFSNYYMAWVR QAPGKGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>AK</u> EWAGSGYFDYWGQG TLVTVSS
8	37017_ VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNNLAWYQQ KPGKAPKLLIYYTSNRFTGVPSRFS GS SGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQRIYNSPWTFGQGTKLEIK
9	CDR-H1	FSNYYMA
10	CDR-H2	SLTNSGGSTY
11	CDR-H3	EWAGSGY
12	CDR-L1	NVGNNLA
13	CDR-L2	YTSNRFT
14	CDR-L3	RIYNSPW
15	Человеческий белок TREM2	MEPLRLLILLFVTELSGAHNTTVFQGVAGQSLQVSCP YD SMKHWGRRKAWCRQLGEKGPCQRVVSTHNLWLLSFLR RWNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGLYQCQSLHG SEADTLRKVLVEVLADPLDHRDAGDLWFPGESESFEDA HVEHSISRSLLEGEIPFPPTSILLLLACIFLIKILAASALWA AAWHGQKPGTHPPSELDCGHDPGYQLQTLPLGRDT
16	Нуклеотид TREM2 (CDS)	ATGGAGCCTCTCCGGCTGCTCATCTTACTCTTTGT CAC AGAGCTGTCCGGAGCCCACAACACCACAGTGTTCCAG GGCGTGGCGGGCCAGTCCCTGCAGGTGTCTTGCCCCT ATGACTCCATGAAGCACTGGGGGAGGCGCAAGGCCTG GTGCCGCCAGCTGGGAGAGAAGGGCCCATGCCAGCGT GTGGTCAGCACGCACAACCTTGTGGCTGCTGTCCTTCT GAGGAGGTGGAATGGGAGCACAGCCATCACAGACGA TACCCTGGGTGGCACTCTCACCATTACGCTGCGGAAT

		CTACAACCCCATGATGCGGGTCTCTACCAGTGCCAGA GCCTCCATGGCAGTGAGGCTGACACCCTCAGGAAGGT CCTGGTGGAGGTGCTGGCAGACCCCTGGATCACCGG GATGCTGGAGATCTCTGGTCCCGGGGAGTCTGAGA GCTTCGAGGATGCCCATGTGGAGCACAGCATCTCCAG GAGCCTCTTGAAGGAGAAATCCCCTTCCCACCCACT TCCATCCTTCTCCTCCTGGCCTGCATCTTTCTCATCAA GATTCTAGCAGCCAGCGCCCTCTGGGCTGCAGCCTGG CATGGACAGAAGCCAGGGACACATCCACCCAGTGAA CTGGACTGTGGCCATGACCCAGGGTATCAGCTCCAAA CTCTGCCAGGGCTGAGAGACACGTGA
17	Мышиный белок TREM2	MGPLHQFLLLLITALSQALNTTVLQGMAGQSLRVSCY DALKHWGRRKAWCRQLGEEGPCQRVVSTHGVWLLAFL KKRNGSTVIADDTLAGTVTITLKNLQAGDAGLYQCQSL RGREAENVLQKVLVEVLEDPLDDQDAGDLWVPESSSFE GAQVEHSTSRNQETSFPPTSILLLLACVLLSKFLAASILW AVARGRQKPGTPVVRGLDCGQDAGHQLQILTGPGGT
18	Каркас H1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMAWVR QAPGKGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEWAGSGYFDYWGQG TLVTVSS
19	Каркас H2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMAWVR QAPGKGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGT LVTVSS
20	Каркас H3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMAWVR QAPGKGLEWVASLTNSGGSTYYADSVKGRFTLSRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGT LVTVSS
21	3-23*01 Каркас VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMAWVR QAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWGQGTTLVTVSS
22	Каркас L1	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKASQNVGNNLAWYQQ KPGKAPKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQ PEDFATYYCQRIYNPWFQGTGLEIK

23	Каркас L2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCKASQNVGNNLAWYQ QKPGKAPKLLLYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS VQPEDFATYYCQRIYNPWTFGQGTKLELK
24	3-23*01 Каркас VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQSYSTPPFGQGTKLEIK
25	Полное 37012_H	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVR QAPGKGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
26	Полное 37012_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNNLAWYQQ KPGKAPKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQRIYNPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
27	Полное 37013_H	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVR QAPGKGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG

		NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28	Полное 37013_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVMTCKASQNVGNNLAWYQ QKPGKAPKLLLYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS VQPEDFATYYCQRIYNPWTFGQGTKLELKRVAAPSVEF IFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
29	Полное 37014_H	EVQLLESGLLVQPGSLRLSCAASGFTFSNYMAWVR QAPGKGLEWVASLTNSGGSTYYADSVKGRFTLSRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	Полное 37014_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQNVGNNLAWYQQ KPGKAPKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQRIYNPWTFGQGTKLEIKRVAAPSVEFIF PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
31	Полное 37017_H	EVQLLESGLLVQPGSLRLSCAASGFTFSNYMAWVR QAPGKGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEWAGSGYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE

		SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	Полное 37017_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNNLAWYQQ KPGKAPKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQRIYNSPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
33	PI-7012 AB VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFSNYYMAWVR QAPTKGLEWVASLTNSGGSTYYRDSVKGRFTLSRDNAK STLYLQMDSLRSEDATYYCTREWAGSGYFDYWGQGV MVTVSS
34	PI-7012 AB VL	NIVMTQSPKSMSSLSVGDRVTMNCKASQNVGNNLAWYQ QKPGQSPKLLLYYTSNRFTGVDPDRFTGGGYGTDFTLTIN SVQAEDA AFYYCQRIYNSPWTFGGGKLELK
35	Тяжелая цепь PI-7012	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFSNYYMAWVR QAPTKGLEWVASLTNSGGSTYYRDSVKGRFTLSRDNAK STLYLQMDSLRSEDATYYCTREWAGSGYFDYWGQGV MVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTS STWPSQSITCNVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKCPPCKCP APNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDP DVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQ VYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNS YSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
36	Легкая цепь PI-7012	NIVMTQSPKSMSSLSVGDRVTMNCKASQNVGNNLAWYQ QKPGQSPKLLLYYTSNRFTGVDPDRFTGGGYGTDFTLTIN SVQAEDA AFYYCQRIYNSPWTFGGGKLELKRAAAPT VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNRFYPKDINKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEV TCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
37	CDR-H1 по AbM	GFTFSNYYMA

38	CDR-H2 AbM	по	SLTNSGGSTY
39	CDR-H3 AbM	по	EWAGSGYFDY
40	CDR-L1 AbM	по	KASQNVGNNLA
41	CDR-L2 AbM	по	YTSNRFT
42	CDR-L3 AbM	по	QRIYNPWT
43	CDR-H1 Chothia	по	GFTFSNY
44	CDR-H1 Kabat	по	NYYYMA
45	CDR-H1 Contact	по	SNYYMA
46	CDR-H1 IMGT	по	GFTFSNYY
47	CDR-H2 Chothia	по	TNSGGS
48	CDR-H2 Kabat	по	SLTNSGGSTYYADSVKG
49	CDR-H2 Contact	по	WVSSLTNSGGSTY
50	CDR-H2 IMGT	по	LTNSGGST
51	CDR-H3 Contact	по	TREWAGSGYFD
52	CDR-H3 IMGT	по	TREWAGSGYFDY
53	CDR-L1 Contact	по	GNNLAWY
54	CDR-L1 IMGT	по	QNVGNN

55	CDR-L2 Contact	no	LLIYYTSNRF
	CDR-L2 IMGT	no	YT
57	CDR-L3 Contact	no	QRIYNPW

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения фиброзирующего заболевания или состояния у субъекта, включающие введение выделенного антитела, которое связывается с человеческим TREM2 (SEQ ID NO:15) и конкурирует за связывание с мышинным TREM2 (SEQ ID NO:17) с антителом 37017 (SEQ ID NO: 31 и 32); или

способ уничтожения, блокирования или истощения TREM2+ миелоидных клеток у субъекта, страдающего фиброзирующим заболеванием или состоянием, включающий приведение в контакт миелоидных клеток с выделенным антителом, которое связывается с человеческим TREM2 (SEQ ID NO:15) и необязательно конкурирует за связывание с мышинным TREM2 (SEQ ID NO:17) с антителом 37017 (SEQ ID NO: 31 и 32).

2. Способ по п. 1, в котором антитело содержит:

CDR-H1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9,

CDR-H2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10,

CDR-H3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11,

CDR-L1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12,

CDR-L2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и

CDR-L3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14.

3. Способ по п. 2, в котором антитело является афукозилированным и содержит последовательность VH, показанную в SEQ ID NO: 1; и последовательность VL, показанную в SEQ ID NO: 2; и активную Fc-область IgG1 человека.

4. Способ по п. 2, в котором содержится последовательность VH, показанная в SEQ ID NO: 1; и последовательность VL, показанная в SEQ ID NO: 2; и изотипный IgG1 человека или IgG4 с Fc-сайлент областью, которая содержит мутацию N297Q.

5. Способ по п. 2, в котором антитело содержит последовательность VH, содержащую замену А на Т в положении 97 последовательности, показанной в SEQ ID NO:7; и замену К на R в положении 98 последовательности, показанной в SEQ ID NO:7.

6. Способ по п. 3 или 4, в котором антитело содержит последовательность VH, показанную в SEQ ID NO: 1, 3 или 5.

7. Способ по п. 6, в котором антитело содержит последовательность VH, показанную в SEQ ID NO: 1, 3 или 5, и последовательность VL, показанную в SEQ ID NO: 2, 4 или 6.

8. Способ по п. 3 или 4, в котором антитело содержит последовательность VH, показанную в SEQ ID NO: 1.

9. Способ по п. 8, в котором антитело содержит последовательность VH, показанную в SEQ ID NO: 1, и последовательность VL, показанную в SEQ ID NO: 2.

10. Способ по п. 9, в котором антитело представляет собой антитело 37012.

11. Способ по п. 1, в котором антитело содержит последовательность тяжелой цепи, показанную в SEQ ID NO: 25; и последовательность легкой цепи, показанную в SEQ ID NO: 26.

12. Способ лечения фиброзирующего заболевания или состояния у субъекта или

способ уничтожения, блокирования или истощения TREM2+ миелоидных клеток у субъекта, имеющего фиброзирующее заболевание или состояние, включающий введение выделенного антитела, которое связывается с человеческим TREM2 (SEQ ID NO:15), причем антитело

i) необязательно конкурирует за связывание с мышинным TREM2 (SEQ ID NO:17) с антителом 37017 (SEQ ID NO: 31 и 32); и

ii) содержит человеческий Fc.

13. Способ лечения фиброзирующего заболевания или состояния у субъекта или способ уничтожения, блокирования или истощения TREM2+ миелоидных клеток у субъекта, имеющего фиброзирующее заболевание или состояние, включающий введение выделенного антитела, причем антитело содержит:

CDR-H1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9,

CDR-H2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10,

CDR-H3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11,

CDR-L1, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12,

CDR-L2, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и

CDR-L3, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14.

14. Способ по п. 13, в котором антитело содержит последовательность VH, содержащую замену А на Т в положении 97 последовательности, показанной в SEQ ID NO:7; и замену К на R в положении 98 последовательности, показанной в SEQ ID NO:7.

15. Способ по п. 14, в котором антитело содержит последовательность VH, показанную в SEQ ID NO: 1, 3 или 5.

16. Способ по п. 15, в котором антитело содержит последовательность VH, показанную в SEQ ID NO: 1, 3 или 5, и последовательность VL, показанную в SEQ ID NO: 2, 4 или 6.

17. Способ по п. 16, в котором антитело содержит последовательность VH, показанную в SEQ ID NO: 1.

18. Способ по п. 17, в котором антитело содержит последовательность VH, показанную в SEQ ID NO: 1, и последовательность VL, показанную в SEQ ID NO: 2.

19. Способ по п. 18, в котором антитело представляет собой антитело 37012.

20. Способ по п. 13, в котором антитело содержит последовательность тяжелой цепи, показанную в SEQ ID NO: 25; и последовательность легкой цепи, показанную в SEQ ID NO: 26.

21. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело связывается с человеческим TREM2 со значением K_D меньшим или равным около 1, 2, 3, 4 или 5×10^{-9} М при измерении в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

22. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело способно специфически уничтожать, истощать или блокировать TREM2+ миелоидные клетки; необязательно нестимулирующие миелоидные клетки, включающие по меньшей мере

одну из TREM2+ макрофагов, TREM2+ CD9+ макрофагов, макрофагов, рубцово-ассоциированных макрофагов (SAM), дендритных клеток, нейтрофилов или моноцитов.

23. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело обладает активностью антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ).

24. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело обладает активностью антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ).

25. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело обладает активностью комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ).

26. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело представляет собой по меньшей мере одно из следующих: моноклональное антитело, нейтральное антитело, антагонистическое антитело, агонистическое антитело, поликлональное антитело, антитело IgG1, антитело IgG3, афукозилированное антитело, биспецифическое антитело, человеческое антитело, химерное антитело, полноразмерное антитело и его антигенсвязывающий фрагмент.

27. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело представляет собой моноклональное антитело.

28. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело является мультиспецифическим.

29. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело является афукозилированным.

30. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело представляет собой его антигенсвязывающий фрагмент, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, (scFv)₂, молекулу одноцепочечного антитела, антитело с двумя переменными доменами, антитело с одним переменным доменом, линейное антитело или антитело с V-доменом.

31. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело содержит каркас, необязательно при этом каркас представляет собой Fc, необязательно Fc человека.

32. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело представляет собой изотип, выбранный из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.

33. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело представляет собой изотип IgG, содержащий подкласс, выбранный из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

34. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело представляет собой антитело IgG1.

35. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором Fc содержит одну или более модификаций, причем одна или более модификаций приводят к увеличению периода полувыведения, увеличению активности АЗКЦ, увеличению активности АЗКФ или увеличению активности КЗЦ по сравнению с Fc без такой одной или более модификаций.

36. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором Fc связывает рецептор Fcγ, выбранный из группы, состоящей из: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc,

FcγRIIIa и FcγRIIIb.

37. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело связывается с внеклеточным доменом TREM2 на TREM2+ миелоидных клетках.

38. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело связывается с внеклеточным доменом TREM2 на миелоидных клетках, причем миелоидные клетки представляют собой нестимулирующие миелоидные клетки, которые являются CD45+, HLA-DR+, CD11c+, CD14+ и BDCA3-, причем антитело уничтожает, блокирует или истощает нестимулирующие миелоидные клетки посредством АЗКЦ, КЗЦ и/или АЗКФ до уровня, который меньше, чем уровень нестимулирующих миелоидных клеток, присутствующих при фиброзирующем заболевании до приведения в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с данным антителом, при этом нестимулирующие миелоидные клетки присутствуют в популяции иммунных клеток, включающей стимулирующие миелоидные клетки, которые являются CD45+, HLA-DR+, CD14-, CD11c+, BDCA1- и BDCA3+, и нестимулирующие миелоидные клетки, и при этом уничтожение, блокирование или истощение нестимулирующих миелоидных клеток лечит фиброзное заболевание.

39. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело обладает активностью антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ).

40. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело обладает активностью комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ).

41. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело обладает активностью антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ).

42. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело обладает блокирующей, агонистической или антагонистической активностью в отношении взаимодействия рецептор-лиганд.

43. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором субъект является человеком.

44. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором TREM2+ миелоидные клетки включают по меньшей мере одну из TREM2+ макрофагов, TREM2+ CD9+ макрофагов, макрофагов, рубцово-ассоциированных макрофагов (SAM), дендритных клеток, опухолеассоциированных макрофагов (TAM), нейтрофилов или моноцитов.

45. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором фиброзирующее заболевание или состояние представляет собой заболевание печени.

46. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором заболевание печени представляет собой НАЖБП.

47. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором заболевание печени представляет собой НАСГ.

48. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором заболевание печени выбрано из группы, состоящей из: фиброза, НАЖГ, цирроза или рака печени.

49. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором заболевание печени представляет собой жировую болезнь печени, выбранную из группы, состоящей из: жировой болезни печени, возникающей вследствие ожирения, жировой болезни печени, возникающей вследствие диабета, жировой болезни печени, возникающей вследствие инсулинорезистентности, жировой болезни печени, возникающей вследствие гипертриглицеридемии, абеталипопротеинемии, заболеваний накопления гликогена, болезни Вебера - Крисчена, болезни Вольмана, острой жировой дистрофии печени беременных и липодистрофии.

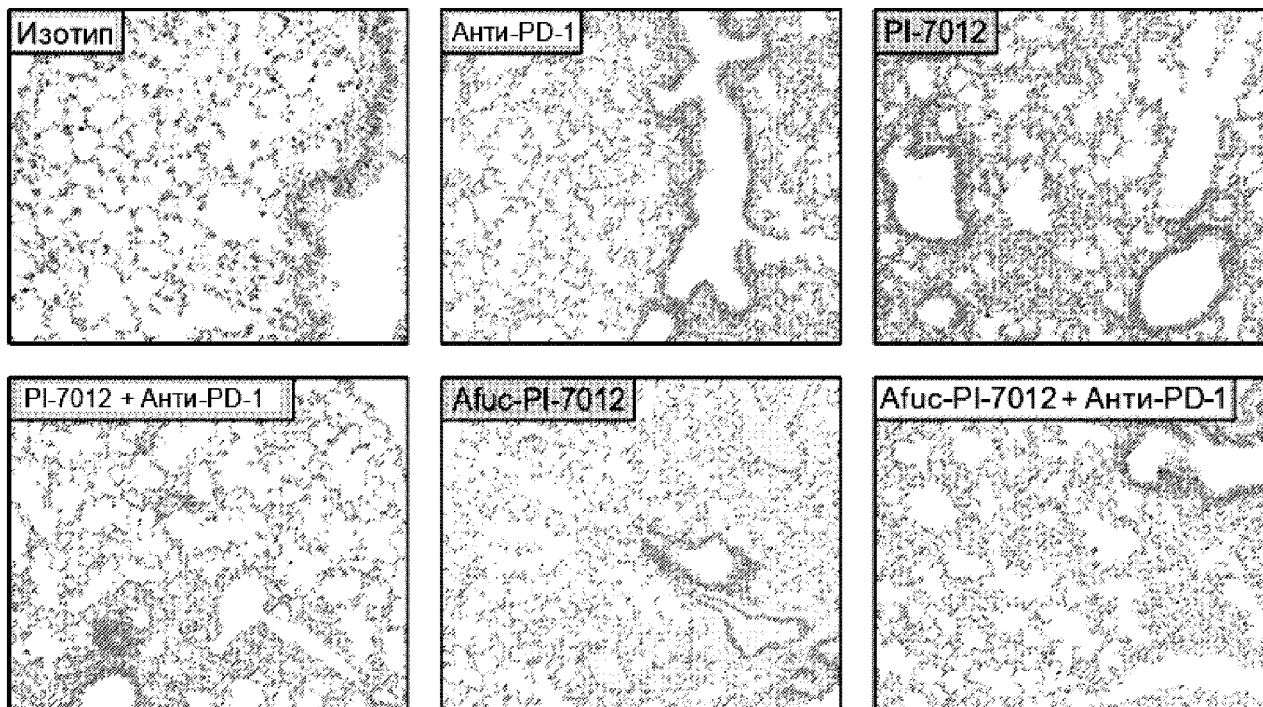
50. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором приведение в контакт усиливает иммунный ответ у субъекта.

51. Способ по п. 50, в котором усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ.

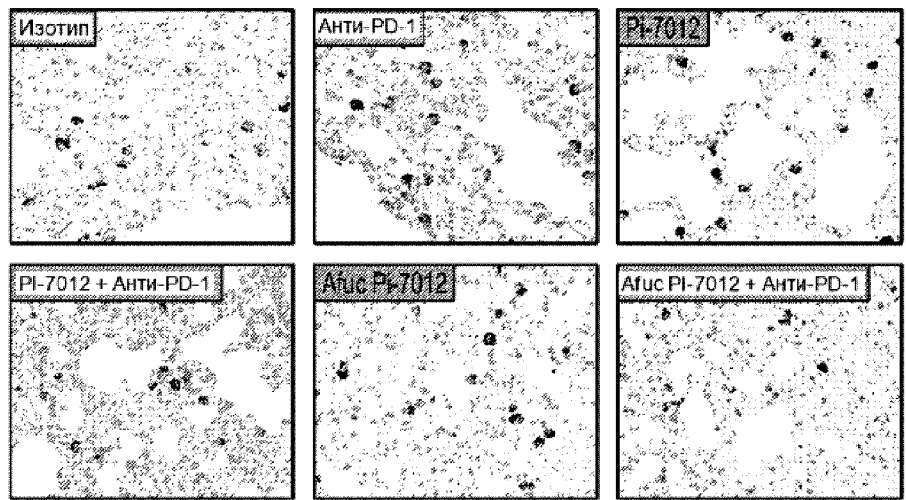
52. Способ по п. 50, в котором усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.

53. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором субъект ранее получал, совместно получает или будет в дальнейшем получать иммунотерапию.

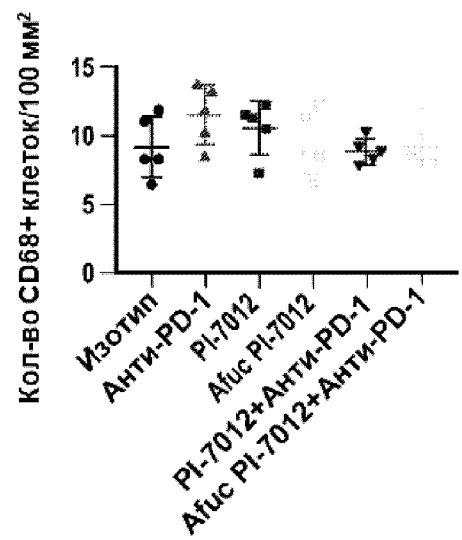
По доверенности



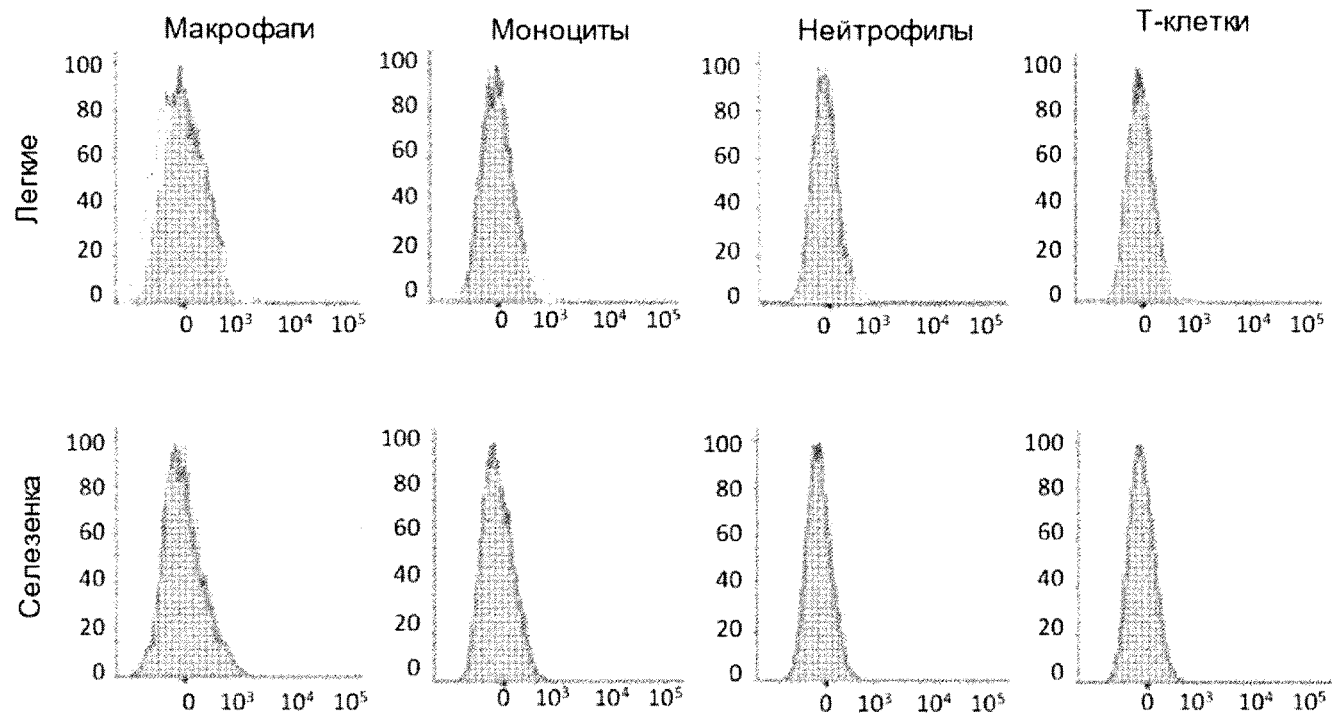
ФИГ. 1



ФИГ. 2А

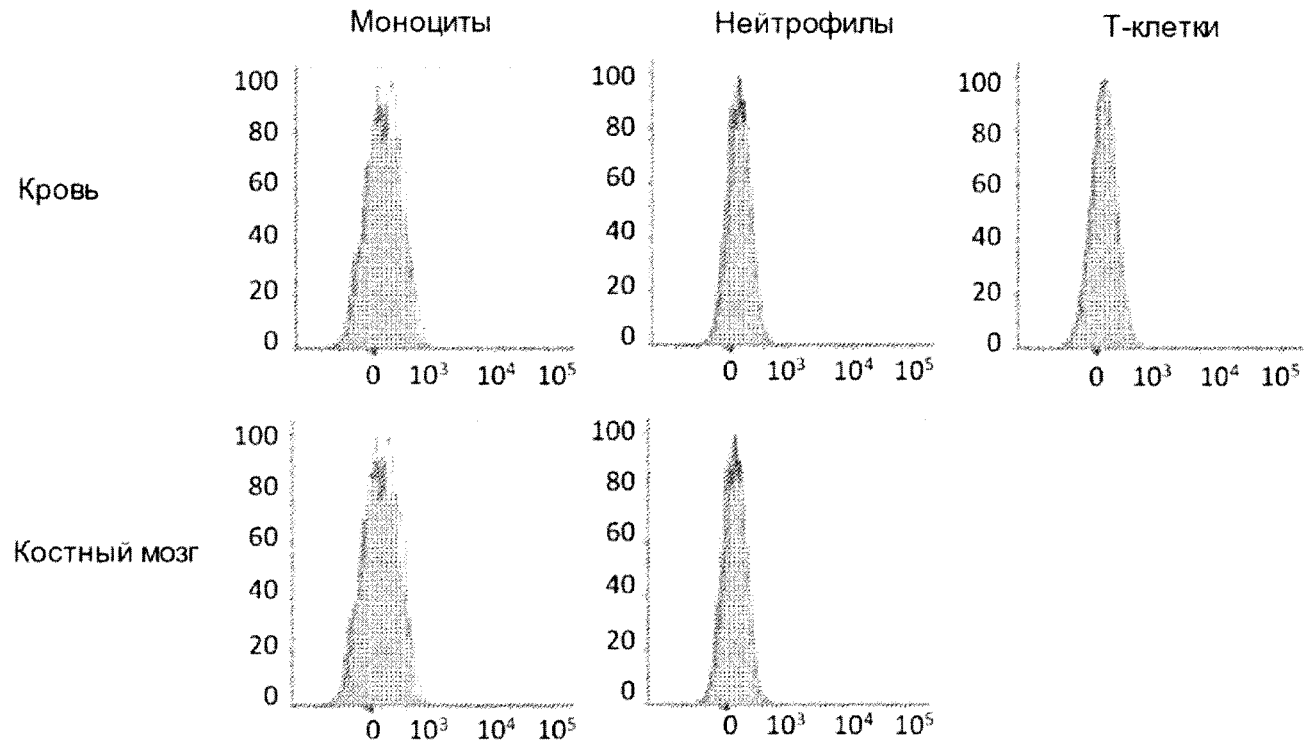


ФИГ. 2В

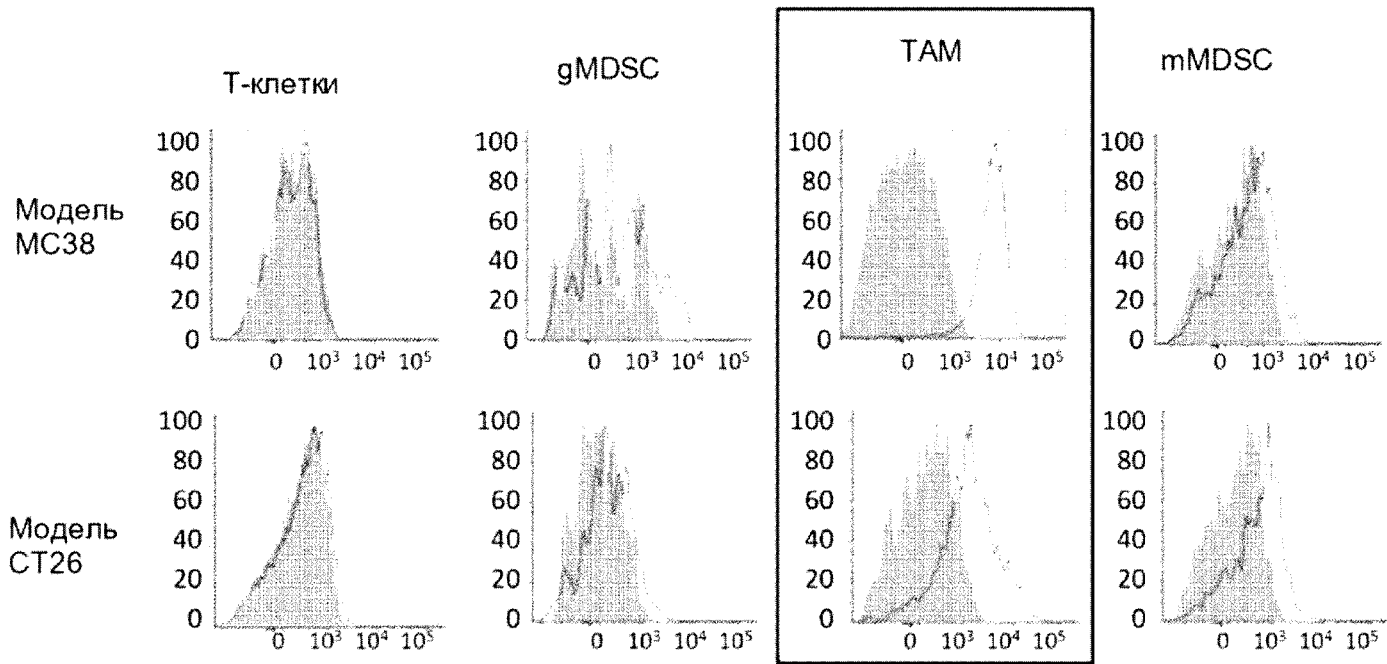


ФИГ. 3

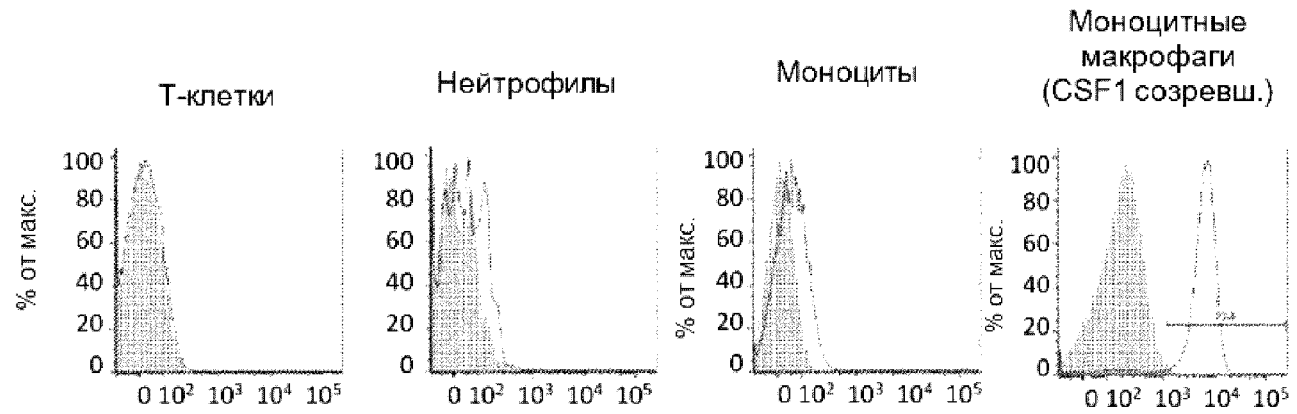
Окрашивание
антитела против
TREM2
Закрашен. = TREM2KO
Незакраш. = ДТ



ФИГ. 3 (продолж.)



ФИГ. 4

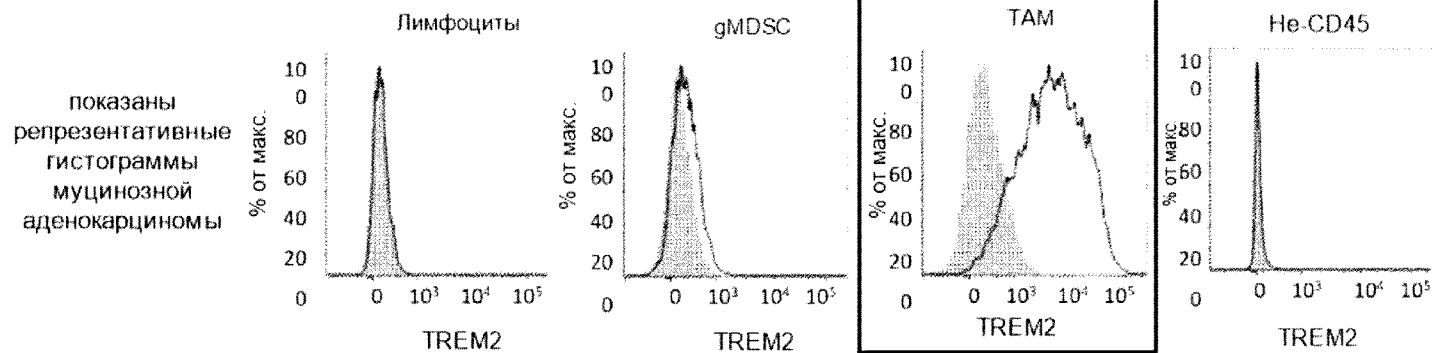


- МКПК человека, окрашенные PI-7012
- Репрезентативные графики от 3 доноров

Окрашивание антитела против
TREM2
Закрашен. = Контрольное mAb
Незакрашен. = mAb против TREM2

ФИГ. 5

Опухоль	Лимфоциты	gMDSC	TAM	He-CD45
Почечн.-светлоклет. (1)	138*	НО**	652	125,8
Почечн.-метастатич. папиллярн.	-3	НО	370	-41
Почечн.-светлоклет. (2)	10	37	2225	13
Почечн.-первич. папиллярн.	76	294	1107	1
Муцинозная аденокарцинома	11	105	3588	1

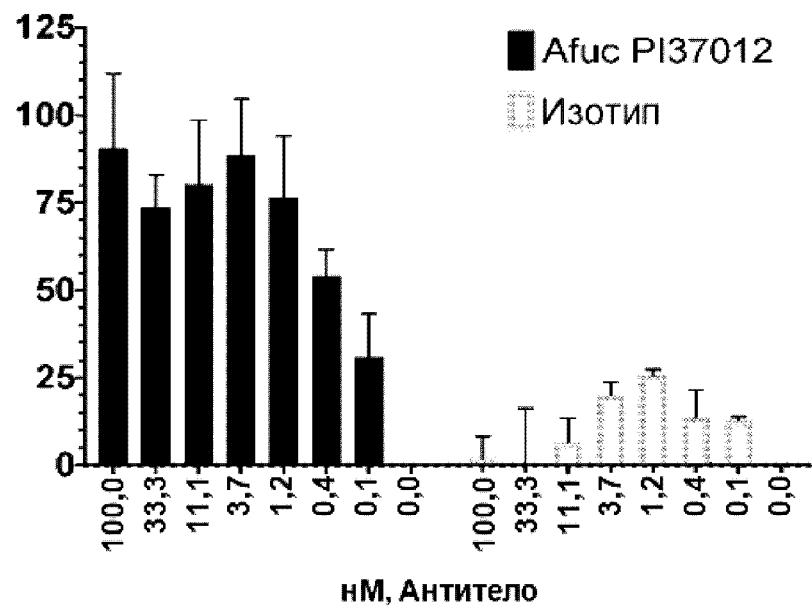


* Цифрами обозначен индекс окрашивания для каждой популяции определяемый как (антитело к TREM2 – изотипный контроль).

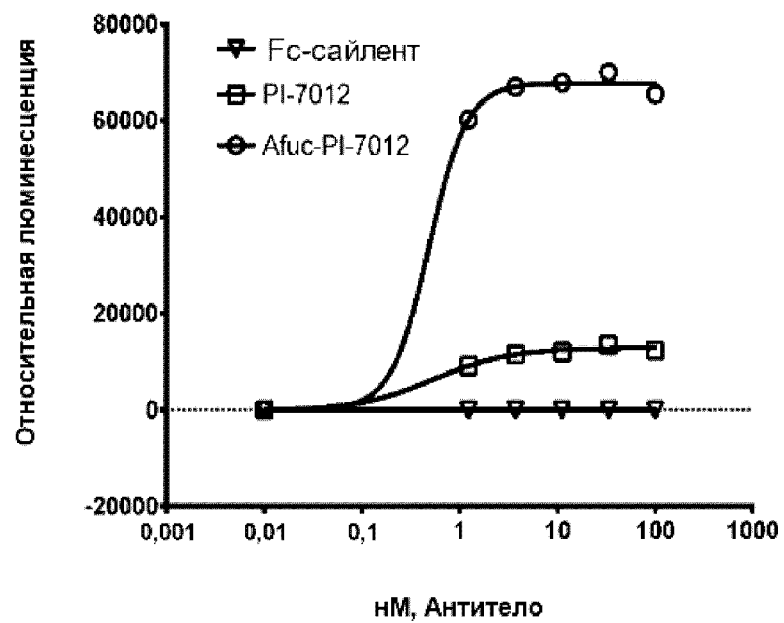
**НО = не оценивали

ФИГ. 6

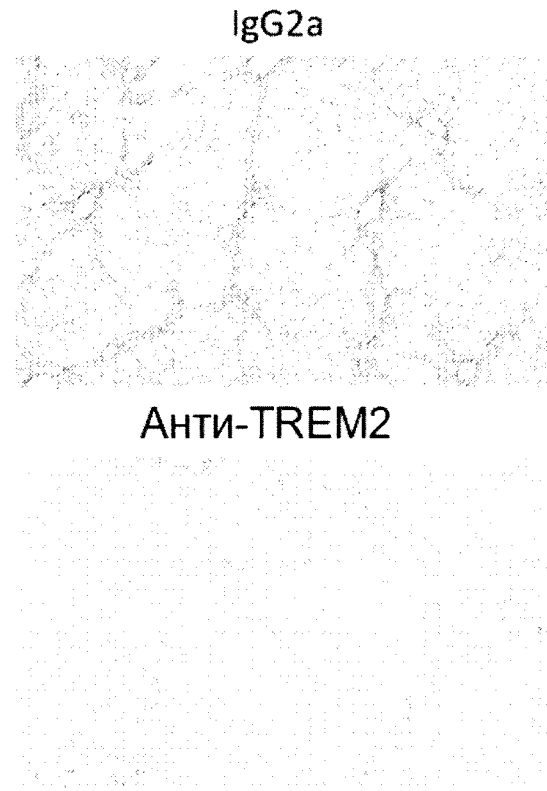
% Относительная цитотоксичность



ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9

