

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491592 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.09.04

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.12.16

(54) АНТИТЕЛА К PILRA, ИХ ПРИМЕНЕНИЕ И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ СПОСОБЫ И РЕАГЕНТЫ

(31) 63/290,930

(32) 2021.12.17

(33) US

(86) PCT/US2022/053245

(87) WO 2023/114515 2023.06.22

(88) 2023.08.17

(71) Заявитель:

ДЕНАЛИ ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Да Роза Клэр, Ким То Чин, Лизаинго
Кэтлин, Макдоналд Мэделин, Монро
Кэтрин М., Парк Джошуа И., Пропсон
Николаас И., Сабельстрём Ханна,
Теолис, мл., Ричард, Вираккоди
Таня Н., Ян Александр (US)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) В данном документе предложены антитела к PILRA с весьма желаемой селективностью: имеющие сравнимое связывание с белками PILRA яванского макака и человека, но гораздо более слабое связывание с белком PILRB человека, а также связывание как с вариантами G78, так и с вариантами R78 PILRA. Профили связывания и селективности антител, описанных в данном документе, позволяют применять их в исследованиях на животных (например, на обезьянах), не применяя суррогатную молекулу, а также при лечении субъектов с любым вариантом PILRA. Кроме того, в данном документе впервые описаны биологические открытия, связанные с PILRA и эффектами снижения сигналинга PILRA в клетках.

A1

202491592

202491592

A1

АНТИТЕЛА К PILRA, ИХ ПРИМЕНЕНИЕ, И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ СПОСОБЫ И РЕАГЕНТЫ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/290930, поданной 17 декабря 2021 г., раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Парный иммуноглобулин-подобный рецептор альфа 2 типа (PILRA) представляет собой трансмембранный рецептор, который экспрессируется на различных иммунных клетках, таких как микроглия, и, как полагают, функционирует в ингибирующих клеточных сигнальных путях. Миссенс-вариант (G78R) PILRA ассоциирован со снижением риска болезни Альцгеймера. Вариант G78R изменяет взаимодействие остатков, необходимых для взаимодействия с сиаловой кислоты, что приводит к снижению связывания нескольких лигандов PILRA.

Остается потребность в терапевтических агентах, которые модулируют активность PILRA.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе описаны антитела, которые селективно связываются как с PILRA яванского макака (супоPILRA), так и с hPILRA, но могут иметь сравнительно более низкое связывание с PILRB человека (hPILRB). Мы идентифицировали эпитопы, которые обеспечивают желаемую селективность. Этот профиль селективности является весьма выгодным, но в то же время очень сложным, учитывая высокую гомологию между супоPILRA и hPILRB. Наличие сравнимого связывания между белками яванского макака и человека позволяет проводить исследования на обезьянах, не используя суррогатные молекулы. Связывание с PILRB, напротив, нежелательно, поскольку PILRB, хотя и имеет внеклеточный домен, очень похожий на PILRA, содержит другой внутриклеточный домен, который, как ожидается, будет иметь отличающуюся или даже противоположную активность.

Кроме того, некоторые антитела с описанным в данном документе профилем селективности также связываются и проявляют активность в отношении обеих форм варианта PILRA (G78 и R78), что гарантирует, что их можно использовать в различных популяциях, учитывая, что частота каждого варианта сильно варьирует в зависимости от

региона мира.

Помимо разработки очень полезных антител, мы также сделали важные открытия, связанные с биологией PILRA, включая открытие некоторых нижестоящих эффекторов сигналинга PILRA, и впервые охарактеризовали эффекты снижения сигналинга рецептором PILRA в микроглии. Эти открытия позволяют впервые связать блокировку лиганда PILRA с биологическими эффектами в клетках, что обеспечивает новые подходы как для открытия лекарственных средств, так и для измерения биологического воздействия известных связывающих PILRA веществ на клетки и животных.

В одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который специфически связывается с парным иммуноглобулин-подобным рецептором альфа типа 2 яванского макака (супоPILRA), причем аффинность связывания с супоPILRA по меньшей мере в 2 раза (например, по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз) сильнее, чем аффинность связывания с человеческим парным иммуноглобулин-подобным рецептором бета 2 типа (hPILRB). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также связываются с человеческим парным иммуноглобулин-подобным рецептором альфа 2 типа (hPILRA).

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с парным иммуноглобулин-подобным рецептором альфа 2 типа (hPILRA) человека и PILRA яванского макака (супоPILRA), причем аффинность связывания с супоPILRA находится в пределах 100 раз (например, в пределах 90 раз, 80 раз, 70 раз, 60 раз, 50 раз, 40 раз, 30 раз, 20 раз, 10 раз, 5 раз, или 2 раз) относительно аффинности связывания с hPILRA.

В некоторых вариантах осуществления данного аспекта аффинность связывания с супоPILRA находится в пределах 50 раз (например, в пределах 45 раз, 40 раз, 35 раз, 30 раз, 25 раз, 20 раз, 15 раз, 10 раз, 5 раз, или 2 раз) относительно аффинности связывания с hPILRA. В некоторых вариантах осуществления данного аспекта аффинность связывания с супоPILRA находится в пределах 25 раз (например, в пределах 20 раз, 15 раз, 10 раз, 9 раз, 8 раз, 7 раз, 6 раз, 5 раз, 4 раз, 3 раз, или 2 раз) относительно аффинности связывания с hPILRA. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания с супоPILRA находится в пределах 10 раз (например, в пределах 9 раз, 8 раз, 7 раз, 6 раз, 5 раз, 4 раз, 3 раз, или 2 раз) относительно аффинности связывания с hPILRA. В определенных вариантах осуществления аффинность связывания с супоPILRA находится в пределах 5 раз (например, в пределах 4 раз, 3 раз или 2 раз) относительно аффинности связывания с hPILRA. В конкретных вариантах осуществления аффинность связывания с супоPILRA

находится в пределах 2 раз относительно аффинности связывания с hPILRA.

В некоторых вариантах осуществления данного аспекта антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с человеческим парным иммуноглобулин-подобным рецептором бета 2 типа (hPILRB) с более слабой аффинностью относительно hPILRA и супоPILRA. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания с hPILRA в по меньшей мере 10 раз (например, по меньшей мере 20 раз, 40 раз, 60 раз, 80 раз, 100 раз, 120 раз, 140 раз, 160 раз, 180 раз, 200 раз, 220 раз, 240 раз, 260 раз, 280 раз, или 300 раз) сильнее, чем аффинность связывания с hPILRB. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания с hPILRA в по меньшей мере 25 раз (например, по меньшей мере 30 раз, 35 раз, 40 раз, 45 раз, 50 раз, 55 раз, 60 раз, 80 раз, 100 раз, 120 раз, 140 раз, 160 раз, 180 раз, 200 раз, 220 раз, 240 раз, 260 раз, 280 раз, или 300 раз) сильнее, чем аффинность связывания с hPILRB. В определенных вариантах осуществления аффинность связывания с hPILRA в по меньшей мере 100 раз (например, по меньшей мере 110 раз, 120 раз, 130 раз, 140 раз, 150 раз, 160 раз, 170 раз, 180 раз, 190 раз, 200 раз, 220 раз, 240 раз, 260 раз, 280 раз, или 300 раз) сильнее, чем аффинность связывания с hPILRB.

В некоторых вариантах осуществления аспектов изобретения, описанных в данном документе, аффинность связывания с супоPILRA в по меньшей мере 10 раз (например, по меньшей мере 20 раз, 40 раз, 60 раз, 80 раз или 100 раз) сильнее, чем аффинность связывания с hPILRB. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания с супоPILRA в по меньшей мере 25 раз (например, по меньшей мере 30 раз, 35 раз, 40 раз, 45 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз) сильнее, чем аффинность связывания с hPILRB.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с человеческим парным иммуноглобулин-подобным рецептором альфа 2 типа (hPILRA), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с одной или более аминокислотами в одном или более из следующих положений: 63, 64, 78, 106, 143, 116–118 и 182–186, причем положения определены со ссылкой на последовательность SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с одной или более аминокислотами в одном или более из следующих положений: 78, 106 и 143. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с G78, K106 и E143 SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с R78, K106 и E143 SEQ ID NO:136.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент связываются с одной или более аминокислотами в одном или более из следующих положений: 63 и 64. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с T63 и A64 SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с одной или более аминокислотами в одном или более из следующих положений: 106, 116–118 и 182–186. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с K106 SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с Q116, K117 и/или Q118 SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с Q182, G183, K184, R185 и/или R186 SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления аспектов данного изобретения, описанных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(a) последовательность CDR1 тяжелой цепи (CDR-H1), имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:4–11 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:4–11;

(b) последовательность CDR2 тяжелой цепи (CDR-H2), имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:12-19 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:12–19;

(c) последовательность CDR3 тяжелой цепи (CDR-H3), имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:20-29 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:20–29;

(d) последовательность CDR1 легкой цепи (CDR-L1), имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:30-38 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:30–38;

(е) последовательность CDR2 легкой цепи (CDR-L2), имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:39-46 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:39-46; и

(f) последовательность CDR3 легкой цепи (CDR-L3), имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:47-53 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:47-53.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены являются консервативными заменами.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(i) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:4 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:4; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:12 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:12; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:20 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:20; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:30 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:30; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:39 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:39; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:47 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:47; или

(ii) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:5 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:5; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:13 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:13; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:22 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:22; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:31 или одну или более консервативных замен

последовательность SEQ ID NO:34 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:34; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:42 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:42; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:49 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:49; или

(vi) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:8 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:8; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:16 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:16; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:26 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:26; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:35 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:35; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:43 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:43; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:50 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:50.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(a) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность $GX_1TFX_2X_3X_4X_5X_6H$ (SEQ ID NO:74), где X_1 представляет собой F или Y; X_2 представляет собой D или I; X_3 представляет собой D или G; X_4 представляет собой Y или F; X_5 представляет собой A или Y; и X_6 представляет собой M или I;

(b) последовательность CDR-H2, содержащую последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5SGX_6X_7X_8$ (SEQ ID NO:75), где X_1 представляет собой G или W; X_2 представляет собой F, M, или I; X_3 представляет собой S или N; X_4 представляет собой W или P; X_5 представляет собой N или E; X_6 представляет собой S или D; X_7 представляет собой I или T; и X_8 представляет собой G или T;

(c) последовательность CDR-H3, содержащую последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9FDX_{10}$ (SEQ ID NO:76), где X_1 представляет собой D или отсутствует; X_2 представляет собой K или G; X_3 представляет собой S или N; X_4 представляет собой I или W; X_5 представляет собой S, G, или N; X_6 представляет собой A или F; X_7 представляет собой A или P; X_8 представляет собой G или D; X_9 представляет собой R или T; и X_{10} представляет собой Y, S, или F;

(d) последовательность CDR-L1, содержащую последовательность $X_1X_2SX_3X_4IX_5X_6YLN$ (SEQ ID NO:77), где X_1 представляет собой Q или R; X_2 представляет собой A или S; X_3 представляет собой R или Q; X_4 представляет собой R, G, или S; X_5 представляет собой N или S; и X_6 представляет собой N или I;

(e) последовательность CDR-L2, содержащую последовательность $X_1ASX_2LX_3X_4$ (SEQ ID NO:78), где X_1 представляет собой D или V; X_2 представляет собой N или S; X_3 представляет собой E или Q; и X_4 представляет собой T или S; и

(f) последовательность CDR-L3, содержащую последовательность $QQX_1X_2X_3X_4PX_5T$ (SEQ ID NO:79), где X_1 представляет собой Y или S; X_2 представляет собой D или Y; X_3 представляет собой N или S; X_4 представляет собой L или A; и X_5 представляет собой L или F.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(i) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:4; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:12; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:20; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:30; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:39; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:47; или

(ii) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:5; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:13; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:22; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:31; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:39; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:47; или

(iii) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:6; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:14; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:23; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:32; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:40; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:48.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(i) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:7; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:15; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:24; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:33; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:41; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:49; или

(ii) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:7; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:15; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:25; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:34; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:42; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:49; или

(iii) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:8; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:16; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:26; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:35; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:43; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:50.

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат: CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:7; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:15; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:24; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:33; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:41; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:49.

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат: CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:7; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:15; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:25; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:34; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:42; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:49.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H), которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO:54–63. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержат последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO:54–63. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержат последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 95% идентичности

последовательности (например, по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO:54–63. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержит последовательность V_H , содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 54–63.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержат последовательность варибельной области тяжелой цепи (V_H), которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO:137–144. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержат последовательность V_H , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO:137–144. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержат последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO:137–144. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержит последовательность V_H , содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 137–144.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержат последовательность варибельной области легкой цепи (V_L), которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO:64–73. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержат последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательностей (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO:64-73. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержат

последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO:64–73. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержит последовательность V_L , содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 64–73.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержат последовательность варибельной области легкой цепи (V_L), которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO:145–149. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержит последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательностей (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO:145-149. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержат последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO:145–149. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержит последовательность V_L , содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 145–149.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- (i) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:54, и последовательность V_L , содержащую SEQ ID NO:65; или
- (ii) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:56, и последовательность V_L , содержащую SEQ ID NO:66; или
- (iii) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:57, и последовательность V_L , содержащую SEQ ID NO:67; или
- (iv) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:58, и последовательность V_L , содержащую SEQ ID NO:68; или
- (v) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:59, и последовательность

V_L, содержащую SEQ ID NO:69; или

(vi) последовательность V_H, содержащую SEQ ID NO:60, и последовательность V_L, содержащую SEQ ID NO:70.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(i) последовательность V_H, содержащую SEQ ID NO:54, и последовательность V_L, содержащую SEQ ID NO:65; или

(ii) последовательность V_H, содержащую SEQ ID NO:56, и последовательность V_L, содержащую SEQ ID NO:66; или

(iii) последовательность V_H, содержащую SEQ ID NO:57, и последовательность V_L, содержащую SEQ ID NO:67.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(i) последовательность V_H, содержащую SEQ ID NO:137, и последовательность V_L, содержащую SEQ ID NO:145; или

(ii) последовательность V_H, содержащую SEQ ID NO:140, и последовательность V_L, содержащую SEQ ID NO:145; или

(iii) последовательность V_H, содержащую SEQ ID NO:143, и последовательность V_L, содержащую SEQ ID NO:146; или

(iv) последовательность V_H, содержащую SEQ ID NO:143, и последовательность V_L, содержащую SEQ ID NO:149.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит два полипептида F_c, образующие домен F_c. В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида F_c содержат последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности с последовательностью SEQ ID NO:94.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgG1.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело.

В другом аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с человеческим парным иммуноглобулин-подобным рецептором альфа 2 типа (hPILRA), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент распознают эпитоп, который является тем же самым или по существу такой же, как эпитоп, распознаваемый клоном антитела, выбранным из группы, состоящей из: клонов антител 1–39 в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления данного аспекта антитело или его антигенсвязывающий фрагмент распознают эпитоп, который является тем же или по существу таким же, как эпитоп, распознаваемый клоном антитела, выбранным из группы, состоящей из: клонов антител 2, 4 и 5.

В некоторых вариантах осуществления выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент антагонизируют активность hPILRA. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокируют связывание сиалированного белка с hPILRA. В некоторых вариантах реализации сиалированный белок представляет собой сиалированный NPDC1, PANP, HSV-1 gB, COLEC12, C4a, C4b, DAG1, или Clec4g.

В некоторых вариантах осуществления выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают или увеличивают фосфорилирование EGFR или STAT3; или ингибируют или снижают фосфорилирование STAT1.

В некоторых вариантах осуществления выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают миграцию клеток (например, миграцию микроглии).

В некоторых вариантах осуществления выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают экспрессию противовоспалительного гена или белка. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают экспрессию гена IL1RN.

В некоторых вариантах осуществления выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент снижают экспрессию или секрецию провоспалительного цитокинового белка. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент снижают экспрессию TNF, IL-6 и/или IP-10.

В некоторых вариантах осуществления выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают клеточное дыхание. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают митохондриальное дыхание. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают немитохондриальное дыхание.

В некоторых вариантах осуществления выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливают метаболизм жирных кислот (например, увеличивает окисление жирных кислот).

В некоторых вариантах осуществления выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент увеличивают выработку АТФ.

В некоторых вариантах осуществления выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не активируют периферические иммунные клетки. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не активируют нейтрофилы и моноциты.

В некоторых вариантах осуществления выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полностью человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, F(ab')₂, scFv или двухвалентный scFv.

В еще одном аспекте изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое конкурирует с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанным в данном документе, за связывание с hPILRA.

В еще одном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В еще одном аспекте изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе. В еще одном аспекте изобретение относится к вектору, содержащему полинуклеотид, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе. В другом аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей полинуклеотид, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую выделенное антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу получения выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина в условиях, в которых экспрессируется выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, кодируемые полинуклеотидом.

В еще одном аспекте изобретение относится к набору, содержащему: выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, или фармацевтическую композицию, описанную в данном документе; и инструкции по его применению.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу лечения нейродегенеративного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание выбрано из группы, состоящей из: болезни Альцгеймера, первичной возрастной таупатии, прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), лобно-височной деменции, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17, деменции с аргирофильным зерном, бокового амиотрофического склероза, бокового амиотрофического склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуама (БАС-КПД), кортикобазальной дегенерации, хронической травматической энцефалопатии, болезни Крейтцфельдта — Якоба, деменции боксеров, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, синдрома Дауна, семейной деменции британского типа, семейной деменции датского типа, болезни Герстмана — Штраусслера — Шейнкера, глобулярной глиальной таупатии, паркинсонизма гваделупского типа с деменцией, ПНП гваделупского типа, болезни Галлервордена — Шпатца, наследственной диффузной лейкоэнцефалопатии со сфероидами (НДЛС), болезни Хантингтона, миозита с тельцами включения, множественной системной атрофии, миотонической дистрофии, болезни Насу — Хакола, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, болезни Ниманна — Пика типа С, паллидо-пункто-нигральной дегенерации, болезни Паркинсона, болезни Пика, постэнцефалитного паркинсонизма, церебральной амилоидной ангиопатии, вызванной прионным белком, прогрессирующего субкортикального глиоза, подострого склерозирующего панэнцефалита и деменции, характеризующейся только клубками. В конкретных вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера.

В другом аспекте изобретение относится к способу определения того, обладает ли

молекула активностью в отношении белка PILRA, при этом способ включает: (a) приведение в контакт клетки, которая экспрессирует белок PILRA, с указанной молекулой; (b) либо до, одновременно с или после стадии (a), приведение в контакт клетки того же типа, что и на стадии (a), имеющей более низкую экспрессию PILRA, с указанной молекулой; и (c) измерение одного из следующих показателей: уровень фосфорилированного STAT3 (pSTAT3), уровень фосфорилированного STAT1 (pSTAT1), уровень фосфорилированного EGFR (pEGFR), экспрессия кадгерина, экспрессия интегрина и миграция микроглии в обеих клетках, при этом изменение уровня одного из этих измерений между клетками указывает на то, что молекула обладает активностью в отношении белка PILRA стадии (a).

В некоторых вариантах осуществления клетка, полученная на стадии (a), естественным образом экспрессирует белок PILRA. В некоторых вариантах осуществления клетка, имеющая более низкую экспрессию PILRA, имеет нокаут белка PILRA. В конкретных вариантах осуществления клетка представляет собой микроглию, такую как iMicroglia. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой iMicroglia с потерей функции PILRA.

В некоторых вариантах осуществления клетка, полученная на стадии (a), сконструирована или модифицирована для экспрессии или сверхэкспрессии белка PILRA. В некоторых вариантах осуществления клетка, имеющая более низкую экспрессию PILRA, естественным образом экспрессирует белок PILRA или не была сконструирована или модифицирована для экспрессии белка PILRA.

В некоторых вариантах осуществления молекула получена из библиотеки молекул. Известно, что в некоторых вариантах осуществления молекула связывает белок PILRA. В других вариантах осуществления неизвестно, связывает ли молекула белок PILRA. В некоторых вариантах осуществления молекула представляет собой антитело, пептид, малую органическую молекулу или нуклеиновую кислоту.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу определения того, модулирует ли молекула, которая связывает белок PILRA, сигнальный ответ или активность в экспрессирующей PILRA клетке, причем способ включает: (a) приведение клетки в контакт с молекулой; и (b) измерение одного из следующих показателей: уровень фосфорилированного STAT3 (pSTAT3), уровень фосфорилированного STAT1 (pSTAT1), уровень фосфорилированного EGFR (pEGFR), экспрессия кадгерина, экспрессия интегрина и миграция микроглии, при этом изменение уровня одного из измерения указывают, что молекула модулирует сигнальный ответ или активность в клетке, экспрессирующей PILRA.

В некоторых вариантах осуществления изменение представляет собой увеличение или снижение уровня одного из показателей, когда молекулу приводят в контакт с клеткой, относительно уровня в клетке без молекулы. Например, в некоторых вариантах осуществления изменение представляет собой повышение уровня pSTAT3, например, повышение уровня pSTAT3 Y705 и/или уровня pSTAT3 S727. В еще одном примере изменение представляет собой повышение уровня pEGFR. В еще одном примере изменение представляет собой увеличение уровня экспрессии и/или клеточной секреции подвижного белка (например, кадгерина, интегрина, такого как любой из описанных в данном документе). В еще одном примере изменение представляет собой увеличение миграции клеток (например, микроглии), которое можно измерить и количественно оценить с помощью анализов миграции клеток, таких как описано в Примере 4.

В некоторых вариантах осуществления клетка используется в анализе *in vitro*. В других вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления стадия (a) включает введение молекулы млекопитающему.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой микроглию, миелоидную клетку, моноцит или нейтрофил.

В еще одном аспекте изобретение относится к сконструированным человеческим индуцированным плюрипотентным стволовым клеткам (иПСК) или линии клеток, где иПСК модифицированы (т. е. генетически сконструированы) для экспрессии двух копий гена, который кодирует вариант R78 или вариант G78 белка PILRA. В некоторых вариантах осуществления иПСК модифицирована в эндогенном геномном локусе.

В еще одном аспекте изобретение относится к модели сконструированной микроглиальной клетки, полученной из человеческой индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (иПСК), причем иПСК был модифицирована (т. е. генетически сконструирована) для экспрессии двух копий гена, который кодирует вариант R78 или вариант G78 белка PILRA. В некоторых вариантах осуществления иПСК модифицирована в эндогенном геномном локусе. В некоторых вариантах осуществления модель сконструированных микроглиальных клеток получают путем направленной дифференцировки.

В еще одном аспекте изобретение относится подобранную пару клеточных линий, где: (a) первая линия клеток пары является гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA; и (b) вторая линия клеток пары является гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA, причем как первая, так и вторая линии клеток пары получена из одной и той же исходной линии клеток, и одна или обе линии клеток

были сконструированы по эндогенному гену PILRA. В некоторых вариантах осуществления исходная линия клеток является гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA. В других вариантах осуществления исходная линия клеток является гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA. В некоторых вариантах осуществления исходная линия клеток является гетерозиготной по гену, кодирующему вариант R78 и вариант G78 белка PILRA.

В некоторых вариантах осуществления подобранной пары линий клеток включена третья линия клеток, которая является гетерозиготной по гену, кодирующему вариант G78 и вариант R78 белка PILRA. В некоторых вариантах осуществления третья линия клеток получена из исходной клеточной линии, которая является гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 или вариант G78 белка PILRA.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу создания линии миелоидных клеток или линии стволовых клеток, способной дифференцироваться в линию миелоидных клеток (например, линию иПСК), с модифицированным геном PILRA, при этом способ включает: (а) определение того, является ли существующая линия миелоидных клеток или существующая линия стволовых клеток гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA, или гетерозиготной по гену, кодирующему R78 и варианты G78 белка PILRA; и (b) конструирование линии клеток путем модификации гена, кодирующего белок PILRA, для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA или вариант G78 белка PILRA, причем линия сконструированных клеток не была до конструирования гомозиготной по гену, кодирующему выбранный вариант.

В другом аспекте в изобретении предложен способ получения подобранной пары линий клеток, включающий: (а) определение того, является ли существующая линия миелоидных клеток или существующая линия стволовых клеток, способная дифференцироваться в линию миелоидных клеток (например, линию иПСК), гомозиготную по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA, гомозиготную по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA, или гетерозиготную по гену, кодирующему варианты R78 и G78 белка PILRA; и (b) получение (i) первой линии клеток путем модификации гена, кодирующего белок PILRA, для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA, и/или (ii) вторую линию клеток путем модификации гена, кодирующего белок PILRA, с получением линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA.

В некоторых вариантах осуществления линия сконструированных клеток до ее создания не была гомозиготной по гену, который кодирует выбранный вариант.

В некоторых вариантах осуществления существующая линия клеток, полученная на стадии (а), является гомозиготной по варианту R78 белка PILRA, а конструирование на стадии (b) включает модификацию существующей линии клеток для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA.

В других вариантах осуществления существующая линия клеток, полученная на стадии (а), является гомозиготной по варианту G78 белка PILRA, а конструирование на стадии (b) включает модификацию существующей линии клеток для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA.

В некоторых вариантах осуществления существующая линия клеток, полученная на стадии (а), является гетерозиготной по гену, кодирующему варианты R78 и G78 белка PILRA, а конструирование на стадии (b) включает модификацию существующей линии клеток для получения линии сконструированных клеток, которая является гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA, и линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу получения подобранной пары линий клеток из существующей линии миелоидных клеток или существующей линии стволовых клеток, способной дифференцироваться в линию миелоидных клеток (например, линию iPCK), которая является гетерозиготной по гену, кодирующему варианты R78 и G78 белка PILRA, причем способ включает: (а) конструирование существующей линии клеток для получения первой линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA; и (b) конструирование либо линии клеток, созданной на стадии (а), либо существующей линии клеток для получения второй линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу получения подобранной пары линий клеток из существующей линии миелоидных клеток или существующей линии стволовых клеток, способной дифференцироваться в линию миелоидных клеток (например, линию iPCK), которая является гетерозиготной по гену, кодирующему варианты R78 и G78 белка PILRA, причем способ включает: (а) конструирование существующей линии клеток для получения первой линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA; и (b) конструирование

либо линии клеток, полученной на стадии (а), либо существующей линии клеток для получения второй линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу получения подобранной пары линий клеток из существующей линии миелоидных клеток или существующей линии стволовых клеток, способной дифференцироваться в линию миелоидных клеток (например, линию иПСК), которая является гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA, причем способ включает: конструирование существующей линии клеток для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу получения подобранной пары линий клеток из существующей линии миелоидных клеток или существующей линии стволовых клеток, способной дифференцироваться в линию миелоидных клеток (например, линию иПСК), которая является гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA, причем способ включает: конструирование существующей линии клеток для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1A-1C: антитела к PILRA, связанные с hPILRA, экспрессируются на клетках HEK293 дозозависимым образом.

Фиг. 1D-1F: антитела к PILRA, связанные с hPILRA G78 или R78, которые экспрессируются на клетках HEK293 дозозависимым образом (Фиг. 1D и Фиг. 1F). Отсутствие связывания с исходными клетками HEK293 (Фиг. 1E). Данные выражены в виде медианной интенсивности флуоресценции, полученная с помощью технологии анализа методом FACS.

Фиг. 1G: антитела к PILRA связывались с hPILRA, который экспрессируется на клетках CHO-K1, и не связывались с исходными клетками CHO-K1.

Фиг. 1H и 1I: антитела к PILRA связывались с клетками CHO-K1, экспрессирующими hPILRA G78 (Фиг. 1H), дозозависимым образом и не связывались с исходными клетками CHO-K1 (Фиг. 1I). Данные выражены в виде медианной интенсивности флуоресценции, полученная с помощью технологии анализа методом FACS.

Фиг. 1J и 1K: антитела к PILRA связывались с микроглией, полученной из иПСК человека (Фиг. 1J), и не связывались с микроглией, полученной из человеческой иПСК человека, с потерей функции PILRA.

Фиг. 1L и 1M: антитела к PILRA, связанные с полученной из человеческих iPSC iMicroglia, гомозиготной по PILRA G78 (Фиг. 1L) или PILRA R78 (Фиг. 1M).

Фиг. 2A: антитела к PILRA связывались с клетками CHO-K1, экспрессирующими супоPILRA, и не связывались с клетками CHO-K1, экспрессирующими hPILRB, или с исходными клетками CHO-K1.

Фиг. 2B и 2C: антитела к PILRA связывались с клетками CHO, экспрессирующими супоPILRA (Фиг. 2B), дозозависимым образом и не связывались с клетками CHO, экспрессирующими hPILRB (Фиг. 2C).

На Фиг. 2D показано, что антитела к PILRA не связывались с клетками HEK293, сверхэкспрессирующими hPILRB-DAP12.

Фиг. 2E и 2F: эталонные антитела связывались с клетками CHO, экспрессирующими hPILRA, но не связывались с клетками CHO, экспрессирующими супоPILRA или hPILRB.

Фиг. 3A и 3B: репрезентативные сенсограммы SPR, полученные при регистрации связывания лиганда (Фиг. 3A) и при блокировании связывания лиганда антителами (Фиг. 3B).

Фиг. 3C-3F: обработка сиалидазой клеток HEK с PILRA G78 усиливала связывание антител к PILRA.

Фиг. 3G-3J: обработка сиалидазой клеток HEK с PILRA R78 имела минимальный эффект на связывание антитела к PILRA.

Фиг. 4A и 4B: iMicroglia с потерей функции PILRA имела повышенные уровни фосфорилированного EGFR Y1086 (Фиг. 4A) и STAT3 Y705 (Фиг. 4B) по сравнению с человеческой iMicroglia дикого типа в бессывороточной среде. На графиках показана интенсивность проявления пятен относительно фона в виде среднего значения +/- СОС. N = 2 биологических повтора. P>0,01, 2-факторный дисперсионный анализ.

Фиг. 4C-4E: антитела к PILRA специфически индуцировали pSTAT3 Y705, pSTAT3 S727 и pEGFR Y1086 в клетках HEK293, экспрессирующих hPILRA G78. Отсутствие индукции в исходных клетках HEK293 или с помощью антител изотипического контроля. Данные представлены в виде кратного среднего значения относительно фона (PBS) или кратного среднего значения +/- СОС относительно изотипического контроля (n=4 технические повторы).

Фиг. 4F: дозозависимая индукция pSTAT3 Y705 в клетках HEK293, экспрессирующих hPILRA G78. Дозу антител к PILRA титровали на клетках HEK293, экспрессирующих hPILRA G78, и индукцию pSTAT3 Y705 измеряли через 30 минут. Данные представлены в виде кратного среднего значения экспрессии +/- СОС

относительно изотипического контроля, n=2 технических повтора.

Фиг. 4G и 4H: дозу антител к PILRA титровали на клетках HEK, экспрессирующих PILRA 78G человека, и индуцировали pSTAT3 Y705 (Фиг. 4G) или pSTAT3 S727 (Фиг. 4H) через 30 минут.

Фиг. 4I: Индуцируемый антителом к PILRA pSTAT3 Y705 частично блокировался в течение 2 часов предварительной инкубацией с ингибитором mTORC1/2 AZD8055 (3,125-50 нМ) или ингибитором mTOR Torin1 (31,25-500 нМ) в клетках HEK293, экспрессирующих PILRA G7G. Данные представлены в виде кратного среднего значения экспрессии +/- СОС относительно контрольных клеток HEK293 (носитель ДМСО, изотипический контроль), n=1-4 технических повтора.

Фиг. 4J: антитела к PILRA блокировали индукцию pSTAT3 Y705 в клетках HEK293, экспрессирующих PILRA R78. Данные представлены в виде кратного среднего значения экспрессии +/- СОС относительно клеток PILRA G78, экспрессирующих клетки HEK293, n = 2-3 технических повтора.

Фиг. 4K и 4L: Дозу антител к PILRA титровали на человеческих клетках HEK293, экспрессирующих PILRA 78R, и индуцировали pSTAT3 Y705 (Фиг. 4K) или pSTAT3 S727 (Фиг. 4L) через 30 минут.

Фиг. 4M и 4N: iMicroglia с потерей функции PILRA показала более низкие уровни фосфорилирования STAT1 Y701 (Фиг. 4M) и общего STAT1 (Фиг. 4N) по сравнению с iMicroglia человека дикого типа в бессывороточной среде при исследовании с помощью профилирования фосфокиназной активности тест-системы AlphaLisa для определения общего уровня STAT1. На графике на Фиг. 4M показана интенсивность проявления пятен относительно фона в виде среднего значения +/- СОС. N = 2 биологических повтора. На графике на Фиг. 4N показана кратность экспрессии относительно дикого типа как среднее значение +/- СОС. N = 4 биологических повтора.

Фиг. 4O: клетки HEK293, экспрессирующие PILRA G78, показали более высокий уровень фосфорилирования STAT1 по сравнению с исходными клетками HEK293. Экспрессия показана как среднее значение +/- СОС. N = 3-4 биологических повтора.

Фиг. 4P: введение моноклонального антитела к PILRA в концентрации 100 нМ снижало уровни фосфорилированного STAT1 Y701 в человеческой iMicroglia дикого типа, которая воспроизводит фенотип iMicroglia с потерей функции PILRA. Экспрессия показана относительно PBS в виде среднего значения +/- СОС. N = 3 биологических повтора.

Фиг. 4Q и 4R: введение моноклональных антител к PILRA снижало уровни фосфорилирования STAT1 Y701 и общего STAT1, соответственно, в клетках HEK293,

экспрессирующих PILRA G78. Не наблюдали снижения исходных клеток НЕК293 или антитела изотипического контроля. На графиках показан кратность экспрессии относительно PBS в виде среднего значения +/- СОС. N=2-3 технических повтора.

Фиг. 5А: потеря функции PILRA способствует миграции микроглии человека в свободную от клеток зону детекции, через 120 часов после удаления пробки. Повторная экспрессия PILRA в человеческой микроглии с потерей функции PILRA (PILRA LoF + OE) восстановила миграцию до уровня, наблюдаемого в человеческой микроглии дикого типа.

Фиг. 5В и 5С: антитела к PILRA усиливали миграцию iMicroglial дикого типа в свободную от клеток зону детекции через 120 часов после удаления пробки, подобно клеткам iMicroglia с потерей функции PILRA. В iMicroglia с потерей функции PILRA и iMicroglia дикого типа вводили только носитель (PBS). Данные представлены в виде среднего значения +/- СОС, n=1-6 технических повторов.

Фиг. 5D и 5E: потеря функции PILRA усиливала миграцию iMicroglial к хемоаттрактанту комплемента 5a (C5a) (Фиг. 5D), а антитела к PILRA усиливали хемотаксис iMicroglia к C5a, аналогично клеткам iMicroglia с потерей функции PILRA (Фиг. 5E).

Фиг. 5F и 5G: антитела к PILRA усиливали секрецию iMicroglial интегринов (Фиг. 5F) и кадгеринов (Фиг. 5G) в супернатант после 4 дней обработки.

Фиг. 6А и 6В: потеря функции PILRA способствовала экспрессии гена IL1RN (Фиг. 6А) и стимулировала секрецию цитокина IL1RA (Фиг. 6В) в iMicroglia с потерей функции PILRA по сравнению с iMicroglia дикого типа в бессывороточной среде. Данные представлены в виде среднего значения +/- СОС, n=3 технических повтора.

Фиг. 6С: антитела к PILRA стимулировали секрецию цитокина IL1RA в iMicroglia дикого типа в бессывороточной среде, имитируя фенотип, наблюдаемый для iMicroglia с потерей функции PILRA. Данные представлены в виде среднего значения +/- СОС, n=3 технических повтора.

Фиг. 6D-6F: Потеря функции PILRA подавляла LPS-индуцированные изменения экспрессии генов TNF, IL-6 и CXCL10 в iMicroglia с потерей функции PILRA по сравнению с iMicroglia дикого типа. Данные представлены как среднее значение +/- СОС, n = 3 технических повтора.

Фиг. 6G-6I: Потеря функции PILRA подавляла LPS-индуцированные изменения экспрессии цитокинов TNF-альфа, IL-6 и IP-10 в iMicroglia с потерей функции PILRA по сравнению с iMicroglia дикого типа. Данные представлены как среднее значение +/- СОС, n = 3 технических повтора.

Фиг. 6J-6O: антитела к PILRA ослабляли индуцированную LPS секрецию цитокинов IP-10, TNF-альфа и IL-6 в iMicroglia дикого типа, имитируя фенотип, наблюдаемый в iMicroglia с потерей функции PILRA. Данные представлены в виде среднего значения +/- СОС, n=3 технических повтора.

Фиг. 6P и 6Q: антитела к PILRA (100 нМ) ослабляли индуцированную LPS секрецию цитокинов IP-10 в гомозиготной экспрессирующей PILRA G78 (Фиг. 6P) и R78 (Фиг. 6Q) iMicroglia, полученной из иПСК, в бессывороточной среде.

Фиг. 7A и 7B: iMicroglia с потерей функции PILRA продемонстрировала повышенное максимальное дыхание и резервный митохондриальный потенциал. Повторная экспрессия PILRA в iMicroglia с потерей функции PILRA, экспрессирующей hPILRA (PILRA LoF + OE), восстанавливала митохондриальное дыхание до уровней, соответствующих дикому типу. n= 5 технических повторов.

Фиг. 7C-7F: антитела к PILRA повышали максимальное дыхание и резервный дыхательный потенциал митохондрий в iMicroglia дикого типа по сравнению с изотипическим контролем. Дополнительного влияния антител на iMicroglia с потерей функции PILRA не наблюдали, что указывает на специфичность антител. n= 6 технических повторов.

Фиг. 7G и 7H: индуцированное фибриллами Abeta1-42 снижение скорости немитохондриального потребления кислорода iMicroglia дикого типа (серый столбец на Фиг. 7G) было восстановлено с помощью антитела к PILRA (полосатый серый столбец на Фиг. 7H). n=6 технических повторностей.

Фиг. 7I и 7J: iMicroglia с потерей функции PILRA демонстрировала более высокую митохондриальную активность OXPHOS с повышенной выработкой АТФ, а антитела к PILRA воспроизводили эффект потери функции PILRA в человеческой iMicroglia дикого типа с усилением скорости генерации АТФ. n=6 технических повторов.

Фиг. 8A-8D: антитело к PILRA связывалось *ex vivo* с моноцитами (Фиг. 8A) и нейтрофилами (Фиг. 8B). Антитело к PILRA не связывалось с В-клетками и Т-клетками (Фиг. 8C и 8D).

Фиг. 8E-8G: в клетках, обработанных антителом к PILRA, не наблюдали повышенного уровня CD25 (Фиг. 8E) или HLA-DR (Фиг. 8F и 8G).

Фиг. 8H и 8I: человеческие лейкоциты *ex vivo* не увеличивали выработку провоспалительных цитокинов после обработки антителами к PILRA в концентрации 100 нМ в водной (Фиг. 8H) или твердой (Фиг. 8I) фазах в течение 24 часов.

Фиг. 9A: молекулярная структура, демонстрирующая эпитопы hPILRA антител к PILRA.

Фиг. 9B: группы эпитопов для антител к PILRA по связыванию PILRA человека.

Фиг. 10: выравнивание последовательностей ВКД и стеблевой области супоPILRA, hPILRA и hPILRB (положения определены относительно последовательности SEQ ID NO:1).

Фиг. 11: эталонные антитела №1-№4 связывались с клетками CHO-K1, экспрессирующими hPILRA G78, и не связались с клетками CHO-K1, экспрессирующими hPILRB или супоPILRA G78 (положения определены со ссылкой на последовательность SEQ ID NO:1).

Фиг. 12A и 12B: антитело к PILRA достигло целевого взаимодействия в головном мозге и плазме через 1 день и 4 дня после введения дозы 50 мг/кг мышам ВАСtg, экспрессирующим PILRA человека.

Фиг. 12C-12H: антитело к PILRA продемонстрировало IgG-подобную фармакокинетику в головном мозге, плазме, печени, легких, селезенке и костном мозге через 1 день и 4 дня после внутривенного введения 50 мг/кг мышам ВАСtg, экспрессирующим PILRA человека.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. ВВЕДЕНИЕ

PILRA представляет собой ингибирующий трансмембранный рецептор, который экспрессируется на клеточной поверхности различных иммунных клеток, таких как микроглия, моноциты, макрофаги, дендритные клетки и нейтрофилы. Не привязываясь к конкретной теории, считается, что при связывании лиганда PILRA действует как ингибирующий рецептор, рекрутируя цитоплазматические фосфатазы, такие как RTPN6/SHP-1 и RTPN11/SHP-2, через их домены SH2, которые блокируют сигналинг через дефосфорилирование сигнальных молекул. Миссенс-вариант (G78R) PILRA изменяет карман связывания сиаловой кислоты в PILRA, что приводит к снижению связывания PILRA с несколькими его лигандами, одним из которых является сиалированный гликопротеин В вируса простого герпеса 1 типа (gB HSV-1). Предполагается, что инфекция HSV-1 присутствует у некоторых пациентов с болезнью Альцгеймера. Предполагается, что вариант PILRA G78R защищает людей от болезни Альцгеймера путем антагонизации или снижения сигналинга PILRA, тем самым модифицируя реакции микроглии.

Как подробно описано в разделе «Примеры» ниже, были получены антитела, которые специфически связываются с PILRA человека (hPILRA) и модулируют одну или более функций микроглии, регулируемых PILRA. В частности, мы впервые идентифицировали антитела, обладающие весьма желательными характеристиками. К

ним относятся антитела, которые селективно связываются как с PILRA яванского макака («супо») (супоPILRA), так и с hPILRA, но могут иметь сравнительно более низкое связывание с PILRB человека (hPILRB). Это очень выгодно, но и очень сложно, учитывая высокую гомологию между супоPILRA и hPILRB. Наличие сравнимого связывания между PILRA яванского макака и человека позволяет проводить исследования на обезьянах без необходимости использования суррогатной молекулы. Связывание с PILRB нежелательно, поскольку считается, что PILRB обладает различной или противоположной активностью по сравнению с PILRA, учитывая различия в их соответствующих внутриклеточных доменах. Определенные антитела, описанные в данном документе, могут связываться с супоPILRA с аффинностью связывания, которая находится в пределах 100 раз (например, в пределах 90 раз, 80 раз, 70 раз, 60 раз, 50 раз, 40 раз, 30 раз, 20 раз, 10 раз, 5 раз или 2 раза) относительно аффинности связывания с hPILRA. Антитела также могут иметь аффинность связывания с hPILRA в по меньшей мере 10 раз (например, по меньшей мере 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 35 раз, 40 раз, 45 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, или 100 раз) сильнее, чем его аффинность связывания с hPILRB. В некоторых вариантах осуществления антитела дополнительно содержат полипептид Fc, который может содержать (i) мутации, которые снижают или устраняют эффекторную функцию, и/или (ii) мутации, которые увеличивают период полужизни *in vivo*, например, за счет увеличения связывания Fc антитела с неонатальным Fc-рецептором (FcRn).

Мы также обнаружили, что антитела, связывающиеся с определенными аминокислотными остатками последовательности PILRA, могут придавать желаемые свойства. К ним относятся 63, 64, 78, 106, 143, 116–118 и 182–186. В конкретных примерах мы демонстрируем, что антитела, которые связываются с эпитопом, который включает (i) G78, K106 и E143 или (ii) T63 и A64 hPILRA, также могут связывать супоPILRA, но имеют сниженное связывание с hPILRB.

II. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Употребляемые в данном документе формы единственного числа включают ссылки на формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на «антитело» необязательно включает комбинацию двух или более таких молекул и тому подобное.

В контексте данного документа термины «около» и «приблизительно», когда они используются для изменения количества, указанного в числовом значении или диапазоне, указывают, что числовое значение, а также разумные отклонения от значения, известные специалисту в данной области техники, например $\pm 20\%$, $\pm 10\%$ или $\pm 5\%$, находятся в пределах предполагаемого значения указанного значения.

В контексте данного документа термин «PILRA» относится к белку парного иммуноглобулин-подобного рецептора альфа 2 типа, который кодируется геном *PILRA*. В контексте данного документа «PILRA» или «белок PILRA» относится к нативному (т. е. дикого типа) белку PILRA любого позвоночного животного, такого как человек, приматы, не относящиеся к человеку, (например, яванский макак), грызуны (например, мыши, крысы) и другие млекопитающие, но не ограничиваясь ими. В некоторых вариантах осуществления белок PILRA представляет собой белок PILRA человека (hPILRA), имеющий последовательность SEQ ID NO:1:

MGRPLLLPLLPLLLPPAFLQPSGSTGSGPSYLYGVTQPKHLSASMGGGSVEIPFSFY
YPWELATAPDVRISWRRGHFHGQSFYSTRPPSIHKDYVNRLFLNWTEGQKSGFLRISNL
QKQDQSVYFCRVELDTRSSGRQQWQSIEGTKLSITQAVTTTTQRPSSMTTWTWRLSSTTTT
TGLRVTQGKRRSDSWHISLETAVGVAVAVTVLGIMILGLICLLRWRRRKGGQRTKATTP
AREPFQNTTEEPYENIRNEGQNTDPKLNPKDDGIVYASLALSSSTSPRAPPShRPLKSPQNE
TLYSVLKA.

В некоторых вариантах осуществления белок PILRA представляет собой белок PILRA яванского макака (супоPILRA), имеющий последовательность SEQ ID NO:2:

MGRPLLLPLLPLLLPPAFLQPGGSAGSGSPGYGVTQPKHLSAPMGGGSVEIP
FSFYHPWELAAAPNMKISWRRGNFHGEFFYRTRPAFIHEDYSNRLLLNWTEGQDRGLLR
IWNLRKEDQSVYFCRVELDTRRSGRQRWQSIEGTKLTITQAVTTTTTQRPSSMTTTRRPSS
ATTTAGLRVTQGKRHSDSWHLSLKTAVGVTVAVAVLGLIMILGLICLLRWRRRKGGQRT
KATTPAKEPFQNTTEEPYENIRNEGQNTDPKPNPKDDGIVYASLALSSSTSPRVPPSHHPLK
SPQNETLYSVLKV.

В контексте данного документа термин «PILRB» относится к белку парного иммуноглобулин-подобного рецептора бета 2 типа, который кодируется геном *PILRB*. В контексте данного документа «PILRB» или «белок PILRB» относится к нативному (т. е. дикого типа) белку PILRB любого позвоночного животного, такого как человек, приматы, не относящиеся к человеку, (например, яванский макак), грызуны (например, мыши, крысы) и другие млекопитающие, но не ограничиваясь ими. В некоторых вариантах осуществления белок PILRB представляет собой белок PILRB человека (hPILRB), имеющий последовательность SEQ ID NO:3:

MGRPLLLPLLLLQPPAFLQPGGSTGSGPSYLYGVTQPKHLSASMGGGSVEIPFSFY
YPWELAIVPNVRISWRRGHFHGQSFYSTRPPSIHKDYVNRLFLNWTEGQESGFLRISNLR
KEDQSVYFCRVELDTRRSGRQQLQSIKGTKLTITQAVTTTTTWRPSSTTTIAGLRVTESK
GHSESWHLSLDTAIRVALAVAVLKTIVLGLLCLLLLWRRRRKGSRAPSSDF.

В контексте данного документа термин «антитело к PILRA» относится к антителу,

которое специфически связывается с белком PILRA (например, PILRA человека).

В контексте данного документа термин «антитело» относится к белку с характерной для иммуноглобулинов укладкой цепей, который специфически связывается с антигеном через свои переменные области. Термин охватывает интактные поликлональные антитела, интактные моноклональные антитела, включая полноразмерные антитела, а также одноцепочечные антитела, полиспецифические антитела, такие как биспецифические антитела, моноспецифические антитела, моновалентные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела и человеческие антитела. В контексте данного документа термин «антитело» также включает фрагменты антител, которые сохраняют специфичность связывания через свои переменные области, включая, но не ограничиваясь этим, Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, и двухвалентный scFv. Антитела могут содержать легкие цепи, которые классифицируются как каппа или лямбда. Антитела могут содержать тяжелые цепи, которые классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon, которые, в свою очередь, определяют классы иммуноглобулинов, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно.

В контексте данного документа термин «полноразмерное антитело», как правило, относится к молекуле иммуноглобулина, которая имеет четыре полипептидные цепи: две тяжелые цепи и две легкие цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит, от N-конца к C-концу, из переменной области тяжелой цепи (V_H), константного домена CH1, шарнирной области, константного домена CH2 и константного домена CH3. Каждая легкая цепь состоит, от N-конца к C-концу, из переменной области легкой цепи (V_L) и константного домена CL. Домен или фрагмент Fab формируется из доменов V_H, CH1, V_L, и CL. Полноразмерное антитело также можно описать как имеющее два домена Fab и домен Fc, где домен Fc содержит два полипептида Fc, и каждый полипептид Fc может включать домен CH2, домен CH3 и может содержать по меньшей мере часть шарнирной области антитела.

В контексте данного документа термин «антигенсвязывающая часть антитела к PILRA» относится к антигенсвязывающему сегменту или соединению, которые специфически связываются с белком PILRA (например, hPILRA и/или супоPILRA). Термины «антигенсвязывающая часть» и «антигенсвязывающий фрагмент» используются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, белок PILRA) через его переменную область. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются ими, фрагмент Fab (моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L, V_H, CL и CH1), фрагмент F(ab')₂

(двухвалентный фрагмент, состоящий из двух фрагментов Fab, соединенных дисульфидным мостиком в области петли), одноцепочечный Fv (scFv), дисульфид-связанный Fv (dsFv), определяющие комплементарность области (CDR), V_L (вариабельную область легкой цепи) и V_H (вариабельную область тяжелой цепи).

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену в тяжелой цепи или легкой цепи антитела, полученному из гена вариабельности (V), гена разнообразия (D) или гена присоединения (J) зародышевой линии (и не происходит из генного сегмента константной области (C_μ и C_δ)), и это придает антителу его специфичность в отношении связывания с антигеном. Как правило, вариабельная область антитела включает четыре консервативные «каркасные» области, перемежающихся с тремя гипервариабельными «определяющими комплементарность областями».

Термин «определяющая комплементарность область» или «CDR» относится к трем гипервариабельным областям в каждой цепи, которые прерывают четыре каркасные области, образованные вариабельными областями легкой и тяжелой цепей. CDR в первую очередь ответственны за связывание антитела с эпитопом антигена. CDR каждой цепи обычно обозначают как CDR1, CDR2 и CDR3, пронумерованные последовательно, начиная с N-конца, и также обычно идентифицируются указанием цепи, в которой находится конкретная CDR. Таким образом, CDR3 V_H или CDR-H3 находится в вариабельной области тяжелой цепи антитела, в которой он обнаружен, тогда как CDR1 V_L или CDR-L1 представляет собой CDR1 вариабельной области легкой цепи антитела, в которой он обнаружен.

«Каркасные области» или «FR» различных легких или тяжелых цепей относительно консервативны в пределах вида. Каркасная область антитела, то есть, объединенные каркасные области составляющих легкой и тяжелой цепей, служит для локализации и выравнивания CDR в трехмерном пространстве. Каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных ссылок, которые включают последовательности генов антител зародышевой линии. Например, последовательности ДНК зародышевой линии для генов вариабельной области тяжелой и легкой цепей человека можно найти в базе данных вариабельных генов зародышевой линии «VBASE2» для последовательностей человека и мыши.

Аминокислотные последовательности CDR и каркасных областей могут быть определены с использованием различных хорошо известных определений в данной области техники, *например*, по Kabat, Chothia, международной базы данных ImMunoGeneTics (IMGT), AbM и наблюдаемых контактов антигенов («Contact»). В

некоторых вариантах осуществления CDR определяются в соответствии с определением Contact. См., MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 262:732-745 (1996). В некоторых вариантах осуществления CDR определяются комбинацией определений Kabat, Chothia и/или Contact CDR.

Термин «эпитоп» относится к участку или области антигена, с которой специфически связываются CDR антитела, и может включать несколько аминокислот или части нескольких аминокислот, например, 5 или 6, или более, например, 20 или более аминокислот, или частей этих аминокислот. Например, когда мишенью является белок, эпитоп может состоять из последовательных аминокислот (например, линейного эпитопа) или аминокислот из разных частей белка, которые сближаются при укладке белка (например, прерывистый или конформационный эпитоп). В некоторых вариантах осуществления эпитоп фосфорилирован по одной аминокислоте (например, по сериновому или треониновому остатку).

Используемая в данном документе фраза «распознает эпитоп», как используется в отношении антитела к PILRA, означает, что CDR антитела взаимодействуют или специфически связываются с антигеном (например, белок PILRA) в этом эпитопе или частью антигена, содержащей этот эпитоп.

«Моноклональное антитело» относится к антителам, продуцируемым одним клоном клеток или одной линией клеток, и состоящим или состоящим по существу из молекул антител, которые идентичны по своей первичной аминокислотной последовательности.

«Поликлональное антитело» относится к антителу, полученному из гетерогенной популяции антител, в которой различные антитела в популяции связываются с различными эпитопами антигена.

«Химерное антитело» относится к молекуле антитела, в которой константная область или ее часть изменена, заменена или обменена так, что антигенсвязывающий сайт (т. е. переменная область, CDR или ее часть) связан с константной областью отличного или измененного класса, эффекторной функции и/или вида, или в которой переменная область или ее часть изменена, заменена или обменена на переменную область, имеющую отличную или измененную антигенную специфичность (например, CDR и каркасные области от разных видов). В некоторых вариантах осуществления химерное антитело представляет собой моноклональное антитело, содержащее переменную область из одного источника или вида (например, мыши) и константную область, полученную из второго источника или вида (например, человека). Способы получения химерных антител описаны в данной области техники.

«Гуманизированное антитело» представляет собой химерный иммуноглобулин, полученный из не относящегося к человеку источника (например, мышиный), который содержит минимальные последовательности, полученные из не относящегося к человеку иммуноглобулина вне CDR. В общем, гуманизированное антитело будет содержать по меньшей мере один (*например*, два) антигенсвязывающий переменный домен(ы), в котором области CDR по существу соответствуют областям иммуноглобулина не относящегося к человеку животного, а каркасные области по существу соответствуют областям последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело также может содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, последовательность иммуноглобулина человека. Способы гуманизации антител известны в данной области техники.

«Человеческое антитело» или «полностью человеческое антитело» представляет собой антитело, имеющее последовательности тяжелой и легкой цепей человека, обычно полученные из генов зародышевой линии человека. В некоторых вариантах осуществления антитело продуцируется клеткой человека, животным, отличным от человека, которое использует репертуар антител человека (*например*, трансгенные мыши, которые генетически сконструированы для экспрессии последовательностей антител человека) или платформами фагового дисплея.

Термин «специфически связывается» относится к молекуле (*например*, антителу или его антигенсвязывающей части), которая связывается с эпитопом или мишенью с большей аффинностью, большей авидностью и/или большей продолжительностью с этим эпитопом или мишенью в образце, чем она связывается с другим эпитопом или нецелевым соединением (*например*, структурно другим антигеном). В некоторых вариантах осуществления антитело (или его антигенсвязывающая часть), которое специфически связывается с эпитопом или мишенью, представляет собой антитело (или его антигенсвязывающую часть), которое связывается с эпитопом или мишенью с по меньшей мере в 1,5 раза большей аффинностью по сравнению с другими эпитопами или нецелевыми соединениями, *например*, с по меньшей мере в 1,5 раза, 2,5 раза, 5 раз, 10 раз, 100 раз, 1000 раз, 10000 раз или большей аффинностью. Термин «специфическое связывание», «специфически связывается с» или «является специфичным в отношении» конкретного эпитопа или мишени, используемый в данном документе, может проявляться, *например*, молекулой, имеющей равновесную константу диссоциации K_D для эпитопа или мишени, с которыми она связывается, *например*, 10^{-4} М или меньше, *например*, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, или 10^{-12} М. Специалисту будет понятно, что антитело, которое специфически связывается с мишенью (*например*, белком P1LRA

(например, hPILRA и/или супоPILRA)) одного вида, может также специфически связываться с ортологами этой мишени.

Термин «аффинность связывания» используется в данном документе для обозначения силы нековалентного взаимодействия между двумя молекулами, например, между антителом (или его антигенсвязывающей частью) и антигеном. Так, например, этот термин может относиться к взаимодействию 1:1 между антителом (или его антигенсвязывающей частью) и антигеном, если иное не указано или не ясно из контекста. Аффинность связывания может быть определена количественно путем измерения равновесной константы диссоциации (K_D), которая относится к константе скорости диссоциации (k_d , время⁻¹), деленной на константу скорости ассоциации (k_a , время⁻¹ M⁻¹). K_D можно определить путем измерения кинетики образования и диссоциации комплекса, например, с использованием методов поверхностного плазмонного резонанса (SPR), например, системы Biacore™; анализов кинетического исключения, такие как KinExA®; и интерферометрии BioLayer (например, с использованием платформы ForteBio® Octet). В контексте данного документа «аффинность связывания» включает не только формальные аффинности связывания, например, отражающее взаимодействие 1:1 между антителом (или его антигенсвязывающей частью) и антигеном, но и кажущиеся аффинности, для которых рассчитывают значения K_D , которые могут отражать avidное связывание.

Термин «вступать в перекрестную реакцию», в контексте данного документа, относится к способности антитела связываться с антигеном отличным от антигена, против которого было выработано антитело. В некоторых вариантах осуществления перекрестная специфичность относится к способности антитела связываться с антигеном другого вида, чем антиген, против которого было выработано антитело. В качестве неограничивающего примера, антитело к PILRA, как описано в данном документе, образованное в ответ на пептид PILRA человека, может проявлять перекрестную реактивность с пептидом или белком PILRA другого вида (например, яванского макака или мыши).

Термин «модулировать» относится к изменению или изменению одного или более свойств белка или клетки. Свойства клетки могут быть изменены в результате изменения одного или более свойств белка (например, белка PILRA) клетки, т. е. путем связывания с белком клетки. Свойства клетки, которые можно модулировать, включают, помимо прочего, рост клеток, миграцию, выживаемость, сигналинг, фагоцитоз и секрецию биомаркеров. Например, молекула, которая связывается с белком PILRA клетки, может вызывать один или более нисходящих сигнальных ответов или активности клетки в результате связывания PILRA, таким образом, говорят, что молекула модулирует

сигнальные ответы или активности клетки. В некоторых вариантах осуществления термин «модулировать» может относиться к увеличению или снижению сигнального ответа или активности клетки в результате связывания PILRA по сравнению с сигнальным ответом или активностью клетки без связывания PILRA. Примеры изменений в сигнальных ответах или активности клетки в результате связывания PILRA включают, помимо прочего, изменения уровня фосфорилированного STAT3 (pSTAT3), уровня фосфорилированного STAT1 (pSTAT1), уровня фосфорилированного EGFR (pEGFR), экспрессии кадгерина, экспрессии интегрина и миграции клеток (например, микроглии).

В контексте данного документа термины «домен CH3» и «домен CH2» относятся к полипептидам домена константной области иммуноглобулина. В контексте антитела IgG, полипептид домена CH3 относится к сегменту аминокислот от примерно положения 341 до примерно положения 447, как пронумеровано в соответствии со схемой нумерации EU, а полипептид домена CH2 относится к сегменту аминокислот примерно с положения 231 до примерно положения 340, как пронумеровано в соответствии со схемой нумерации EU. Полипептиды доменов CH2 и CH3 также могут быть пронумерованы в соответствии со схемой нумерации IMGT (ImMunoGeneTics), в которой нумерация доменов CH2 соответствует 1–110, а нумерация доменов CH3 соответствует 1–107, согласно Научной системе нумерации IMGT (веб-сайт IMGT). Домены CH2 и CH3 являются частью области Fc иммуноглобулина. В контексте антител IgG область Fc относится к сегменту аминокислот от около положения 231 до около 447, пронумерованного в соответствии со схемой нумерации EU. В контексте данного документа термин «область Fc» также может содержать по меньшей мере часть шарнирной области антитела. Иллюстративная последовательность частичной шарнирной области представляет собой DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:98).

Термины «соответствующий», «определенный со ссылкой на» или «пронумерованный со ссылкой на», используемые в контексте идентификации заданного аминокислотного остатка в полипептидной последовательности, относятся к положению остатка указанной эталонной последовательности, когда заданную аминокислотную последовательность максимально выравнивают и сравнивают с эталонной последовательностью. Так, например, аминокислотный остаток в полипептиде «соответствует» аминокислоте в SEQ ID NO:1, когда остаток выравнивается с аминокислотой в SEQ ID NO:1 при оптимальном выравнивании с SEQ ID NO:1. Полипептид, который выравнивается с эталонной последовательностью, не обязательно должен быть той же длины, что и эталонная последовательность.

В контексте данного документа термин «полипептид Fc» относится к C-концевой

области природного полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина, который характеризуется укладкой Ig в виде структурного домена. Полипептид Fc содержит последовательности константной области, включая по меньшей мере домен CH2 и/или домен CH3, и может содержать по меньшей мере часть шарнирной области, но не содержит вариабельную область.

«Модифицированный полипептид Fc» относится к полипептиду Fc, который имеет по меньшей мере одну мутацию, например замену, делецию или вставку, по сравнению с последовательностью полипептида Fc тяжелой цепи иммуноглобулина дикого типа, но сохраняет общую укладку Ig или структуру нативного полипептида Fc.

Термин «выделенный», используемый со ссылкой на нуклеиновую кислоту или белок (например, антитело), означает, что нуклеиновая кислота или белок, по существу, свободны от других клеточных компонентов, с которыми они связаны в естественном состоянии. Чистоту и гомогенность обычно определяют с использованием методов аналитической химии, таких как электрофорез (например, электрофорез в полиакриламидном геле) или хроматография (например, высокоэффективная жидкостная хроматография). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или белок (например, антитело) имеет чистоту по меньшей мере 85%, чистоту по меньшей мере 90%, чистоту по меньшей мере 95% или чистоту по меньшей мере 99%.

Термин «аминокислота» относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также аминокислотным аналогам и аминокислотным миметикам, которые функционируют подобно встречающимся в природе аминокислотам. Природные аминокислоты представляют собой аминокислоты, закодированные генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые впоследствии модифицированы, например, гидроксипролин, γ -карбокsigлутамат и O-фосфосерин. Природные α -аминокислоты включают, без ограничения, аланин (Ala), цистеин (Cys), аспарагиновую кислоту (Asp), глутаминовую кислоту (Glu), фенилаланин (Phe), глицин (Gly), гистидин (His), изолейцин (Ile), аргинин (Arg), лизин (Lys), лейцин (Leu), метионин (Met), аспарагин (Asn), пролин (Pro), глутамин (Gln), серин (Ser), треонин (Thr), валин (Val), триптофан (Trp), тирозин (Tyr) и их комбинации. Стереоизомеры природных α -аминокислот включают, без ограничения, D-аланин (D-Ala), D-цистеин (D-Cys), D-аспарагиновую кислоту (D-Asp), D-глутаминовую кислоту (D-Glu), D-фенилаланин (D-Phe), D-гистидин (D-His), D-изолейцин (D-Ile), D-аргинин (D-Arg), D-лизин (D-Lys), D-лейцин (D-Leu), D-метионин (D-Met), D-аспарагин (D-Asn), D-пролин (D-Pro), D-глутамин (D-Gln), D-серин (D-Ser), D-треонин (D-Thr), D-валин (D-Val), D-триптофан (D-Trp), D-тирозин (D-Tyr) и их комбинации. Аминокислотные аналоги представляют собой соединения, которые обладают такой же

базовой химической структурой, что и природные аминокислоты, т. е. α -углерод, который связан с водородом, карбоксильная группа, аминогруппа и R-группа, например, гомосерин, норлейцин, сульфоксид метионина, метионинметилсульфоний. Такие аналоги содержат модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют сходную базовую химическую структуру со природными аминокислотами. «Аминокислотные миметики» относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют подобно встречающейся в природе аминокислоте. Аминокислоты могут называться в данном документе либо своими обычно известными трехбуквенными обозначениями, либо однобуквенными обозначениями, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

Термины «полипептид» и «пептид» взаимозаменяемо используются в данном документе для обозначения полимера из аминокислотных остатков в одной цепи. Эти термины применимы к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей природной аминокислоты, а также к природным аминокислотным полимерам и неприродным аминокислотным полимерам. Аминокислотные полимеры могут включать только L-аминокислоты, только D-аминокислоты или смесь L- и D-аминокислот.

В контексте данного документа термин «белок» относится к полипептиду, или димеру (т. е. из двух), или мультимеру (т. е. из трех или более) одноцепочечных полипептидов. Одноцепочечные полипептиды белка могут быть соединены ковалентной связью, например, дисульфидной связью или посредством нековалентных взаимодействий.

Термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» взаимозаменяемо относятся к цепям нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания, и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть включен в цепь ДНК- или РНК-полимеразой. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Примеры рассматриваемых в данном документе полинуклеотидов включают одноцепочечную и двухцепочечную ДНК, одноцепочечную и двухцепочечную РНК и гибридные молекулы, содержащие смеси одноцепочечной и двухцепочечной ДНК и РНК.

Термины «консервативная замена» и «консервативная мутация» относятся к изменению, которое приводит к замене аминокислоты на другую аминокислоту, которая

может быть отнесена к категории обладающих аналогичным свойством. Примеры категорий консервативных аминокислотных групп, определяемых таким образом, могут включать: «заряженную/полярную группу», включая Glu (глутаминовую кислоту или E), Asp (аспарагиновую кислоту или D), Asn (аспарагин или N), Gln (глутамин или Q), Lys (лизин или K), Arg (аргинин или R) и His (гистидин или H); «ароматическую группу», включая Phe (фенилаланин или F), Tyr (тирозин или Y), Trp (триптофан или W) и (гистидин или H); и «алифатическую группу», включая Gly (глицин или G), Ala (аланин или A), Val (валин или V), Leu (лейцин или L), Ile (изолейцин или I), Met (метионин или M), Ser (серин или S), Thr (треонин или T) и Cys (цистеин или C). Внутри каждой группы также можно выделить подгруппы. Например, группу заряженных или полярных аминокислот можно подразделить на подгруппы, включающие: «положительно заряженную подгруппу», включающую Lys, Arg и His; «отрицательно заряженную подгруппу», включающую Glu и Asp; и «полярную подгруппу», включающую Asn и Gln. В другом примере ароматическую или циклическую группу можно подразделить на подгруппы, включающие: «подгруппу азотного кольца», включающую Pro, His и Trp; и «фенильную подгруппу», включающую Phe и Tyr. В другом дополнительном примере алифатическую группу можно подразделить на подгруппы, например, «алифатическую неполярную подгруппу», включающую Val, Leu, Gly и Ala; и «алифатическую слабополярную подгруппу», включающую Met, Ser, Thr и Cys. Примеры категорий консервативных мутаций включают аминокислотные замены аминокислот в подгруппах, указанных выше, такие как, без ограничения: Lys вместо Arg или наоборот, так, чтобы можно было сохранить положительный заряд; Glu вместо Asp или наоборот, так, чтобы можно было сохранить отрицательный заряд; Ser вместо Thr или наоборот, так, чтобы можно было сохранить свободный -ОН; и Gln вместо Asn или наоборот, так, чтобы можно было сохранить свободный -NH₂. В некоторых вариантах осуществления гидрофобные аминокислоты заменяют на природную гидрофобную аминокислоту, например, в активном сайте, чтобы сохранить гидрофобность.

Термины «идентичный» или процент «идентичности» в контексте двух или более полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент аминокислотных остатков, например, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% или более, которые являются идентичными в указанной области при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или обозначенной области, как измерено с использованием

алгоритма сравнения последовательностей или путем ручного выравнивания и визуальной проверки.

Для сравнения последовательностей полипептидов, как правило, одна аминокислотная последовательность действует как эталонная последовательность, с которой сравнивают кандидатную последовательность. Выравнивание можно проводить, используя различные методы, доступные специалисту в данной области техники, например визуальное выравнивание, или используя общедоступное программное обеспечение с использованием известных алгоритмов для достижения максимального выравнивания. Такие программы включают программы BLAST, ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Calif.) или Megalign (DNASTAR). Специалист в данной области техники может определить параметры, используемые для выравнивания для достижения максимального выравнивания. Для сравнения полипептидных последовательностей в целях данной заявки используют алгоритм BLASTP стандартного BLAST для белков для выравнивания двух белковых последовательностей с параметрами по умолчанию.

Термины «субъект», «индивид» и «пациент», взаимозаменяемо используемые в данном документе, относятся к млекопитающему, включая, но не ограничиваясь этим, людей, отличных от человека приматов, грызунов (например, крыс, мышей и морских свинок), кроликов, коров, свиней, лошадей и другие виды млекопитающих. В одном варианте осуществления субъект, индивид или пациент представляет собой человека.

Термины «осуществления лечения», «лечение» и тому подобное используются в данном документе для обозначения достижения желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. «Осуществления лечения» или «лечение» может относиться к любым признакам успеха в лечении или облегчении нейродегенеративного заболевания (например, болезни Альцгеймера или другого нейродегенеративного заболевания, описанного в данном документе), включая любой объективный или субъективный параметр, такой как уменьшение, ремиссия, улучшение выживаемости пациентов, увеличение времени или показателя выживаемости, уменьшение симптомов или повышение переносимости болезни пациентом, замедление скорости дегенерации или ухудшения патологического состояния или улучшение физического или психического благополучия пациента. Лечение или облегчение симптомов может основываться на объективных или субъективных параметрах. Эффект лечения можно сравнивать с индивидом или группой индивидов, не проходящих лечение, или с тем же пациентом до лечения или в другое время во время лечения.

Термин «фармацевтически приемлемый эксципиент» относится к неактивному

фармацевтическому ингредиенту, который является биологически или фармакологически совместимым для применения людьми или животными, такому как, но не ограничиваясь этим, буфер, носитель или консервант.

В контексте данного документа термин «терапевтическое количество» или «терапевтически эффективное количество» агента (например, антитела, как описано в данном документе), в контексте данного документа, представляет собой количество агента, достаточное для лечения, ослабления, облегчения или уменьшения тяжести симптомов заболевания у субъекта. «Терапевтическое количество» агента (например, антитела, как описано в данном документе) может улучшить выживаемость пациента, увеличить время или показатель выживаемость, уменьшать симптомы, сделать поражение, заболевание или патологическое состояние (например, нейродегенеративное заболевание) более переносимым, замедлить скорость дегенерации или ухудшения, или улучшение физического или психического благополучия пациента.

Термин «вводить» относится к способу доставки агентов, соединений или композиций к необходимому участку биологического действия. Эти способы включают, но не ограничиваются этим, местную доставку, парентеральную доставку, внутривенную доставку, внутривожную доставку, внутримышечную доставку, интратекальную доставку, доставку в толстую кишку, ректальную доставку или внутрибрюшинную доставку. В одном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, вводят внутривенно.

Термин «контроль» или «контрольное значение» относится к контрольному или исходному значению. Соответствующий контроль может быть определен специалистом в данной области техники. В некоторых случаях контрольные значения могут быть определены относительно исходного уровня у одного и того же субъекта или в рамках одного и того же эксперимента. В других случаях контрольное значение может быть определено относительно контрольного субъекта (например, здорового контрольного субъекта или контроля заболевания) или среднего значения в популяции контрольных субъектов (например, здоровые контрольные субъекты или контроли заболевания, например, популяции 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 контрольных субъектов или более).

III. АНТИТЕЛА К PILRA

В одном аспекте предложены антитела, которые специфически связываются с белком парного иммуноглобулин-подобного рецептора альфа 2 типа (PILRA) (например, белком hPILRA и/или белком суноPILRA). В некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывается с белком hPILRA. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA является селективным в отношении PILRA по

сравнению с другими рецепторами PILR (например, парным иммуноглобулин-подобным рецептором бета 2 типа (PILRB)).

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA представляет собой антитело, содержащее одну или более последовательностей определяющей комплементарности области (CDR), вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит одну или более последовательностей CDR, вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, как описано в данном документе, и дополнительно содержит одну или более функциональных характеристик, как описано в данном документе, например, антитело, которое антагонизирует активность PILRA (например, блокирует связывание лиганда с hPILRA, изменяет фосфорилирование нижестоящих белков (например, увеличивает фосфорилирование EGFR или STAT3; снижает фосфорилирование STAT1), усиливает клеточное дыхание, метаболизм жирных кислот (например, окисление жирных кислот) и продукцию АТФ, усиливает миграцию клеток (например, миграцию микроглии), увеличивает экспрессию противовоспалительных генов или белков и/или снижает экспрессию белков-цитокинов). В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит полипептиды Fc, которые содержат одну или более модификаций, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA представляет собой полностью человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA представляет собой химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA представляет собой гуманизованное антитело и/или антитело с созревшей аффинностью.

Последовательности антител к PILRA

В некоторых вариантах осуществления последовательность тяжелой цепи или ее часть и/или последовательность легкой цепи или ее часть получены из антитела к PILRA, описанного в данном документе (например, клон 2, клон 4 или Клон 5). Аминокислотные последовательности CDR, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи этих клонов представлены в таблице 1.

Таблица 1

| At CL | CDR-H1 | CDR-H2 | CDR-H3 | V _H | CDR-L1 | CDR-L2 | CDR-L3 | V _L |
|----------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---|
| 1 | GFTFDD YAMH (SEQ ID NO:4) | GFSWNS GSIG (SEQ ID NO:12) | DKSISAA GRFDY (SEQ ID NO:20) | EVQLVESGGGLVQPGR SLRLSCAVSGFTFDDYA MHWVVRQAPGKGLEWV SGFSWNSGSIGYPDSVK GRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAFYYCAK DKSISAAGRFDYWGGQ TLVTVSS (SEQ ID NO:54) | QASRRIN NYLN (SEQ ID NO:30) | DASNLE T (SEQ ID NO:39) | QQYDNL P (SEQ ID NO:47) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCQASRRINNYLN WYQQKPGKAPKLLIYD ASNLETGVPSRFTGSGS GTDFTLTISSLQPEDIA TYYCQQYDNLPLTFGGG TKIKIK (SEQ ID NO:64) |
| 2 | GFTFDD YAMH (SEQ ID NO:4) | GFSWNS GSIG (SEQ ID NO:12) | DKSISAA GRFDY (SEQ ID NO:20) | EVQLVESGGGLVQPGR SLRLSCAVSGFTFDDYA MHWVVRQAPGKGLEWV SGFSWNSGSIGYPDSVK GRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAFYYCAK DKSISAAGRFDYWGGQ TLVTVSS (SEQ ID NO:54) | QASRRIN NYLN (SEQ ID NO:30) | DASNLE T (SEQ ID NO:39) | QQYDNL P (SEQ ID NO:47) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCQASRRINNYLN WYQQKPGKAPKLLIYD ASNLETGVPSRFTGSGS GTDFTLTISSLQPEDIA TYYCQQYDNLPLTFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:65) |
| 3 | GFTFDD YAIH (SEQ ID NO:5) | GMSWNS GSIG (SEQ ID NO:13) | DKSIGA AGRFDC (SEQ ID NO:21) | EVQLVESGGGLVQPGR SLRLSCAASGFTFDDYA IHWVVRQAPGKGLEWVS GMSWNSGSIGYGDSVK GRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAFYYCAK DKSIGAAGRFDCWGGQ TLVTVSS (SEQ ID NO:55) | QASQGI NNYLN (SEQ ID NO:31) | DASNLE T (SEQ ID NO:39) | QQYDNL P (SEQ ID NO:47) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCQASQGINNYLN WYQQKPGKAPKLLIYD ASNLETGVPSRFTGSGS GTDFTLTISSLQPEDIA TYYCQQYDNLPLTFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:66) |
| 4 | GFTFDD YAIH (SEQ ID NO:5) | GMSWNS GSIG (SEQ ID NO:13) | DKSIGA AGRFDS (SEQ ID NO:22) | EVQLVESGGGLVQPGR SLRLSCAASGFTFDDYA IHWVVRQAPGKGLEWVS GMSWNSGSIGYGDSVK GRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAFYYCAK DKSIGAAGRFDSWGGQ TLVTVSS (SEQ ID NO:56) | QASQGI NNYLN (SEQ ID NO:31) | DASNLE T (SEQ ID NO:39) | QQYDNL P (SEQ ID NO:47) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCQASQGINNYLN WYQQKPGKAPKLLIYD ASNLETGVPSRFTGSGS GTDFTLTISSLQPEDIA TYYCQQYDNLPLTFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:66) |
| 5 | GYTFIG FYIH (SEQ ID NO:6) | WINPES GDTT (SEQ ID NO:14) | GNWNFP DTFDF (SEQ ID NO:23) | QVQLVQSGAEVKKPGA SVRVSCKASGYTFIGFY IHWVVRQAPGQGLEWM GWINPESGDTTYAQKF QGRVTMTTDSINTAYF MDLNRLRSDDSAVYFC ARGNWNFPDTFDFWG QGTMVIVSS (SEQ ID NO:57) | RSSQSISI YLN (SEQ ID NO:32) | VASSLQ S (SEQ ID NO:40) | QQSYSAP FT (SEQ ID NO:48) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRSSQSISYLN WHQQIPGKAPKLLIYV ASSLQSGIPSRFSGRGS GTEFTLTISSLQPEDFA TYCQQYSAPFTFGP GTKVDIK (SEQ ID NO:67) |
| 6 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF AF (SEQ ID NO:24) | EVQLQQSGPELQRP GASVKLSCKASGYTFTEY YMYWVKQRPKQGLELI GRIDPEDGGTDYIEKFK NKATLTADTSSNTAYM QLSSLTSEDATYFCAT TIRGTVFAFWGQGLV TVSS (SEQ ID NO:58) | RASEDIF NGLA (SEQ ID NO:33) | NAKTLH T (SEQ ID NO:41) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPASLSASLGE TVITTECRASEDIFNGLA WYQQKPGKSPHLLIYN AKTLHTGVPSRFTGSGS SGSQYSLKINSLQSEDV ASYFCQQYYDYPLTFG SGTKLEIK (SEQ ID NO:68) |
| 7 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF VY (SEQ ID NO:25) | EVQLQQSGPELQRP GASVKLSCKASGYTFTEY YMYWVKQRPKQGLELI MGRIDPEDGGTDYVEK FKNKATLTADTSSNTA YMQSSLTSEDATYFCAT CASTIRGTVFVYWGQGL TLVTVSS (SEQ ID NO:59) | RPSEDIY NGLA (SEQ ID NO:34) | NANSLH T (SEQ ID NO:42) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPASLSASLGE TVITTECRPSEDIYNGLA WYQQKPGESPQLLIYN ANSLHTGVPSRFTGSGS GTQYSLKINSLQSEDV ASYFCQQYYDYPLTFG SGTKLEIK (SEQ ID NO:69) |

| At CL | CDR-H1 | CDR-H2 | CDR-H3 | V _H | CDR-L1 | CDR-L2 | CDR-L3 | V _L |
|-------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|--|--|--------------------------------------|-----------------------------------|---|
| 8 | GYTFTG HYMH (SEQ ID NO:8) | WINPNS GDTD (SEQ ID NO:16) | EGLDGD PFDY (SEQ ID NO:26) | QVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTGH YMHWRVQAPGQGLEW MGWINPNSGDTDYAQ KFQGRVTMTRDTSISTA YMDLNRRLSDDTAVFY CAREGLDGDPPFDYWG QGILVTVSS (SEQ ID NO:60) | RSSQSLV HSDGNT YLS (SEQ ID NO:35) | NISNRFS (SEQ ID NO:43) | IQTTFQST (SEQ ID NO:50) | EIMLTQTPLSSPVTLGQ PASISCRSSQSLVHSDG NTYLSWLQQRPGQPPR LLIYNISNRFSGVPDRF SGRGAGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCIQTTQFS TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:70) |
| 9 | GGSISS NNWWS (SEQ ID NO:9) | EIYHFGT TT (SEQ ID NO:17) | TLRDFY YYMDV (SEQ ID NO:27) | QVQLQESGPGLVKPSG TLSLTCAVSGGSISSNN WWSWVRQPPGKGLEW IGEIYHFGTTTYPNLSLKS RVTVISVDKSKNQFSLKL SSLTAADTAVYYCART LRDFYYMDVWVGKGT TVTSS (SEQ ID NO:61) | RTSQNIN TYL (SEQ ID NO:36) | AASSLQ S (SEQ ID NO:44) | QQSFNIPL T (SEQ ID NO:51) | DIHMTQSPSSLSASVGD RVITTCRTSQNINTYLN WYQQRPGRAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFILSISSLPEDFAT YYCQQSFNIPLTFGGGT KVEIK (SEQ ID NO:71) |
| 10 | GYSFTT YWIA (SEQ ID NO:10) | IYPGDS DTR (SEQ ID NO:18) | TYYYFS GSHWD AFDI (SEQ ID NO:28) | EVQLVQSGAEIRKPGES LKISCKGSGYSFTTYWI AWVRQMPGKGLEWM GIYPGDS DTRYSPSFQ GQVTISADKSITAYLQ WSSLKASDTGIYYCAR TYYYFSGSHWDAFDIW GQGMVTVSS (SEQ ID NO:62) | RASQDIR DCLA (SEQ ID NO:37) | AASSFQS (SEQ ID NO:45) | QQTHSFP YT (SEQ ID NO:52) | DIQMTQSPSSVSAAYVG DRVITTCRASQDIRDCL AWYQQKPGKAPKFLIY AASSFQSGVPSGFSGSG SGTDFTLTVTSLQPEDS ATYYCQQTHSFPYTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO:72) |
| 11 | GFAFSG YDMS (SEQ ID NO:11) | TISNGGR HTY (SEQ ID NO:19) | QKTWD VHAMD Y (SEQ ID NO:29) | EVKLVESGGGLVRPVG SQKLSCAVSGFAFSGY DMSWVRQTPEKRLEW VATISNGGRHTYYPDS VKGRFTISRDNARNTL YLQMSLRSEDALYY CARQKTWDVHAMDY WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:63) | TLSSQHS TYTIE (SEQ ID NO:38) | LKKDGS HSTGD (SEQ ID NO:46) | GDTIKEQF VYV (SEQ ID NO:53) | QLVLTQSSASFSLGLAS AKLTCILSSQHSTYTIE WYQQQLPKPKYVME LKKDGSHTGDGIPDR FSGSSGADRYLSISNI QPEDEAIYICGVGDTIK EQFVYVFGGKVTVL (SEQ ID NO:73) |
| 12 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF AF (SEQ ID NO:24) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYIEKFK NRVTITADTSTSTAYLE LSSLRSED TAVYYCATT IRGTVFAFWGQGLVT VSS (SEQ ID NO:137) | RASEDIF NGLA (SEQ ID NO:33) | NAKTLH T (SEQ ID NO:41) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRASEDIFNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN AKTLHTGVPSRFSGSG SGSDYTLTISSLQPEDF ATYFCQQYYDYPLTFG QGTKVEIK (SEQ ID NO:145) |
| 13 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF AF (SEQ ID NO:24) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYIEKFK NRVTITADTSTSTAYLE LSSLRSED TAVYYCATT IRGTVFAFWGQGLVT VSS (SEQ ID NO:138) | RASEDIF NGLA (SEQ ID NO:33) | NAKTLH T (SEQ ID NO:41) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRASEDIFNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN AKTLHTGVPSRFSGSG SGSDYTLTISSLQPEDF ATYFCQQYYDYPLTFG QGTKVEIK (SEQ ID NO:145) |
| 14 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF AF (SEQ ID NO:24) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYIEKFK NRVTITADTSTSTAYLE LSSLRSED TAVYYCATT IRGTVFAFWGQGLVT VSS (SEQ ID NO:139) | RASEDIF NGLA (SEQ ID NO:33) | NAKTLH T (SEQ ID NO:41) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRASEDIFNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN AKTLHTGVPSRFSGSG SGSDYTLTISSLQPEDF ATYFCQQYYDYPLTFG QGTKVEIK (SEQ ID NO:145) |

| At CL | CDR-H1 | CDR-H2 | CDR-H3 | V _H | CDR-L1 | CDR-L2 | CDR-L3 | V _L |
|-------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|--|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---|
| 15 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF AF (SEQ ID NO:24) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYIEKFK NRSTLTADTSTSTAYLE LSSLRSEDNAVYFCATT IRGTVFAFWGQGLVT VSS (SEQ ID NO:140) | RASEDIF NGLA (SEQ ID NO:33) | NAKTLH T (SEQ ID NO:41) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRASEDIFNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN AKTLHTGVPSRFSGSG SGSDYTLTISSLQPEDF ATYFCQQYYDYPLTFG QGTVKVEIK (SEQ ID NO:145) |
| 16 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF VY (SEQ ID NO:25) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYVEKF KNRATITADTSTSTAYL ELSSLRSEDNAVYYCAS TIRGTVFVYWGQGLV TVSS (SEQ ID NO:141) | RASEDIF NGLA (SEQ ID NO:33) | NAKTLH T (SEQ ID NO:41) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRASEDIFNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN AKTLHTGVPSRFSGSG SGSDYTLTISSLQPEDF ATYFCQQYYDYPLTFG QGTVKVEIK (SEQ ID NO:145) |
| 17 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF VY (SEQ ID NO:25) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYVEKF KNRVTLTADTSTSTAY LESSLRSEDNAVYYCA STIRGTVFVYWGQGL TVSS (SEQ ID NO:158) | RASEDIF NGLA (SEQ ID NO:33) | NAKTLH T (SEQ ID NO:41) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRASEDIFNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN AKTLHTGVPSRFSGSG SGSDYTLTISSLQPEDF ATYFCQQYYDYPLTFG QGTVKVEIK (SEQ ID NO:145) |
| 18 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF VY (SEQ ID NO:25) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYVEKF KNRVITITADTSTSTAYL ELSSLRSEDNAVYFCAS TIRGTVFVYWGQGLV TVSS (SEQ ID NO:142) | RASEDIF NGLA (SEQ ID NO:33) | NAKTLH T (SEQ ID NO:41) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRASEDIFNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN AKTLHTGVPSRFSGSG SGSDYTLTISSLQPEDF ATYFCQQYYDYPLTFG QGTVKVEIK (SEQ ID NO:145) |
| 19 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF VY (SEQ ID NO:25) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYVEKF KNRATLTADTSTSTAY LESSLRSEDNAVYFCA STIRGTVFVYWGQGL TVSS (SEQ ID NO:143) | RASEDIF NGLA (SEQ ID NO:33) | NAKTLH T (SEQ ID NO:41) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRASEDIFNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN AKTLHTGVPSRFSGSG SGSDYTLTISSLQPEDF ATYFCQQYYDYPLTFG QGTVKVEIK (SEQ ID NO:145) |
| 20 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF AF (SEQ ID NO:24) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYIEKFK NRVTLTADTSTSTAYLE LSSLRSEDNAVYYCATT IRGTVFAFWGQGLVT VSS (SEQ ID NO:138) | RPSEDIY NGLA (SEQ ID NO:34) | NANSLH T (SEQ ID NO:42) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRPSEDIYNGLA WYQQKPGKAPKLLIYN ANSLHTGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFA TYQCQQYYDYPLTFGQ GTVKVEIK (SEQ ID NO:146) |
| 21 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF AF (SEQ ID NO:24) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYIEKFK NRSTLTADTSTSTAYLE LSSLRSEDNAVYFCATT IRGTVFAFWGQGLVT VSS (SEQ ID NO:140) | RPSEDIY NGLA (SEQ ID NO:34) | NANSLH T (SEQ ID NO:42) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRPSEDIYNGLA WYQQKPGKAPKLLIYN ANSLHTGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFA TYQCQQYYDYPLTFGQ GTVKVEIK (SEQ ID NO:146) |
| 22 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF VY (SEQ ID NO:25) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYVEKF KNRVTLTADTSTSTAY LESSLRSEDNAVYYCA STIRGTVFVYWGQGL TVSS (SEQ ID NO:158) | RPSEDIY NGLA (SEQ ID NO:34) | NANSLH T (SEQ ID NO:42) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRPSEDIYNGLA WYQQKPGKAPKLLIYN ANSLHTGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFA TYQCQQYYDYPLTFGQ GTVKVEIK (SEQ ID NO:146) |

| At CL | CDR-H1 | CDR-H2 | CDR-H3 | V _H | CDR-L1 | CDR-L2 | CDR-L3 | V _L |
|-------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--|
| 23 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF VY (SEQ ID NO:25) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYVEKF KNRATLTADTSTSTAY LESSLRSEDTA VYFCA STIRGTVFVYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO:143) | RPSEDIY NGLA (SEQ ID NO:34) | NANSLH T (SEQ ID NO:42) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRPSEDIYNGLA WYQQKPGKAPKLLIYN ANSLHTGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFA TYFCQQYYDYPLTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:146) |
| 24 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF AF (SEQ ID NO:24) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYIEKFK NRVTLTADTSTSTAYLE LSSLRSEDTA VYFCATT IRGTVFAFWGQGT LVSS (SEQ ID NO:138) | RPSEDIY NGLA (SEQ ID NO:34) | NANSLH T (SEQ ID NO:42) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRPSEDIYNGLA WYQQKPGKAPKLLIYN ANSLHTGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFA TYFCQQYYDYPLTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:147) |
| 25 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF AF (SEQ ID NO:24) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYIEKFK NRSTLTADTSTSTAYLE LSSLRSEDTA VYFCATT IRGTVFAFWGQGT LVSS (SEQ ID NO:140) | RPSEDIY NGLA (SEQ ID NO:34) | NANSLH T (SEQ ID NO:42) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRPSEDIYNGLA WYQQKPGKAPKLLIYN ANSLHTGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFA TYFCQQYYDYPLTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:147) |
| 26 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF VY (SEQ ID NO:25) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYVEKF KNRVTLTADTSTSTAY LESSLRSEDTA VYCA STIRGTVFVYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO:158) | RPSEDIY NGLA (SEQ ID NO:34) | NANSLH T (SEQ ID NO:42) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRPSEDIYNGLA WYQQKPGKAPKLLIYN ANSLHTGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFA TYFCQQYYDYPLTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:147) |
| 27 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF VY (SEQ ID NO:25) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYVEKF KNRATLTADTSTSTAY LESSLRSEDTA VYFCA STIRGTVFVYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO:143) | RPSEDIY NGLA (SEQ ID NO:34) | NANSLH T (SEQ ID NO:42) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRPSEDIYNGLA WYQQKPGKAPKLLIYN ANSLHTGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFA TYFCQQYYDYPLTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:147) |
| 28 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF AF (SEQ ID NO:24) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYIEKFK NRVTLTADTSTSTAYLE LSSLRSEDTA VYFCATT IRGTVFAFWGQGT LVSS (SEQ ID NO:138) | RASEDIF NGLA (SEQ ID NO:33) | NAKTLH T (SEQ ID NO:41) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRASEDIFNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN AKTLHTGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDF ATYYCQQYYDYPLTFG QGTKVEIK (SEQ ID NO:148) |
| 29 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF AF (SEQ ID NO:24) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYIEKFK NRSTLTADTSTSTAYLE LSSLRSEDTA VYFCATT IRGTVFAFWGQGT LVSS (SEQ ID NO:140) | RASEDIF NGLA (SEQ ID NO:33) | NAKTLH T (SEQ ID NO:41) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRASEDIFNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN AKTLHTGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDF ATYYCQQYYDYPLTFG QGTKVEIK (SEQ ID NO:148) |
| 30 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF VY (SEQ ID NO:25) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYVEKF KNRVTLTADTSTSTAY LESSLRSEDTA VYCA STIRGTVFVYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO:158) | RASEDIF NGLA (SEQ ID NO:33) | NAKTLH T (SEQ ID NO:41) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRASEDIFNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN AKTLHTGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDF ATYYCQQYYDYPLTFG QGTKVEIK (SEQ ID NO:148) |

| At CL | CDR-H1 | CDR-H2 | CDR-H3 | V _H | CDR-L1 | CDR-L2 | CDR-L3 | V _L |
|-------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--|
| 31 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF VY (SEQ ID NO:25) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYVEKF KNRATLTADTSTSTAY LESSLRSEDTA VYFCA STIRGTVFVYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO:143) | RASEDIF NGLA (SEQ ID NO:33) | NAKTLH T (SEQ ID NO:41) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRASEDIFNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN AKTLHTGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDF ATYYCQQYYDYPLTFG QGTKVEIK (SEQ ID NO:148) |
| 32 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF AF (SEQ ID NO:24) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYIEKFK NRVTLTADTSTSTAY LESSLRSEDTA VYFCAT TIRGTVFAFWGQGT LVSS (SEQ ID NO:138) | RPSEDIY NGLA (SEQ ID NO:34) | NANSLH T (SEQ ID NO:42) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRPESEDYNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN ANSLHTGVPSRFSGSG GTDYTLTISSLQPEDFA TYFCQQYYDYPLTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:149) |
| 33 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF AF (SEQ ID NO:24) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYIEKFK NRSTLTADTSTSTAY LESSLRSEDTA VYFCAT TIRGTVFAFWGQGT LVSS (SEQ ID NO:140) | RPSEDIY NGLA (SEQ ID NO:34) | NANSLH T (SEQ ID NO:42) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRPESEDYNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN ANSLHTGVPSRFSGSG GTDYTLTISSLQPEDFA TYFCQQYYDYPLTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:149) |
| 34 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF VY (SEQ ID NO:25) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYVEKF KNRVTLTADTSTSTAY LESSLRSEDTA VYCA STIRGTVFVYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO:158) | RPSEDIY NGLA (SEQ ID NO:34) | NANSLH T (SEQ ID NO:42) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRPESEDYNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN ANSLHTGVPSRFSGSG GTDYTLTISSLQPEDFA TYFCQQYYDYPLTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:149) |
| 35 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF VY (SEQ ID NO:25) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYVEKF KNRATLTADTSTSTAY LESSLRSEDTA VYFCA STIRGTVFVYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO:143) | RPSEDIY NGLA (SEQ ID NO:34) | NANSLH T (SEQ ID NO:42) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRPESEDYNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN ANSLHTGVPSRFSGSG GTDYTLTISSLQPEDFA TYFCQQYYDYPLTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:149) |
| 36 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF AF (SEQ ID NO:24) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYIEKFK NRVTLTADTSTSTAY LESSLRSEDTA VYFCAT TIRGTVFAFWGQGT LVSS (SEQ ID NO:138) | RPSEDIY NGLA (SEQ ID NO:34) | NANSLH T (SEQ ID NO:42) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRPESEDYNGLA WYQQKPGKAPKLLIYN ANSLHTGVPSRFSGSG GTDYTLTISSLQPEDFA TYFCQQYYDYPLTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:147) |
| 37 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF AF (SEQ ID NO:24) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYIEKFK NRVTLTADTSTSTAY LESSLRSEDTA VYFCAT TIRGTVFAFWGQGT LVSS (SEQ ID NO:138) | RASEDIF NGLA (SEQ ID NO:33) | NAKTLH T (SEQ ID NO:41) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRASEDIFNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN AKTLHTGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDF ATYYCQQYYDYPLTFG QGTKVEIK (SEQ ID NO:148) |
| 38 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF VY (SEQ ID NO:25) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYVEKF KNRVATADTSTSTAY LESSLRSEDTA VYCA STIRGTVFVYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO:144) | RPSEDIY NGLA (SEQ ID NO:34) | NANSLH T (SEQ ID NO:42) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRPESEDYNGLA WYQQKPGKAPKLLIYN ANSLHTGVPSRFSGSG GTDYTLTISSLQPEDFA TYFCQQYYDYPLTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:147) |

| At CL | CDR-H1 | CDR-H2 | CDR-H3 | V _H | CDR-L1 | CDR-L2 | CDR-L3 | V _L |
|----------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---|
| 39 | GYTFTE YYMY (SEQ ID NO:7) | RIDPEDG GTD (SEQ ID NO:15) | TIRGTVF AF (SEQ ID NO:24) | EVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTEY YMYWVRQAPGQGLELI GRIDPEDGGTDYIEKFK NRVTLTADTSTSTAYLE LSSLRSEDTAVYYCATT IRGTVFAFWGQGLVT VSS (SEQ ID NO:138) | RASEDIF NGLA (SEQ ID NO:33) | NAKTLH T (SEQ ID NO:41) | QQYYDYP LT (SEQ ID NO:49) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCRASEDIFNGLA WYQQKPGKSPKLLIYN AKTLHTGVPSPRFSGSG SGSDYTLTISSLQPEDF ATYFCQQYYDYPLTFG QGTKVEIK (SEQ ID NO:145) |

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) последовательности CDR1 тяжелой цепи (CDR-H1), имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:4–11 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:4–11;

(b) последовательность CDR2 тяжелой цепи (CDR-H2), имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:12-19 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:12–19;

(c) последовательность CDR3 тяжелой цепи (CDR-H3), имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:20-29 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:20-29;

(d) последовательности CDR1 легкой цепи (CDR-L1), имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:30–38 или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:30–38;

(e) последовательность CDR2 легкой цепи (CDR-L2), имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:39-46 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной

последовательности SEQ ID NO:39–46; и

(f) последовательность CDR3 легкой цепи (CDR-L3), имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:47-53 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:47–53.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) последовательности CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:4–11;

(b) последовательности CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:12–19;

(c) последовательности CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:20–29;

(d) последовательности CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:30–38;

(e) последовательности CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность по любому из SEQ ID NO:39–46; и

(f) последовательности CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 47–53.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит два, три, четыре, пять или все шесть из (a)-(f). В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит CDR-H1 из (a), CDR-H2 из (b) и CDR-H3 из (c). В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит CDR-L1 из (d), CDR-L2 из (e) и CDR-L3 из (f). В некоторых вариантах осуществления CDR, имеющую до двух аминокислотных замен, имеет одну аминокислотную замену (например, одну консервативную замену) относительно эталонной последовательности. В некоторых вариантах осуществления CDR, имеющую до двух аминокислотных замен, имеет две аминокислотные замены (например, две консервативные замены) относительно эталонной последовательности. В некоторых вариантах осуществления до двух аминокислотных замен являются консервативными заменами.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) CDR-H1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%

идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4;

(b) CDR-H2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательностей (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:12 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12;

(c) CDR-H3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:20 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:20;

(d) CDR-L1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:30 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:30;

(e) CDR-L2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:39 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:39; и

(f) CDR-L3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:47 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:47.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) CDR-H1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности

(например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5;

(b) CDR-H2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательностей (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:13 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13;

(c) CDR-H3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:21 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:21;

(d) CDR-L1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:31 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:31;

(e) CDR-L2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:39 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:39; и

(f) CDR-L3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:47 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:47.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) CDR-H1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5;

(b) CDR-H2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательностей (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:13 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13;

(c) CDR-H3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:22 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:22;

(d) CDR-L1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:31 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:31;

(e) CDR-L2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:39 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:39; и

(f) CDR-L3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:47 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:47.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) CDR-H1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6;

(b) CDR-H2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательностей (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:14 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14;

(c) CDR-H3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:23 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:23;

(d) CDR-L1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:32 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:32;

(e) CDR-L2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:40 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:40; и

(f) CDR-L3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:48 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной

последовательности SEQ ID NO:48.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) CDR-H1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7;

(b) CDR-H2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательностей (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:15 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15;

(c) CDR-H3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:24 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24;

(d) CDR-L1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:33 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:33;

(e) CDR-L2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:41 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:41; и

(f) CDR-L3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:49 или имеющую до двух аминокислотных замен

(например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:49.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) CDR-H1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7;

(b) CDR-H2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательностей (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:15 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15;

(c) CDR-H3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:25 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:25;

(d) CDR-L1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:34 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34;

(e) CDR-L2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:42 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:42; и

(f) CDR-L3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной

последовательностью SEQ ID NO:49 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:49.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) CDR-H1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:8 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8;

(b) CDR-H2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательностей (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:16 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16;

(c) CDR-H3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:26 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:26;

(d) CDR-L1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:35 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:35;

(e) CDR-L2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:43 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:43; и

(f) CDR-L3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:50 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:50.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) CDR-H1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:9 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9;

(b) CDR-H2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательностей (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:17 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:17;

(c) CDR-H3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:27 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:27;

(d) CDR-L1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:36 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:36;

(e) CDR-L2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:44 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:44; и

(f) CDR-L3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности

(например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:51 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:51.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) CDR-H1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:10 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10;

(b) CDR-H2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательностей (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:18 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18;

(c) CDR-H3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:28 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:28;

(d) CDR-L1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:37 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:37;

(e) CDR-L2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:45 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной

последовательности SEQ ID NO:45; и

(f) CDR-L3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:52 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:52.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) CDR-H1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11;

(b) CDR-H2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательностей (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:19 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:19;

(c) CDR-H3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:29 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:29;

(d) CDR-L1, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:38 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:38;

(e) CDR-L2, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной

последовательностью SEQ ID NO:46 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:46; и

(f) CDR-L3, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:53 или имеющую до двух аминокислотных замен (например, одну или две консервативные замены) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:53.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47; или

(b) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47; или

(c) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47; или

(d) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; или

(e) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7,

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:54–63. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 54–63.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 137–144 и 158. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:137–144 и 158.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:64–73. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 64–73.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит: вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97 %, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:54–63, вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:64–73. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:54–63, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:64–73.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит: вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97 %, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:137–144, вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по

меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:145–149. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:137–144, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:145–149.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 54, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:64; или

(b) последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 54, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:65; или

(c) последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 55, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:66; или

(d) последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 56, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:66; или

(e) последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 57, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:67; или

(f) последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 58, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:68; или

(g) последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 59, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:69; или

(h) последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 60, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:70; или

(i) последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 61, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:71; или

(j) последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 62, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:72; или

(k) последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 63, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:73.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 12 и 20 соответственно, и последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:54 и CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:30, 39 и 47, соответственно, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:64; или

(b) CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, содержащие аминокислотные последовательности

SEQ ID NO: 7, 15 и 25 соответственно, и последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:59 и CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:34, 42 и 49, соответственно, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:69; или

(h) CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, 16 и 26 соответственно, и последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:60 и CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:35, 43 и 50, соответственно, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:70; или

(i) CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9, 17 и 27 соответственно, и последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:61 и CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:36, 44 и 51, соответственно, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:71; или

(j) CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10, 18 и 28 соответственно, и последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:62 и CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:37, 45 и 52, соответственно, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:72; или

(k) CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 19 и 29 соответственно, и последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:63 и CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:38, 46 и 53, соответственно, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:73.

Клон 2

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит последовательность CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, последовательность CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, последовательность CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, последовательность CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, последовательность CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и последовательность CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:54. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:65. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:54, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:65. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную

область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 12 и 20, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:54, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR1-3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:30, 39 и 47, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:65.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит две тяжелые цепи, каждая из которых содержит CDR1-3 тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 12 и 20, соответственно, и имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:122, и две легкие цепи, каждая из которых содержит CDR1-3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:30, 39 и 47, соответственно, и имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательностей (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:123.

Клон 4

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит последовательность CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, последовательность CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, последовательность CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, последовательность CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, последовательность CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и последовательность CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:56. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:66. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:56, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:66. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:5, 13 и 22, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:56, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR1-3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:31, 39 и 47, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:66.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит две тяжелые цепи, каждая из которых содержит CDR1-3 тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:5, 13 и 22, соответственно, и имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:124, и две легкие цепи, каждая из которых содержит CDR1-3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:31, 39 и 47, соответственно, и имеет по

меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:125.

Клон 5

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит последовательность CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, последовательность CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, последовательность CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, последовательность CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, последовательность CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40, и последовательность CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:57. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:67. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:67. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит переменную область тяжелой

цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:6, 14 и 23, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1-3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:32, 40 и 48, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:67.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит две тяжелые цепи, каждая из которых содержит CDR1-3 тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:6, 14 и 23, соответственно, и имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:126, и две легкие цепи, каждая из которых содержит CDR1-3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:32, 40 и 48, соответственно, и имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:127.

Клон 12

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит последовательность CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, последовательность CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, последовательность CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, последовательность CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, последовательность CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и последовательность CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности

последовательности) с SEQ ID NO:137. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:137.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:145. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:145.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:137, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:145. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:137, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:145.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7, 15 и 24, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:137, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR1-3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:33, 41 и 49, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:145.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит две тяжелые цепи, каждая из которых содержит CDR1-3 тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7, 15 и 24, соответственно, и имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:150, и две легкие цепи, каждая из которых содержит CDR1-3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:33, 41 и 49, соответственно, и имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:151.

Клон 15

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит последовательность CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, последовательность CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, последовательность CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, последовательность CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, последовательность CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и последовательность CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:140. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:140.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:145. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:145.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:140, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности

последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:145. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:140, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:145.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7, 15 и 24, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:140, и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1-3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:33, 41 и 49, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:145.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит две тяжелые цепи, каждая из которых содержит CDR1-3 тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7, 15 и 24, соответственно, и имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:152, и две легкие цепи, каждая из которых содержит CDR1-3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:33, 41 и 49, соответственно, и имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:151.

Клон 23

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит последовательность CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, последовательность CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, последовательность CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, последовательность CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, последовательность CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42, и последовательность CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:143. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:143.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:146. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:146.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:143, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:146. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:143, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:146.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7, 15 и 25, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:143, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR1-3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:34, 42 и 49, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:146.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит две тяжелые цепи, каждая из которых содержит CDR1-3 тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7, 15 и 25, соответственно, и имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:153, и две легкие цепи, каждая из которых содержит CDR1-3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:34, 42 и 49, соответственно, и имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:154.

Клон 35

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит последовательность CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, последовательность CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, последовательность CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, последовательность CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, последовательность CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42, и последовательность CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:143. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:143.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:149. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:149.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет

по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:143, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:149. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:143, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:149.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7, 15 и 25, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:143, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR1-3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:34, 42 и 49, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:149.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит две тяжелые цепи, каждая из которых содержит CDR1-3 тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7, 15 и 25, соответственно, и имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:153, и две легкие цепи, каждая из которых содержит CDR1-3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:34, 42 и 49, соответственно, и имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:155.

Консенсусные последовательности

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит одну или более последовательностей, которые охватываются консенсусной последовательностью, описанной в данном документе. В качестве неограничивающего примера, консенсусные последовательности могут быть определены путем выравнивания последовательностей

тяжелой или легкой цепи (например, CDR) для антител, которые происходят из одной и той же (или похожей) зародышевой линии. В некоторых вариантах осуществления консенсусные последовательности могут быть получены из антител, содержащих последовательности одинаковой (или похожей) длины и/или имеющих по меньшей мере одну очень похожую CDR (например, очень похожую CDR3). В некоторых вариантах осуществления такие последовательности в этих антителах могут быть выровнены и сравнены для выявления консервативных аминокислот или мотивов (т. е., где изменение последовательностей может изменить функцию белка), и/или областей, где происходит изменение последовательностей (т. е., где изменение последовательности, скорее всего, не окажет существенного влияния на функцию белка). Альтернативно, консенсусные последовательности могут быть определены путем выравнивания последовательностей тяжелой или легкой цепи (например, CDR) для антител, которые связываются с одинаковыми или похожими (например, перекрывающимися) эпитопами для определения консервативных аминокислот или мотивов (т. е. где изменение последовательностей может изменить функцию белка) и областей, где возникают вариации при выравнивании последовательностей (т.е. где вариации последовательностей вряд ли существенно повлияют на функцию белка). В некоторых вариантах осуществления можно определить одну или более консенсусных последовательностей для антител, которые распознают тот же или подобный эпитоп, что и антитело к PILRA, как описано в данном документе. Следует понимать, что при выборе аминокислоты для вставки в положение, обозначенное буквой «X» в консенсусной последовательности, в некоторых вариантах осуществления аминокислота выбирается из аминокислот, найденных в соответствующем положении в выровненных последовательностях.

Клоны 2, 4 и 5

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность $GX_1TFX_2X_3X_4X_5X_6H$ (SEQ ID NO:74), где X_1 представляет собой F или Y; X_2 представляет собой D или I; X_3 представляет собой D или G; X_4 представляет собой Y или F; X_5 представляет собой A или Y; и X_6 представляет собой M или I;

(b) последовательность CDR-H2, содержащую последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5SGX_6X_7X_8$ (SEQ ID NO:75), где X_1 представляет собой G или W; X_2 представляет собой F, M, или I; X_3 представляет собой S или N; X_4 представляет собой W или P; X_5 представляет собой N или E; X_6 представляет собой S или D; X_7 представляет собой I или T; и X_8 представляет собой G или T;

(c) последовательность CDR-H3, содержащую последовательность

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9FDX_{10}$ (SEQ ID NO:76), где X_1 представляет собой D или отсутствует; X_2 представляет собой K или G; X_3 представляет собой S или N; X_4 представляет собой I или W; X_5 представляет собой S, G, или N; X_6 представляет собой A или F; X_7 представляет собой A или P; X_8 представляет собой G или D; X_9 представляет собой R или T; и X_{10} представляет собой Y, S, или F;

(d) последовательность CDR-L1, содержащую последовательность $X_1X_2SX_3X_4IX_5X_6YLN$ (SEQ ID NO:77), где X_1 представляет собой Q или R; X_2 представляет собой A или S; X_3 представляет собой R или Q; X_4 представляет собой R, G, или S; X_5 представляет собой N или S; и X_6 представляет собой N или I;

(e) последовательность CDR-L2, содержащую последовательность $X_1ASX_2LX_3X_4$ (SEQ ID NO:78), где X_1 представляет собой D или V; X_2 представляет собой N или S; X_3 представляет собой E или Q; и X_4 представляет собой T или S; и

(f) последовательность CDR-L3, содержащую последовательность $QQX_1X_2X_3X_4PX_5T$ (SEQ ID NO:79), где X_1 представляет собой Y или S; X_2 представляет собой D или Y; X_3 представляет собой N или S; X_4 представляет собой L или A; и X_5 представляет собой L или F.

[0235] В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность $GFTFDDYAX_1H$ (SEQ ID NO:80), где X_1 представляет собой M или I, или $GYTFIGFYIH$ (SEQ ID NO:6);

(b) последовательность CDR-H2, содержащую последовательность $GX_1SWNSGSIG$ (SEQ ID NO:81), где X_1 представляет собой F или M, или $WINPESGDTT$ (SEQ ID NO:14);

(c) последовательность CDR-H3, содержащую последовательность $DKSIX_1AAGRFDX_2$ (SEQ ID NO:82), где X_1 представляет собой S или G; и X_2 представляет собой Y или S или $GNWNFPDTFDF$ (SEQ ID NO:23);

(d) последовательность CDR-L1, содержащую последовательность $QASX_1X_2INNYLN$ (SEQ ID NO:83), где X_1 представляет собой R или Q; и X_2 представляет собой R или G или $RSSQSISIYLN$ (SEQ ID NO:32);

(e) последовательность CDR-L2, содержащую последовательность $DASNLET$ (SEQ ID NO:39) или $VASSLQS$ (SEQ ID NO:40); и

(f) последовательность CDR-L3, содержащую последовательность $QQYDNLPLT$ (SEQ ID NO:47) или $QSYSAPFT$ (SEQ ID NO:48).

В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность $GFTFDDYAX_1H$ (SEQ ID NO:80), где X_1 представляет собой M или I;

(b) последовательность CDR-H2, содержащую последовательность GX₁SWNSGSIG (SEQ ID NO:81), где X₁ представляет собой F или M;

(c) последовательность CDR-H3, содержащую последовательность DKSIX₁AAGRFDX₂ (SEQ ID NO:82), где X₁ представляет собой S или G; и X₂ представляет собой Y или S;

(d) последовательность CDR-L1, содержащую последовательность QASX₁X₂INNYLN (SEQ ID NO:83), где X₁ представляет собой R или Q; и X₂ представляет собой R или G;

(e) последовательность CDR-L2, содержащую последовательность DASNLET (SEQ ID NO:39); и

(f) последовательность CDR-L3, содержащую последовательность QQYDNLPLT (SEQ ID NO:47).

Клоны 6, 7 и 8

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность GYTFTX₁X₂YMY (SEQ ID NO:84), где X₁ представляет собой E или G; и X₂ представляет собой Y или H;

(b) последовательность CDR-H2, содержащую последовательность X₁IX₂PX₃X₄GX₅TD (SEQ ID NO:85), где X₁ представляет собой R или W; X₂ представляет собой D или N; X₃ представляет собой E или N; X₄ представляет собой D или S; и X₅ представляет собой G или D;

(c) последовательность CDR-H3, содержащую последовательность TIRGTVFX₁X₂ (SEQ ID NO:86), где X₁ представляет собой A или V; и X₂ представляет собой F или Y, или EGLDGDPDFY (SEQ ID NO:26)

(d) последовательность CDR-L1, содержащую последовательность RX₁SEDIX₂NGLA (SEQ ID NO:87), где X₁ представляет собой A или P; и X₂ представляет собой F или Y или RSSQSLVHSDGNTYLS (SEQ ID NO:35);

(e) последовательность CDR-L2, содержащую последовательность NX₁X₂X₃X₄X₅X₆ (SEQ ID NO:88), где X₁ представляет собой A или I; X₂ представляет собой K, N, или S; X₃ представляет собой T, S, или N; X₄ представляет собой L или R; X₅ представляет собой H или F; и X₆ представляет собой T или S; и

(f) последовательность CDR-L3, содержащую последовательность QQYYDYPLT (SEQ ID NO:49) или IQTTQFST (SEQ ID NO:50).

В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность GYTFTEYYMY

(SEQ ID NO:7) или GYTFGHYMH (SEQ ID NO:8);

(b) последовательность CDR-H2, содержащую последовательность RIDPEDGGTD (SEQ ID NO:15) или WINPNSGDTD (SEQ ID NO:16);

(c) последовательность CDR-H3, содержащую последовательность TIRGTVFX₁X₂ (SEQ ID NO:86), где X₁ представляет собой A или V; и X₂ представляет собой F или Y, или EGLDGDPDFY (SEQ ID NO:26);

(d) последовательность CDR-L1, содержащую последовательность RX₁SEDIX₂NGLA (SEQ ID NO:87), где X₁ представляет собой A или P; и X₂ представляет собой F или Y или RSSQSLVHSDGNTYLS (SEQ ID NO:35);

(e) последовательность CDR-L2, содержащую последовательность NAX₁X₂LHT (SEQ ID NO:89), где X₁ представляет собой K или N; и X₂ представляет собой T или S, или NISNRFS (SEQ ID NO:43); и

(f) последовательность CDR-L3, содержащую последовательность QQYYDYPLT (SEQ ID NO:49) или IQTTQFST (SEQ ID NO:50).

В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA содержит:

(a) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность GYTFTEYYMY (SEQ ID NO:7);

(b) последовательность CDR-H2, содержащую последовательность RIDPEDGGTD (SEQ ID NO:15);

(c) последовательность CDR-H3, содержащую последовательность TIRGTVFX₁X₂ (SEQ ID NO:86), где X₁ представляет собой A или V; и X₂ представляет собой F или Y;

(d) последовательность CDR-L1, содержащую последовательность RX₁SEDIX₂NGLA (SEQ ID NO:87), где X₁ представляет собой A или P; и X₂ представляет собой F или Y;

(e) последовательность CDR-L2, содержащую последовательность NAX₁X₂LHT (SEQ ID NO:89), где X₁ представляет собой K или N; и X₂ представляет собой T или S; и

(f) последовательность CDR-L3, содержащую последовательность QQYYDYPLT (SEQ ID NO:49).

Характеристики связывания антител к PILRA

В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, которое специфически связывается с белком PILRA (например, белком hPILRA), связывается с PILRA, которое экспрессируется на клетке (например, линии клеток, которая эндогенно экспрессирует PILRA, такой как иммунные клетки или линии клеток, которая создана для экспрессии PILRA, например, как описано в разделе «Примеры» ниже). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически

связывается с белком PILRA, как описано в данном документе, связывается с очищенным или рекомбинантным белком PILRA, его частью, или с химерным белком, содержащим PILRA или его часть.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с белком PILRA человека, проявляет перекрестную реактивность с одним или более другими белками PILRA другого вида. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с белком PILRA человека, проявляет перекрестную реактивность с белком PILRA яванского макака («супо») (супоPILRA).

Способы анализа аффинности связывания, кинетики связывания и перекрестной реактивности. Эти способы включают твердофазные анализы связывания (например, анализ ELISA), иммунопреципитацию, поверхностный плазмонный резонанс (например, Biacore™ (GE Healthcare, Пискаатауэй, штат Нью-Джерси)), анализы кинетического исключения (например, KinExA®), проточную цитометрию, сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS), биослойную интерферометрию (например, Octet™ (FortéBio, Inc., Менло-Парк, штат Калифорния)) и вестерн-блоттинг, но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах осуществления для определения аффинности связывания и/или перекрестной реактивности используют ELISA. Способы проведения анализов методом ELISA известны в данной области техники и также описаны в разделе «Примеры» ниже. В некоторых вариантах осуществления для определения аффинности связывания, кинетики связывания и/или перекрестной реактивности используют метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В некоторых вариантах осуществления для определения аффинности связывания, кинетики связывания и/или перекрестной реактивности используют анализ кинетического исключения. В некоторых вариантах осуществления анализы методом биослойной интерферометрии используются для определения аффинности связывания, кинетики связывания и/или перекрестной реактивности.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA, описанное в данном документе, специфически связывается с парным иммуноглобулин-подобным рецептором альфа 2 типа яванского макака (супоPILRA), причем аффинность связывания с супоPILRA по меньшей мере в 2 раза (например, по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз) сильнее, чем аффинность связывания с человеческим парным иммуноглобулин-подобным рецептором бета 2 типа (hPILRB).

Как описано в данном документе, в некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA, описанное в данном документе, проявляет перекрестную реактивность как с

hPILRA, так и с супоPILRA. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA, описанное в данном документе, связывается как с hPILRA, так и с супоPILRA.

В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания антитела к PILRA с супоPILRA находится в пределах 100 раз (например, в пределах 100 раз, 90 раз, 80 раз, 70 раз, 60 раз, 50 раз, 40 раз, 30 раз, 20 раз, 10 раз, 9 раз, 8 раз, 7 раз, 6 раз, 5 раз, 4 раз, 3 раз, 2 раз, или 1,5 раза) относительно аффинности связывания с hPILRA. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с hPILRA с аффинностью связывания между 0,1 нМ и 500 нМ (например, между 0,1 нМ и 400 нМ, между 0,1 нМ и 300 нМ, между 0,1 нМ и 200 нМ или между 0,1 нМ и 100 нМ). В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с hPILRA с аффинностью связывания от 0,1 нМ до 100 нМ (например, между 0,1 нМ и 90 нМ, между 0,1 нМ и 80 нМ, между 0,1 нМ и 70 нМ, между 0,1 нМ и 60 нМ, между 0,1 нМ и 50 нМ, между 0,1 нМ и 40 нМ, между 0,1 нМ и 30 нМ, между 0,1 нМ и 20 нМ, между 0,1 нМ и 10 нМ, между 0,1 нМ и 5 нМ, между 0,1 нМ и 1 нМ, между 1 нМ и 100 нМ, между 5 нМ и 100 нМ, между 10 нМ и 100 нМ, между 20 нМ и 100 нМ, между 30 нМ и 100 нМ, между 40 нМ и 100 нМ, между 50 нМ и 100 нМ, между 60 нМ и 100 нМ, между 70 нМ и 100 нМ, между 80 нМ и 100 нМ, или между 90 нМ и 100 нМ).

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA, описанное в данном документе, селективно связывается с hPILRA и/или супоPILRA относительно hPILRB. В конкретных вариантах осуществления аффинность связывания антитела с hPILRA в по меньшей мере 10 раз (например, по меньшей мере 10 раз, 20 раз, 40 раз, 60 раз, 80 раз, 100 раз, 120 раз, 140 раз, 160 раз, 180 раз, 200 раз, 220 раз, 240 раз, 260 раз, 280 раз, или 300 раз) сильнее, чем аффинность связывания с hPILRB.

Эпитопы, распознаваемые антителами к PILRA

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA распознает эпитоп PILRA человека, который является таким же или по существу таким же, как эпитоп, распознаваемый клоном антитела, описанным в данном документе. В контексте данного документа термин «по существу тот же», используемый в отношении эпитопа, распознаваемого клоном антитела, как описано в данном документе, означает, что антитело к PILRA распознает эпитоп, который идентичен, находится внутри или почти идентичен (например, имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичности последовательности) или имеет одну, две или три аминокислотные замены, например, консервативные замены, относительно), или имеет существенное перекрытие (например, по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% перекрытие) эпитопа,

распознаваемого клоном антитела, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA распознает эпитоп человеческого PILRA, который является тем же или по существу таким же, как эпитоп, распознаваемый клоном антитела, выбранным из группы, состоящей из клона 2 и клонов 4–8 (например, клоны 2, 4 и 5) и их варианты.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA распознает эпитоп PILRA человека во внеклеточном домене (ВКД) PILRA, например, ВКД, содержащем аминокислоты 20–143 SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с PILRA человека в эпитопе в стеблевой области PILRA. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA представляет собой антагонист, который ингибирует сигналинг PILRA.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с одной или более аминокислотами в одном или более из следующих положений: 63, 64, 78, 106, 143, 116–118 и 182–186, причем положения определяются со ссылкой на SEQ ID NO:1. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA, описанное в данном документе, связывается с одной или более аминокислотами в одном или более из следующих положений в SEQ ID NO: 1: 63, 64, 78, 106, 143, 116–118 и 182–186. На Фиг. 10 показано выравнивание последовательностей ВКД и стеблевой области супоPILRA, hPILRA и hPILRB. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с одной или более аминокислотами в одном или более из следующих положений: 78, 106 и 143 hPILRA. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с G78, K106 и/или E143 SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с G78 SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с R78 SEQ ID NO:136. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с K106 SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с E143 SEQ ID NO:1. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с G78, K106 и E143 SEQ ID NO:1. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с R78, K106 и E143 SEQ ID NO:136.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с одной или более аминокислотами в одном или более из следующих положений: 63 и 64 hPILRA. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с T63 и/или A64 SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с T63 SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с A64 SEQ ID NO:1. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA

связывается с T63 и A64 SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с одной или более аминокислотами в одном или более из следующих положений: 106 и 116–118 hPILRA. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с Q116, K117 и/или Q118 SEQ ID NO:1 (например, Q116, K117 и Q118).

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA распознает эпитоп в стеблевой области 2 hPILRA, например, QGKRR (SEQ ID NO:90) из положений 182–186 SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA распознает эпитоп, содержащий 1, 2, 3 или 4 аминокислоты в остатках 182–186 SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA распознает эпитоп, содержащий 2, 3 или 4 смежные аминокислоты в остатках 182–186 SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA распознает эпитоп, содержащий все пять аминокислот в остатках 182–186 SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с Q182, G183, K184, R185 и/или R186 SEQ ID NO:1 (например, Q182, G183, K184, R185, и R186).

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA распознает эпитоп в стеблевой области 1 hPILRA, например, TTQRPSSM (SEQ ID NO:91) из положений 156–163 SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA распознает эпитоп, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот в остатках 156–163 SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA распознает эпитоп, содержащий 2, 3, 4, 5, 6 или 7 смежных аминокислот в остатках 156–163 SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA распознает эпитоп, содержащий все восемь аминокислот в остатках 156–163 SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с T156, T157, Q158, R159, P160, S161, S162, и/или M163 SEQ ID NO:1 (например, T156, T157, Q158, R159, P160, S161, S162, и M163).

Перекрестная реактивность

В определенных вариантах осуществления антитело к PILRA распознает один или более эпитопов, консервативных между hPILRA и суноPILRA. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с одной или более аминокислотами в одном или более из следующих положений в hPILRA и/или в суноPILRA: 64, 78, 139, 143, 156–163 и 182–185, где положения определены со ссылкой на SEQ ID NO:1. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с одной или более аминокислотами в одном или более из следующих положений в hPILRA и в суноPILRA: 64, 78, 139, 143, 156–163 и 182–185, причем положения определены со ссылкой на SEQ ID NO:1. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с A64, G78,

W139, E143, T156, T157, Q158, R159, P160, S161, S162, M163, Q182, G183, K184, и/или R185 hPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO:1, и A68, G82, W143, E147, T160, T161, Q162, R163, P164, S165, S166, M167, Q186, G187, K188, и/или R189 супоPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO:2.

В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с A64 hPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO:1, и A68 супоPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO:2. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с G78 hPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO:1, и G82 супоPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO:2. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с R78 hPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO: 136, и G82 супоPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO: 2. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с W139 hPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO:1, и W143 супоPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO:2. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с E143 hPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO:1, и E147 супоPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO:2. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с одной и той же одной или более аминокислотами в TTQRPSSM (SEQ ID NO:91) как hPILRA (например, положения 156–163 SEQ ID NO:1), так и супоPILRA (например, положения 160–167 SEQ ID NO:2). В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с одной и той же одной или более аминокислотами в пределах QGKR (SEQ ID NO:92) как hPILRA (например, положения 182–185 SEQ ID NO:1), так и супоPILRA (например, положения 186–189 SEQ ID NO:2).

В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с G78, K106, E143 hPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO:1, и G82, D110, E147 супоPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO:2. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с R78, K106, E143 hPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO: 136, и G82, D110, E147 супоPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO: 2. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с T63 и A64 hPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO:1, и A67 и A68 супоPILRA, который имеет последовательность SEQ ID NO:2. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA связывается с одним или более положениями в пределах QGKRR (SEQ ID NO:90) hPILRA (например, положения 182–186 SEQ ID NO:1) и теми же соответствующими положениями с QGKRH (SEQ ID NO:93) супоPILRA (например, положения 186–190 SEQ ID NO:2).

Функциональные характеристики антител к PILRA

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA (например, антитело, имеющее одну или более последовательностей CDR, вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, как раскрыто) действует в отношении одной или более активностей, как описано в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA антагонизирует или снижает активность PILRA, т. е. активность PILRA, индуцированную лигандом.

В определенных вариантах осуществления антитело к PILRA блокирует связывание лиганда с hPILRA. В конкретных вариантах осуществления антитело к PILRA блокирует связывание сиалированного белка с hPILRA, например, сиалированной формы любого из следующих белков: белка контроля дифференцировки и пролиферации нервных клеток 1 (NPDC1), PILRA-ассоциированного нервного белка (PANP; PIANP), гликопротеина В вируса простого герпеса 1 типа (HSV-1 gB), коллектина-12 (COLEC12), компонента комплемента 4А (C4a), компонента комплемента 4В (C4b), дистрогликана 1 (дистрофин-ассоциированного гликопротеина 1; DAG1), и члена G семейства доменов лектина С-типа (Clec4g).

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA изменяет фосфорилирование одного или более нижестоящих белков, например, увеличивает фосфорилирование EGFR или STAT3 или снижает фосфорилирование STAT1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA индуцирует или увеличивает фосфорилирование одного или более нижестоящих белков (например, EGFR или STAT3), если уровень фосфорилирования нижестоящих белков в образце, обработанном антителом против PILRA, увеличивается на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более по сравнению с контрольным значением. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA индуцирует фосфорилирование одного или более нижестоящих белков (например, EGFR или STAT3), если уровень фосфорилирования нижестоящих белков в образце, обработанном антителом к PILRA, увеличивается в по меньшей мере 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более по сравнению с контрольным значением. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA снижает фосфорилирование одного или более нижестоящих белков (например, STAT1), если уровень фосфорилирования нижестоящих белков в образце, обработанном антителом к PILRA, снижается на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%,

по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более по сравнению с контрольным значением. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA снижает фосфорилирование одного или более нижестоящих белков (например, STAT1), если уровень фосфорилирования нижестоящих белков в образце, обработанном антителом к PILRA, снижается в по меньшей мере 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более по сравнению с контрольным значением.

В некоторых вариантах осуществления контрольное значение представляет собой уровень фосфорилирования нижестоящего белка в необработанном образце (например, образце, содержащем экспрессирующую PILRA клетку, не обработанную антителом к PILRA, или образце от субъекта, который не подвергался обработке антителом к PILRA), или образце, обработанном лигандом PILRA, но не антителом к PILRA, или образце, обработанном соответствующим не связывающим PILRA антителом.

В некоторых вариантах осуществления для обнаружения и/или количественной оценки фосфорилирования в образце используют иммуноанализ. В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ представляет собой иммуноферментный анализ (EIA), иммуноанализ с ферментативным усилением (EMIA), твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммуноферментный анализ на микрочастицах (MEIA), иммуногистохимию (ИГХ), иммуноцитохимию, иммуноанализ с капиллярным электрофорезом (CEIA), радиоиммуноанализ (РИА), иммунофлуоресценцию, хемилюминесцентный иммуноанализ (CL) или электрохемилюминесцентный иммуноанализ (ЭХЛ). В некоторых вариантах осуществления фосфорилирование обнаруживается и/или количественно определяется с помощью иммуноанализа, в котором используется гомогенный анализ усиленной за счет эффекта близости люминесценции (AlphaLISA®, PerkinElmer Inc.).

В некоторых вариантах осуществления фосфорилирование измеряют с использованием образца, который содержит одну или более клеток, например, одну или более экспрессирующих PILRA клеток (например, линию клеток, которая эндогенно экспрессирует PILRA, например, микроглию, полученную из iPСК человека, или линию, которая была разработана для экспрессии PILRA, например, как описано в разделе «Примеры» ниже). В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой жидкость, например, кровь, плазму, сыворотку, мочу или спинномозговую жидкость. В некоторых вариантах осуществления образец включает ткань (например, легкое, мозг, почку, селезенку, нервную ткань или скелетную мышцу) или клетки из такой ткани. В некоторых вариантах осуществления образец включает эндогенную жидкость, ткань или клетки (например, от человека или отличного от человека субъекта).

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA увеличивает экспрессию противовоспалительного гена или белка. Например, антитело к PILRA усиливает экспрессию гена IL1RN. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA усиливает экспрессию противовоспалительного гена или белка, если уровень экспрессии противовоспалительного гена или белка в образце, обработанном антителом к PILRA, увеличивается на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более по сравнению с контрольным значением. В других вариантах осуществления антитело к PILRA снижает экспрессию или секрецию белка провоспалительных цитокинов. Например, антитело к PILRA снижает экспрессию TNF, IL-6 и/или IP-10. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA снижает экспрессию белка цитокина, если уровень экспрессии белка цитокина в образце, обработанном антителом к PILRA, снижается на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более по сравнению с контрольным значением.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA усиливает миграцию клеток и/или функцию клеток (например, для микроглии, включая микроглию, полученную из iPСК, и микроглию, ассоциированную с заболеванием). Ассоциированную с заболеванием Микроглия, ассоциированная с заболеванием, и способы обнаружения ассоциированной с заболеванием микроглии описаны в публикации Keren-Shaul *et al.*, *Cell*, 2017, 169:1276-1290. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA усиливает миграцию клеток одного или более типов клеток (например, микроглии, моноцитов или нейтрофилов). В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA усиливает клеточную функцию (например, продукцию АТФ, метаболизм жирных кислот и/или клеточное дыхание) одного или более типов клеток (например, микроглии, моноцитов или нейтрофилов). В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA усиливает миграцию клеток и/или функцию клеток микроглии. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA усиливает миграцию клеток и/или клеточную функцию микроглии, ассоциированной с заболеванием.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA усиливает миграцию клеток и/или функцию клеток, если уровень активности в образце, обработанном антителом к PILRA, увеличивается на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%,

по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более по сравнению с контрольным значением. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA усиливает миграцию клеток и/или функцию клеток, если уровень активности в образце, обработанном антителом к PILRA, увеличивается в по меньшей мере в 2 раз, 3 раз, 4 раз, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, или более по сравнению с контрольным значением. В некоторых вариантах осуществления контрольное значение представляет собой уровень активности (например, миграции или функции) в необработанном образце (например, образце, который не был обработан антителом к PILRA), образце, который был обработан лигандом PILRA, но не антителом к PILRA, или образце, обработанном соответствующим не связывающим PILRA антителом.

В некоторых вариантах осуществления миграцию клеток измеряют с помощью анализа хемотаксиса. Анализы хемотаксиса известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления анализ миграции клеток (например, анализ хемотаксиса) проводят на образце, содержащем клетки, эндогенно экспрессирующие PILRA, например, полученную из iPSC микроглии. В некоторых вариантах осуществления анализ миграции клеток (например, анализ хемотаксиса) проводят на образце, содержащем клетки, которые были сконструированы для экспрессии PILRA. В некоторых вариантах осуществления анализ клеточной миграции проводят на образце, содержащем клетки, в которых PILRA был удален или стал функционально неактивным. В некоторых вариантах осуществления миграцию клеток измеряют с помощью анализа хемотаксиса, как описано в разделе «Примеры» ниже.

В некоторых вариантах осуществления функция клетки измеряют с помощью функционального анализа, подходящего для данной клетки. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA увеличивает метаболизм жирных кислот (например, окисление жирных кислот). В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA усиливает выработку клеточного АТФ. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA усиливает клеточное дыхание (например, митохондриальное или немитохондриальное дыхание). Изменения в продукции АТФ и/или дыхании клеток можно оценить с помощью одного или более анализов, например, как описано в разделе «Примеры» ниже.

IV. ПОЛИПЕПТИДЫ Fc И ИХ МОДИФИКАЦИИ

В некоторых аспектах антитело к PILRA содержит два полипептида Fc, один или оба из которых могут содержать независимо выбранные модификации (например, мутации) или могут представлять собой полипептид Fc дикого типа, например, полипептид Fc IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления один или оба

полипептида Fc в антителе к PILRA, описанном в данном документе, могут содержать последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичности последовательности с полипептидом Fc дикого типа (например, SEQ ID NO:94). В некоторых вариантах осуществления один полипептид Fc в антителе к PILRA, описанном в данном документе, может представлять собой полипептид Fc дикого типа (например, SEQ ID NO:94), тогда как другой полипептид Fc может иметь по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с полипептидом Fc дикого типа (например, SEQ ID NO:94). В некоторых вариантах осуществления оба полипептида Fc в антителе к PILRA, описанном в данном документе, могут представлять собой полипептид Fc дикого типа (например, SEQ ID NO:94). В некоторых вариантах осуществления оба полипептида Fc в антителе к PILRA, описанном в данном документе, могут иметь по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с полипептидом Fc дикого типа (например, SEQ ID NO:94). Неограничивающие примеры мутаций, которые можно ввести в один или оба полипептида Fc, включают, например, мутации для повышения стабильности в сыворотке, для модуляции эффекторной функции, для влияния на гликозилирование и/или для снижения иммуногенности у людей.

Модификации полипептида Fc для модулирования эффекторной функции

В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc, которые содержатся в антителе, описанном в данном документе, могут содержать модификации, снижающие эффекторную функцию, т.е. обладающие сниженной способностью индуцировать определенные биологические функции при связывании с Fc-рецептором, экспрессируемым на эффекторной клетке, которая опосредует эффекторную функцию. Примеры эффекторных функций антител включают, но не ограничиваются ими, связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ), связывание с Fc-рецептором, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (АЗКФ), снижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора) и активацию В-клеток. Эффекторные функции могут различаться в зависимости от класса антител. Например, нативные антитела IgG1 и IgG3 человека могут вызывать активность АЗКЦ и КЗЦ при связывании с соответствующим Fc-рецептором, присутствующим в клетке иммунной системы; и нативные человеческие IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 могут вызывать функции АЗКФ при связывании с соответствующим Fc-рецептором, присутствующим на иммунной клетке.

В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc в димере полипептида Fc могут иметь модификации, которые снижают или устраняют эффекторную функцию. Иллюстративные мутации полипептида Fc, которые снижают эффекторную функцию, включают, помимо прочего, замены в домене CH2, например, в положениях 234 и 235 и/или в положении 329, согласно схеме нумерации EU. Например, в некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc содержат остатки Ala в положениях 234 и 235 (также называемые в данном документе «LALA»). В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc содержат остаток Gly в положении 329 (также называемый в данном документе «P329G» или «PG») или остаток Ser в положении 329 (также называемый в данном документе «P329S» или «PS»). В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc содержат остатки Ala в положениях 234 и 235 и остаток Gly в положении 329 (также называемый в данном документе «LALA PG»). В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc содержат остатки Ala в положениях 234 и 235 и остаток Ser в положении 329 (также называемый в данном документе «LALA PS»).

Дополнительные мутации полипептида Fc, которые модулируют эффекторную функцию, включают, но не ограничиваются ими, следующее: положение 329 может иметь мутацию, в которой пролин замещен глицином или аргинином или аминокислотным остатком, достаточно большим для разрушения поверхности контакта Fc/Fc γ -рецептора, которая образуется между пролином 329 из Fc и остатками триптофана Trp 87 и Trp 110 из Fc γ RIII. Дополнительные иллюстративные замены включают S228P, E233P, L235E, N297A, N297D, и P331S в соответствии со схемой нумерации EU. Также могут присутствовать множественные замены, например, L234A и L235A области Fc IgG1 человека; L234A, L235A и P329G области Fc IgG1 человека; L234A, L235A и P329S области Fc IgG1 человека; S228P и L235E области Fc IgG4 человека; L234A и G237A области Fc IgG1 человека; L234A, L235A и G237A области Fc IgG1 человека; V234A и G237A области Fc IgG2 человека; L235A, G237A и E318A области Fc IgG4 человека; и S228P и L236E области Fc IgG4 человека в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc могут иметь одну или более аминокислотных замен, которые модулируют АЗКЦ, например, замены в положениях 298, 333 и/или 334 в соответствии со схемой нумерации EU.

Модификации полипептида Fc для продления времени полужизни в сыворотке

В некоторых вариантах осуществления модификации для увеличения периода полужизни в сыворотке можно вводить в любые полипептиды Fc, описанные в данном

документе. Например, в некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc в димере полипептида Fc могут содержать замены M428L и N434S (также называемые заменами LS), пронумерованные в соответствии со схемой нумерации EU. Альтернативно, один или оба полипептида Fc в димере полипептида Fc могут иметь замену N434S или N434A. Альтернативно, один или оба полипептида Fc в димере полипептида Fc могут иметь замену M428L. В других вариантах осуществления один или оба полипептида Fc в димере полипептида Fc могут содержать замены M252Y, S254T и T256E.

В некоторых вариантах осуществления у одного или обоих полипептидов Fc может быть удален С-концевой лизин (например, остаток Lys в положении 447 полипептида Fc в соответствии с нумерацией EU). С-концевой остаток лизина является высококонсервативным в иммуноглобулинах многих видов и может быть полностью или частично удален клеточным механизмом во время выработки белка. В некоторых вариантах осуществления удаление С-концевых лизинов в полипептидах Fc может улучшить стабильность белков.

В некоторых вариантах осуществления шарнирная область (например, SEQ ID NO:97) или ее часть (например, SEQ ID NO:98) могут быть присоединены к полипептиду Fc или модифицированному полипептиду Fc, описанному в данном документе. Шарнирная область может относиться к любому подклассу или изотипу иммуноглобулина. Иллюстративной шарнирной областью иммуноглобулина является шарнирная область IgG, такая как шарнирная область IgG1, например, шарнирная аминокислотная последовательность IgG1 человека EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:97) или ее часть (например, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:98). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область находится в N-концевой области полипептида Fc.

V. ЛИНИИ КЛЕТОК И СПОСОБЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ

В данном документе предложены также клетки и линии клеток, которые являются гомозиготными по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA, гомозиготными по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA, или гетерозиготными по гену, кодирующему вариант G78 и вариант R78 белка PILRA. Настоящее изобретение относится к сконструированным человеческим индуцированным плюрипотентным стволовым клеткам (иПСК) или линии клеток, которая была модифицирована (т. е. генетически сконструирована) для экспрессии двух копий (т. е. гомозиготна по) гена, кодирующего вариант R78 или вариант G78 белка PILRA. В некоторых вариантах осуществления иПСК модифицирована в эндогенном геномном локусе.

Настоящее изобретение также относится к сконструированной микроглиальной

клетке или линии клеток, полученной из человеческой индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (иПСК), которая была модифицирована (т. е. генетически сконструирована) для экспрессии двух копий (т. е. гомозиготна по) гена, кодирующего вариант R78 или вариант G78 белка PILRA. Сконструированная микроглиальная клетка или линия клеток также может быть получена из человеческой индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (иПСК), которая была модифицирована (т. е. генетически сконструирована) для экспрессии одной копии гена, кодирующего вариант R78, и одной копии гена, кодирующего вариант G78 белка PILRA (т. е. гетерозиготна по гену, кодирующему варианты R78 и G78). В некоторых вариантах осуществления иПСК модифицирована в эндогенном геномном локусе. В некоторых вариантах осуществления сконструированную микроглиальную клетку или линию клеток получают путем направленной дифференцировки.

В контексте данного документа также предложены две линии клеток, представляющие собой подобранную пару линий клеток (например, линия иПСК или полученная из нее микроглия), в которых одна линия клеток экспрессирует вариант G78 белка PILRA, а другая линия клеток экспрессирует вариант R78 белка PILRA. В данном описании предложена подобранная пара линий клеток, где: (a) первая линия клеток пары является гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA; и (b) вторая линия клеток пары является гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA, причем как первая, так и вторая линии клеток пары получена из одной и той же исходной линии клеток, и одна или обе линии клеток были сконструированы по эндогенному гену PILRA. В конкретных вариантах осуществления подобранной пары линий клеток исходная линия клеток, используемая для создания подобранной пары линий клеток, может быть гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA, что означает, что из исходной линии клеток необходимо получить только ту линию клеток в паре, которая является гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA. В других вариантах осуществления подобранной пары линий клеток исходная линия клеток, используемая для создания подобранной пары линий клеток, может быть гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA, что означает, что из исходной линии клеток необходимо получить только ту линию клеток в паре, которая является гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA. В других вариантах осуществления исходная линия клеток является гетерозиготной по гену, кодирующему вариант R78 и вариант G78 белка PILRA (т. е. один аллель, кодирующий вариант G78, и другой аллель, кодирующий вариант R78). В этом случае обе линии клеток в подобранной паре должны быть созданы из исходной линии клеток.

В некоторых вариантах осуществления подобранной пары линий клеток включена третья линия клеток, которая является гетерозиготной по гену, кодирующему вариант G78 и вариант R78 белка PILRA. В некоторых вариантах осуществления третья линия клеток получена из исходной клеточной линии, которая является гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 или вариант G78 белка PILRA.

В настоящем изобретении также предложены способы создания линии миелоидных клеток или линии стволовых клеток, способной дифференцироваться в линию миелоидных клеток (например, линию iPСК или полученную из нее микроглию) с модифицированным геном PILRA, при этом способ включает: (а) определение того, является ли существующая линия миелоидных клеток или существующая линия стволовых клеток гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA, или гетерозиготной по гену, кодирующему варианты R78 и G78 белка PILRA; и (b) конструирование линии клеток путем модификации гена, кодирующего белок PILRA, для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA или вариант G78 белка PILRA, причем сконструированная линия клеток не была до конструирования гомозиготной по гену, кодирующему выбранный вариант. Другими словами, в зависимости от существующей линии клеток, существующая линия клеток может нуждаться или не нуждаться в модификации для создания выбранного варианта в желаемой линии клеток.

В настоящем описании также предложены способы создания подобранной пары линий клеток (например, линии iPСК или полученной из нее микроглии), причем способ включает: (а) определение того, является ли существующая линия миелоидных клеток или существующая линия стволовых клеток, способная дифференцироваться в линию миелоидных клеток, гомозиготную по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA, гомозиготную по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA, или гетерозиготную по гену, кодирующему варианты R78 и G78 белка PILRA; и (b) получение (i) первой линии клеток путем модификации гена, кодирующего белок PILRA, для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA, и/или (ii) вторую линию клеток путем модификации гена, кодирующего белок PILRA, с получением линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA. В некоторых вариантах осуществления сконструированная линия клеток до ее создания не была гомозиготной по гену, который кодирует выбранный вариант.

В конкретных вариантах осуществления существующая линия клеток, полученная

на стадии (а), является гомозиготной по варианту R78 белка PILRA, а конструирование на стадии (b) включает модификацию существующей линии клеток для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA. В конкретных вариантах осуществления существующая линия клеток, полученная на стадии (а), является гомозиготной по варианту G78 белка PILRA, а конструирование на стадии (b) включает модификацию существующей линии клеток для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA. В других вариантах осуществления существующая линия клеток, полученная на стадии (а), является гетерозиготной по гену, кодирующему варианты R78 и G78 белка PILRA, а конструирование на стадии (b) включает модификацию существующей линии клеток для получения линии сконструированной клеток, которая является гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA, и линии сконструированной клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA.

Сконструированные клетки или линии клеток с модификациями эндогенного геномного локуса (например, локуса гена PILRA) можно создавать с использованием различных методов и методик, например, системы CRISPR/Cas9, нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции, (TALEN) и транспозон-опосредованной системы. Эти способы обычно включают введение в клетку одного или более полинуклеотидов, кодирующих одну или более нуклеаз, так что нуклеаза опосредует модификацию эндогенного гена путем расщепления ДНК с образованием обрезанных 5'- и 3'-концов в цепи ДНК. В присутствии донорной последовательности, которая фланкирована левым и правым плечами гомологии, которые по существу гомологичны последовательности, простирающейся в 5'-направлении от 5'-конца, и последовательности, простирающейся в 3'-направлении от 3'-конца, донор интегрируется в эндогенный ген, на который воздействует нуклеаза посредством гомологичной репарации (HDR). В некоторых вариантах осуществления модификацию эндогенного геномного локуса проводят с использованием системы CRISPR/Cas9. Например, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая гетерологичный ген, кодирующий PILRA с желаемым вариантом, вводится в эндогенный геномный локус PILRA модифицируемой клетки, в результате чего природная последовательность, кодирующая эндогенный PILRA, заменяется на гетерологичный ген.

CRISPR

В некоторых вариантах осуществления введение или нокаут гетерологичного гена, кодирующего PILRA, с желаемым вариантом осуществляют с использованием системы

CRISPR/Cas9. Система CRISPR/Cas9 включает белок Cas9 и по меньшей мере одну-две рибонуклеиновые кислоты, которые способны направлять белок Cas9 и гибридизоваться с целевым мотивом в эндогенном гене PILRA, который подлежит замене. Эти рибонуклеиновые кислоты, как правило, называют «одионой направляющей РНК» или «онРНК». Затем белок Cas9 расщепляет целевой мотив, что приводит к двухцепочечному или одноцепочечному разрыву. В присутствии донорской ДНК, которая содержит гетерологичную последовательность гена PILRA, фланкированную двумя гомологичными плечами, донорская ДНК встраивается в целевую ДНК, заменяя эндогенный ген.

Белок Cas9, используемый в настоящем изобретении, может представлять собой природный белок Cas9 или его функциональное производное. «Функциональное производное» полипептида с нативной последовательностью представляет собой соединение, обладающее качественным биологическим свойством, общим с полипептидом с нативной последовательностью. «Функциональные производные» включают, помимо прочего, фрагменты нативной последовательности и производные полипептида с нативной последовательностью и его фрагментов при условии, что они обладают биологической активностью, общей с соответствующим полипептидом с нативной последовательностью. Биологическая активность, рассматриваемая в данном документе, представляет собой способность функционального производного Cas9 гидролизовать ДНК-субстрат на фрагменты. Подходящие функциональные производные полипептида Cas9 или его фрагмента включают, помимо прочего, мутанты, слитые молекулы, ковалентные модификации белка Cas9 или его фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 получен из *Streptococcus pyogenes*. Cas9 содержит 2 домена эндонуклеазы, включая RuvC-подобный домен, который расщепляет целевую ДНК, некомплементарную онРНК, и нуклеазный домен HNH, который расщепляет целевую ДНК, комплементарную онРНК. Двухцепочечная эндонуклеазная активность Cas9 также требует, чтобы короткая консервативная последовательность (2–5 нуклеотидов), известная как протоспейсер-ассоциированный мотив (PAM), следовала сразу за 3'-концом целевого мотива в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления мотив PAM представляет собой мотив NGG. В реакцию вводят донорскую ДНК. В одном примере донорская ДНК содержит гетерологичный ген PILRA желаемого варианта, который находится между левым плечом гомологии и правым плечом гомологии.

онРНК можно выбирать в зависимости от конкретной используемой системы CRISPR/Cas9 и последовательности целевого полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления от одной до двух рибонуклеиновых кислот предназначены для

гибридизации с целевым мотивом, непосредственно примыкающим к мотиву дезоксирибонуклеиновой кислоты, распознаваемому белком Cas9. В некоторых вариантах осуществления каждая из одной-двух рибонуклеиновых кислот предназначена для гибридизации с целевыми мотивами, непосредственно соседними с мотивами дезоксирибонуклеиновой кислоты, распознаваемыми белком Cas9, причем целевые мотивы фланкируют заменяемую геномную последовательность. Направляющие РНК можно создать с помощью программного обеспечения, которое легко доступно, например, по адресу <http://crispr.mit.edu>.

В некоторых вариантах осуществления донорская ДНК, как раскрыто в данном документе, содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность варианта G78 hPILRA. В некоторых вариантах осуществления донорская ДНК, как раскрыто в данном документе, содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность варианта R78 hPILRA. Донорская ДНК, как раскрыто в данном документе, дополнительно содержит левое плечо гомологии и правое плечо гомологии, которые фланкируют нуклеотидную последовательность и предназначены для перекрытия экзонной области со стороны 5'-конца и экзонной области со стороны 3'-конца относительно сайта расщепления белком Cas9. Плечи гомологии могут выходить за пределы экзонной области со стороны 5'-конца и экзонной области со стороны 3'-конца, и каждое из плеч гомологии может иметь длину по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 100 или 150 нуклеотидов. Специалист в данной области техники может легко определить оптимальную длину плеча гомологии, необходимую для эксперимента.

В некоторых вариантах осуществления онРНК также можно выбирать так, чтобы минимизировать гибридизацию с последовательностями нуклеиновой кислоты, отличными от целевой полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления одна-две рибонуклеиновые кислоты предназначены для гибридизации с целевым мотивом, который содержит по меньшей мере два несовпадения по сравнению со всеми другими геномными нуклеотидными последовательностями в клетке, чтобы минимизировать нецелевые эффекты системы CRISPR/Cas9. Специалисты в данной области техники поймут, что различные методы могут быть применены для выбора подходящих целевых мотивов для минимизации нецелевых эффектов (например, биоинформатические анализы).

Нуклеаза с цинковыми пальцами (ZFN)

В некоторых вариантах осуществления введение или нокин гетерологичного гена, кодирующего PILRA, с желаемым вариантом осуществляют с использованием ZFN. ZFN

представляют собой слитые белки, которые содержат домен неспецифического расщепления (N) эндонуклеазы FokI и белок с цинковыми пальцами (ZFP). Пара ZNF участвует в распознавании определенного локуса в целевом гене: один распознает последовательность выше, а другой распознает последовательность ниже сайта, подлежащего модификации. Нуклеазная часть ZFN разрезает определенный локус. Затем донорскую ДНК можно вставить в конкретный локус. Способы использования ZFN хорошо известны, например, как описано в патенте США № 9045763, а также в Durai *et al.*, «Zinc Finger Nucleases: Custom-Designed Molecular Scissors for Genome Engineering of Plant and Mammalian cells», *Nucleic Acid Research*, 33 (18):5978-5990 (2005), раскрытия которых включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции, (TALEN)

В некоторых вариантах осуществления введение или нокин гетерологичного гена, кодирующего PILRA, с желаемым вариантом осуществляют с использованием TALEN. TALEN похожи на ZFN в том, что они связываются парой вокруг геномного сайта и направляют одну и ту же неспецифическую нуклеазу FokI на расщепление генома в определенном сайте, но вместо распознавания триплетов ДНК каждый домен распознает один нуклеотид. Способы использования ZFN также хорошо известны техники, например, как описано в патенте № 9005973, а также Christian *et al.*, «Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases», *Genetics*, 186(2): 757-761 (2010), описания которых полностью включены посредством ссылки.

Настоящее изобретение также предложены способы создания подобранной пары линий клеток из существующей линии миелоидных клеток (например, линии iPSC или полученной из нее микроглии) или существующей линии стволовых клеток, способной дифференцироваться в линию миелоидных клеток, которая является гетерозиготной по гену, кодирующему варианты R78 и G78 белка PILRA, причем способ включает: (a) конструирование существующей линии клеток для получения первой линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA; и (b) конструирование либо линии клеток, полученной на стадии (a), либо существующей линии клеток для получения второй линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA. Как описано в данном документе, систему CRIPSR/Cas9 можно использовать для создания подобранной пары линий клеток с использованием донорской ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность варианта R78 или варианта G78 hPILRA.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу получения совпадающей пары линий клеток из существующей линии миелоидных клеток или существующей линии стволовых клеток, способной дифференцироваться в миелоидные клетки (например, линию iPСК или полученную из нее микроглию), которая является гетерозиготной по гену, кодирующему варианты R78 и G78 белка PILRA, причем способ включает: (a) конструирование существующей линии клеток для получения первой линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA; и (b) конструирование либо линии клеток, полученной на стадии (a), либо существующей линии клеток для получения второй линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA. Как описано в данном документе, систему CRIPSR/Cas9 можно использовать для создания подобранной пары линий клеток с использованием донорской ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность варианта R78 или варианта G78 hPILRA.

Настоящее изобретение также относится к способам создания подобранной пары линии клеток из существующей линии миелоидных клеток или существующей линии стволовых клеток, способной дифференцироваться в линию миелоидных клеток (например, линию iPСК или полученную из нее микроглию), которая является гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA, причем способ включает: конструирование существующей линии клеток для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA. Как описано в данном документе, систему CRIPSR/Cas9 можно использовать для создания подобранной пары линий клеток с использованием донорской ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность варианта G78 hPILRA.

Настоящее изобретение также относится к способам создания подобранной пары линии клеток из существующей линии миелоидных клеток или существующей линии стволовых клеток, способной дифференцироваться в линию миелоидных клеток (например, линию iPСК или полученную из нее микроглию), которая является гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA, причем способ включает: конструирование существующей линии клеток для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA. Как описано в данном документе, систему CRIPSR/Cas9 можно использовать для создания подобранной пары линий клеток с использованием донорской ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность варианта R78

hPILRA.

В некоторых вариантах осуществления сконструированную клетку, линию клеток или модель клетки, описанные в данном документе, получают путем направленной дифференцировки.

VI. СПОСОБЫ СКРИНИНГА

В настоящем описании также предложены способы скрининга и идентификации молекул, которые связываются и/или модулируют экспрессию или активность белка PILRA, особенно молекул, которые антагонизируют или снижают активность PILRA (т. е. молекул, которые блокируют связывание лиганда с hPILRA). В некоторых вариантах осуществления можно измерить один или более нисходящих сигнальных ответов, связанных со связыванием и/или активацией PILRA, для идентификации молекул, связывающих PILRA. Например, молекула, которая связывается с белком PILRA клетки, может вызывать один или более нисходящих сигнальных ответов или активностей клетки в результате связывания PILRA. В некоторых вариантах осуществления молекула, которая связывается с белком PILRA, может вызывать усиление или снижение сигнального ответа или активности клетки в результате связывания PILRA по сравнению с сигнальным ответом или активностью клетки без связывания PILRA. Примеры изменений в сигнальных ответах или активности клетки в результате связывания PILRA включают, помимо прочего, изменения уровня фосфорилированного STAT3 (pSTAT3), уровня фосфорилированного STAT1 (pSTAT1), уровня фосфорилированного EGFR (pEGFR), экспрессии кадгерина, экспрессии интегрина и миграции клеток (например, микроглии). В конкретных вариантах осуществления молекулы, которые связываются с PILRA и антагонизируют или снижают активность PILRA, могут вызывать нисходящий сигнальный ответ, такой как повышение уровня pSTAT3 (например, pSTAT3 Y705 или pSTAT3 S727), увеличение уровня pEGFR, увеличение уровня экспрессии и/или клеточной секреции белка (например, кадгерина, интегрина) и/или увеличение миграции клеток (например, микроглии). Примерами других нисходящих сигнальных реакций, которые могут быть вызваны молекулами, которые связываются с PILRA и антагонизируют или снижают активность PILRA, могут быть, например, усиленное клеточное дыхание, усиленный метаболизм жирных кислот (например, окисление жирных кислот), повышенная продукция АТФ, повышенная экспрессия противовоспалительного гена или белка и/или сниженная экспрессия цитокинового белка.

В данном документе предложены способы скрининга для определения того, обладает ли молекула активностью в отношении белка PILRA, при этом способ включает: (а) приведение в контакт клетки, которая экспрессирует белок PILRA, с указанной

молекулой; (b) либо до, одновременно с или после стадии (a), приведение в контакт клетки того же типа, что и на стадии (a), имеющей более низкую экспрессию PILRA, с указанной молекулой; и (c) измерение одного из следующих показателей: уровня фосфорилированного STAT3 (pSTAT3), уровня фосфорилированного STAT1 (pSTAT1), уровня фосфорилированного EGFR (pEGFR), экспрессии кадгерина, экспрессии интегрина и миграции микроглии в обеих клетках. В некоторых вариантах осуществления изменение уровня одного из этих показателей между клетками указывает на то, что молекула обладает активностью в отношении белка PILRA на стадии (a).

В некоторых вариантах осуществления способов скрининга клетка, полученная на стадии (a), естественным образом экспрессирует белок PILRA. В некоторых вариантах осуществления в клетке, имеющей более низкую экспрессию PILRA, белок PILRA нокаутирован или подвергнут сайленсингу. В конкретных вариантах осуществления клетка может представлять собой микроглию. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой iMicroglia (например, iMicroglia с потерей функции PILRA).

В некоторых вариантах осуществления способов скрининга клетку, полученную на стадии (a), конструируют или модифицируют для экспрессии или сверхэкспрессии белка PILRA. В некоторых вариантах осуществления клетка, имеющая более низкую экспрессию PILRA, естественным образом экспрессирует белок PILRA или не была сконструирована или модифицирована для экспрессии белка PILRA.

В некоторых вариантах осуществления библиотека молекул может быть проверена с использованием способов, описанных в данном документе. Известно, что в некоторых случаях молекула связывает белок PILRA. В других случаях неизвестно, связывает ли молекула белок PILRA. Примеры молекул, которые можно подвергнуть скринингу для определения того, обладает ли молекула какой-либо активностью в отношении белка PILRA, включают, помимо прочего, антитела, пептиды, органические малые молекулы или нуклеиновые кислоты.

В данном документе также предложены способы определения того, модулирует ли молекула, которая связывает белок PILRA, сигнальный ответ или активность в экспрессирующей PILRA клетке, причем способ включает: (a) приведение клетки в контакт с молекулой; и (b) измерение одного из следующих показателей: уровня фосфорилированного STAT3 (pSTAT3), уровня фосфорилированного STAT1 (pSTAT1), уровня фосфорилированного EGFR (pEGFR), экспрессии кадгерина, экспрессии интегрина и миграции клеток (например, микроглии). В некоторых вариантах осуществления изменение уровня одного из показателей указывает на то, что молекула модулирует сигнальный ответ или активность в экспрессирующей PILRA клетке. В

определенных вариантах осуществления изменение представляет собой увеличение или снижение уровня одного из показателей, когда молекула контактирует с клеткой, относительно уровня в клетке без молекулы, в частности, изменения описаны в других местах заявки. В конкретных вариантах осуществления этих способов клетка используется в анализе *in vitro*. В других вариантах осуществления клетка находится в организме млекопитающего (т. е. способы *in vivo*).

В некоторых вариантах осуществления, когда способы используются в условиях *in vivo*, стадия (а) включает введение указанной молекулы млекопитающему.

В некоторых вариантах осуществления экспрессирующая PILRA клетка может представлять собой микроглию, миелоидную клетку, моноцит или нейтрофил.

Скрининговые анализы

Скрининговые анализы для идентификации молекул, которые связываются и/или модулируют экспрессию или активность белка PILRA, можно проводить стандартными методами. Методы скрининга могут включать в себя высокопроизводительные методики. Кроме того, эти методики скрининга можно проводить на культивируемых клетках или на таких организмах, как мыши, черви, мухи или дрожжи.

Для проведения таких скрининговых анализов существует целый ряд методов. Согласно одному подходу, молекулы-кандидаты добавляются в различных концентрациях в культуральную среду для экспрессирующих PILRA клеток. Если нисходящий сигналинг, такой как индукция фосфо-STAT3 (pSTAT3), используется для измерения того, связывается ли молекула и/или модулирует ли она экспрессию или активность белка PILRA, уровни pSTAT3 можно измерить в клетке, которая экспрессирует белок PILRA, и сравнить с уровнем pSTAT3 в соответствующей клетке, которая экспрессирует более низкий уровень PILRA (например, при нокауте PILRA). В других случаях уровень pSTAT3 можно измерить до и после добавления молекулы в клетку. Эти уровни pSTAT3 можно сравнить.

В еще одном подходе также можно измерить клеточную секрецию белков, таких как интегрины и кадгеринины, чтобы определить, связывается ли молекула и/или модулирует ли она экспрессию или активность белка PILRA, поскольку в примерах показано, что антитела к PILRA усиливают секрецию этих белков iMicroglial. Для выделения этих белков из клетки можно использовать стандартные лабораторные методы, а обнаружение этих белков можно проводить с использованием, например, масс-спектрометрии, вестерн-блоттинга и набора Proteome Profiler; Human Soluble Receptor Array Kit Non-Hematopoietic Panel (R&D ARY012).

В других вариантах осуществления кандидатную молекулу, которая связывается с

белком PILRA, можно идентифицировать с использованием метода, основанного на хроматографии. Например, рекомбинантный PILRA можно очистить стандартными методами из клеток, сконструированных для экспрессии PILRA, и можно иммобилизовать на колонке. Затем через колонку пропускают раствор кандидатных молекул, и молекулу, специфичную для PILRA, идентифицируют на основании ее способности связываться с полипептидом и иммобилизоваться на колонке. Чтобы выделить молекулу, колонку промывают для удаления неспецифически связанных молекул, а затем представляющую интерес молекулу высвобождают из колонки и собирают. Молекулы, выделенные этим методом (или любым другим подходящим методом), при желании могут быть дополнительно очищены (например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии).

Тестируемые молекулы

В общем, потенциальные молекулы можно идентифицировать из больших библиотек как натуральных продуктов, так и синтетических (или полусинтетических) экстрактов или химических библиотек в соответствии с методами, известными в данной области техники. Специалисты в области изыскания и разработки новых лекарственных средств поймут, что точный источник тестируемых экстрактов или соединений не имеет решающего значения для процедуры (процедур) скрининга согласно изобретению. Соответственно, по существу любое количество химических экстрактов или молекул можно подвергнуть скринингу с использованием описанных в данном документе способов. Примеры таких экстрактов или молекул включают, но не ограничиваются ими, экстракты растений, грибов, прокариотов или животных, ферментационные бульоны, синтетические соединения, а также модификации существующих соединений. Также доступны многочисленные методы для проведения случайного или направленного синтеза (например, полусинтеза или полного синтеза) любого количества химических соединений, включая, помимо прочего, соединения на основе сахаридов, липидов, пептидов и полинуклеотидов. Библиотеки синтетических соединений коммерчески доступны. Альтернативно, коммерчески доступны библиотеки природных соединений в форме экстрактов бактерий, грибов, растений и животных. Кроме того, при желании получают природные и синтетически полученные библиотеки в соответствии со способами, известными в данной области техники, например, с помощью стандартных методов экстракции и фракционирования. Более того, при желании любую библиотеку или соединение можно легко модифицировать с использованием стандартных химических, физических или биохимических методов.

Если обнаружено, что неочищенный экстракт обладает активностью, необходимо

дальнейшее фракционирование положительного перспективного экстракта для выделения химических компонентов, ответственных за наблюдаемый эффект. Таким образом, целью процесса экстракции, фракционирования и очистки является характеристика и идентификация химического соединения в неочищенном экстракте, обладающего желаемой активностью. Способы фракционирования и очистки таких гетерогенных экстрактов известны в данной области техники. При желании молекулы, которые оказались полезными, могут быть химически модифицированы в соответствии с методами, известными в данной области техники.

VII. ИЗМЕРЕНИЕ АКТИВНОСТИ СВЯЗЫВАЮЩИХ PILRA МОЛЕКУЛ В КЛЕТКАХ ИЛИ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНОГО

В данном документе также предложены способы измерения связывания и/или активности молекулы, которая связывается с белком PILRA (например, hPILRA G78 или R78). В некоторых вариантах осуществления молекула антагонизирует или снижает активность PILRA (т. е. молекул, которые блокируют связывание лиганда с hPILRA). Для определения связывания и/или активности связывающей PILRA молекулы и ее воздействия на клетку или животное можно провести различные измерения. Например, в данном документе мы продемонстрировали, что индукция фосфорилированного STAT3 представляет собой нисходящий клеточный сигнальный ответ, который является зависимым от PILRA и происходит, когда PILRA антагонизируется.

В некоторых вариантах осуществления для измерения связывания и/или активности связывающей PILRA молекулы после инкубации клеток со связывающей PILRA молекулой уровень фосфорилированного STAT3 (например, pSTAT3 Y705 и/или pSTAT3 S727) можно измерить, используя, например, набор Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit (например, ARY003C, R&D Systems). В других вариантах осуществления для измерения уровней фосфорилированного белка после инкубации клеток со связывающей PILRA молекулой клетки можно фиксировать и фосфорилированный белок можно обнаружить с использованием стандартного иммуноцитохимического протокола. Затем клетки можно визуализировать с помощью конфокального микроскопа, а изображения можно проанализировать с помощью программного обеспечения для расчета средней площади и интенсивности флуоресцентного пятна на клетку для определения уровня фосфорилированного белка.

Другие клеточные ответы, которые зависят от связывания PILRA (т. е. антагонизирующие), включают, например, повышение уровня фосфорилированного EGFR (например, pEGFR Y1086), который также можно измерить с использованием набора Phospho-Kinase Array Kit или иммуноцитохимического анализа, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления измерение уровня фосфорилирования STAT3 и/или EGFR при связывании PILRA молекулами можно использовать для ранжирования антагонистических эффектов молекул. Например, можно определить, что связывающая PILRA молекула, связывание которой привело к самому высокому уровню pSTAT3, обладает наибольшей антагонистической активностью в отношении белка PILRA.

Другие измерения, которые можно провести для определения связывания и/или активности связывающей PILRA молекулы и ее воздействия на клетку или животное, включают, например, измерение миграции клеток, которая представляет собой еще один нисходящий клеточный сигнальный ответ, который является зависимым от PILRA и происходит, когда PILRA антагонизируется. Как описано, например, в Примере 4, измерение и количественную оценку миграции клеток можно проводить с использованием анализа миграции клеток, где можно использовать резиновую пробку для создания свободной от клеток зоны детекции. Затем резиновую пробку можно удалить после добавления связывающей PILRA молекулы и добавить клеточный краситель, такой как NucBlue или DAPI. Клетки можно визуализировать с помощью микроскопии, а изображения можно анализировать с помощью программного обеспечения для количественной оценки меченых ядер клеток, которые мигрировали в зону детекции. Кроме того, поскольку связывающие PILRA молекулы, которые являются антагонистами PILRA, также усиливают клеточную секрецию подвижных белков, также можно провести количественную оценку таких подвижных белков в клеточном супернатанте после добавления связывающей PILRA молекулы к клеткам. Например, растворимые аналиты в супернатантах можно анализировать с помощью набора Proteome Profiler, такого как набор Human Soluble Receptor Array Kit Non-Hematopoietic Panel (например, R&D ARY012). Примеры подвижных белков, которые можно количественно определить таким способом, включают, помимо прочего, кадгерин и интегрины.

Измерение связывания и/или активности связывающей PILRA молекулы можно проводить в клетке или организме животного (например, мышей, обезьян). Для исследований *in vivo* животному, например, животному, экспрессирующему белок PILRA (например, PILRA G78 или R78), можно вводить связывающую PILRA молекулу любым доступным способом введения (например, внутривенное, внутрибрюшинное, пероральное, интраназальное или трансдермальное введение). Соответствующие образцы клеток, тканей и/или жидкости могут быть выделены у животного для измерения и количественной оценки одного или более зависимых от PILRA нисходящих сигнальных ответов, описанных в данном документе, таких как уровень pSTAT3, уровень pEGFR,

количество подвижных белков (например, кадгеринов, интегринов). В некоторых вариантах осуществления клетка или животное гомозиготны по гену, кодирующему G78 PILRA. В некоторых вариантах осуществления клетка или животное гомозиготны по гену, кодирующему PILRA R78. В некоторых вариантах осуществления клетка или животное являются гетерозиготными по гену, кодирующему варианты G78 и R78 PILRA.

VIII. ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ

В некоторых вариантах осуществления антитела получают путем иммунизации животного или животных (например, мышей, кроликов или крыс) антигеном или смесью антигенов для индукции образования антител. В некоторых вариантах осуществления антиген или смесь антигенов вводят в сочетании с адъювантом (например, адъювантом Фрейнда). После первичной иммунизации для улучшения выработки антител может быть назначена одна или более последующих бустерных инъекций антигена или антигенов. После иммунизации антигенспецифические В-клетки собирают, например, из селезенки и/или лимфоидной ткани. Для получения моноклональных антител В-клетки сливаются с клетками миеломы, которые впоследствии проходят скрининг на антигенную специфичность. Способы получения антител также описаны в разделе «Примеры» ниже.

Гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи представляющего интерес антитела, можно клонировать из клетки, например, гены, кодирующие моноклональное антитело, можно клонировать из гибридомы и использовать для получения рекомбинантного моноклонального антитела. Генные библиотеки, кодирующие тяжелые и легкие цепи моноклональных антител, также могут быть получены из гибридомных или плазматических клеток. В качестве альтернативы можно использовать технологию фагового или дрожжевого дисплея для идентификации антител и фрагментов Fab, которые специфически связываются с выбранными антигенами. Антитела также могут быть биспецифическими, то есть способными распознавать два разных антигена. Антитела также могут быть гетероконъюгатами, например, двумя ковалентно соединенными антителами, или иммунотоксинами.

Антитела могут быть получены с использованием любого количества систем экспрессии, включая прокариотические и эукариотические системы экспрессии. В некоторых вариантах осуществления система экспрессии представляет собой систему экспрессии клеток млекопитающих, такую как гибридома, или система экспрессии клеток СНО. Многие такие системы широко доступны у коммерческих поставщиков. В вариантах осуществления, в которых антитело содержит как область V_H , так и V_L , области V_H и V_L могут быть экспрессированы с использованием одного вектора, например, в дицистронной экспрессионной единице, или находиться под контролем различных

промоторов. В других вариантах осуществления области V_H и V_L могут быть экспрессированы с использованием отдельных векторов. Области V_H или V_L , как описано в данном документе, могут необязательно содержать метионин на N-конце.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой химерное антитело. Способы получения химерных антител известны в данной области техники. Например, могут быть получены химерные антитела, в которых антигенсвязывающая область (вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи) одного вида, например, мыши, слита с эффекторной областью (константным доменом) другого вида, например, человека. В качестве другого примера можно привести химерные антитела с «переключением класса», в которых эффекторная область антитела заменена эффекторной областью другого класса или подкласса иммуноглобулинов.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело. Как правило, нечеловеческое антитело гуманизируют, чтобы снизить его иммуногенность. Гуманизированные антитела, как правило, содержат одну или более вариабельных областей (например, CDR) или их части, которые не являются человеческими (например, полученные из мышиной последовательности вариабельной области), и, возможно, некоторые каркасные области или их части, которые не являются человеческими, и дополнительно содержат одну или более константных областей, которые получены из последовательностей антител человека. Способы гуманизации нечеловеческих антител известны в данной области техники. Трансгенные мыши или другие организмы, например, другие млекопитающие, могут быть использованы для экспрессии гуманизированных или человеческих антител. Другие способы гуманизации антител включают, например, изменение поверхности вариабельного домена, замену CDR, замену определяющих специфичность остатков (SDR), направленный отбор и перетасовку в каркасе.

В качестве альтернативы гуманизации могут быть получены полностью человеческие антитела. В качестве неограничивающего примера могут быть получены трансгенные животные (например, мыши), которые способны после иммунизации производить полный репертуар человеческих антител в отсутствие выработки эндогенного иммуноглобулина. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена области присоединения тяжелой цепи антитела (JH) у химерных и мутантных мышей зародышевой линии приводит к полному ингибированию продукции эндогенных антител. Перенос массива генов человеческого иммуноглобулина зародышевой линии у таких мышей-мутантов зародышевой линии приведет к выработке человеческих антител при заражении антигеном. В качестве другого примера, антитела человека могут быть

получены методами на основе гибридомы, например, с использованием первичных В-клеток человека для генерации линий клеток, продуцирующих человеческие моноклональные антитела.

Антитела человека также могут быть получены с помощью технологии фагового дисплея или дрожжевого дисплея. При фаговом дисплее репертуары генов варибельной тяжелой цепи и варибельной легкой цепи амплифицируются и экспрессируются в векторах фагового дисплея. В некоторых вариантах осуществления библиотека антител представляет собой естественный репертуар, амплифицированный из человеческого источника. В некоторых вариантах осуществления библиотека антител представляет собой синтетическую библиотеку, созданную путем клонирования последовательностей тяжелой и легкой цепей и рекомбинации для получения большого пула антител с различной антигенной специфичностью. Фаги обычно экспонируют фрагменты антител (например, фрагменты Fab или фрагменты scFv), которые затем подвергают скринингу на связывание с представляющим интерес антигеном.

В некоторых вариантах осуществления генерируются фрагменты антител (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, V_H, или V_{HH}). Для получения фрагментов антител были разработаны различные методы. Традиционно данные фрагменты получали путем протеолитического расщепления интактных антител. Однако теперь эти фрагменты могут быть получены непосредственно с использованием рекомбинантных клеток-хозяев. Например, фрагменты антител можно выделить из фаговых библиотек антител. Альтернативно, фрагменты Fab'-SH могут быть выделены непосредственно из клеток *E. coli* и химически связаны с образованием фрагментов F(ab')₂. В соответствии с другим подходом фрагменты F(ab')₂ могут быть выделены непосредственно из рекомбинантной культуры клеток-хозяев. Другие методики получения фрагментов антител будут очевидны для специалистов в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела конъюгируют с другой молекулой, например, с полиэтиленгликолем (ПЭГилирование) или сывороточным альбумином, для обеспечения увеличенного периода полужизни *in vivo*.

IX. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, ВЕКТОРЫ И КЛЕТКИ-ХОЗЯЕВА

В некоторых вариантах осуществления антитела к PHLRA, как описано в данном документе, получают с помощью рекомбинантных способов. Соответственно, в некоторых аспектах в изобретении предложены выделенные нуклеиновые кислоты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любое из антител к PHLRA, как описано в данном документе (например, любое одно или более из CDR,

вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи, описанных в данном документе); векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты; и клетки-хозяева, в которые введены нуклеиновые кислоты и которые используются для репликации кодирующих антитела нуклеиновых кислот и/или для экспрессии антител.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид) содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или более аминокислотных последовательностей (например, последовательностей CDR, тяжелой цепи или легкой цепи), раскрытых в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с последовательностью (например, последовательностью CDR, тяжелой цепи или легкой цепи), описанной в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, как описано в данном документе, функционально связан с гетерологичной нуклеиновой кислотой, например, гетерологичным промотором.

Подходящие векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие антитела по настоящему изобретению, или их фрагменты, включают векторы клонирования и векторы экспрессии. Хотя выбранный вектор клонирования может варьироваться в зависимости от клетки-хозяина, предназначенной для применения, полезные векторы клонирования, как правило, обладают способностью к саморепликации, могут иметь одну мишень для конкретной рестрикционной эндонуклеазы и/или могут нести гены для маркера, который может быть использован при отборе клонов, содержащих вектор. Примеры включают плазмиды и бактериальные вирусы, *например* pUC18, pUC19, Bluescript (например, pBS SK+) и их производные, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ДНК фага и челночные векторы, такие как pSA3 и pAT28. Эти и многие другие векторы клонирования доступны от коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Strategene и Invitrogen.

Векторы экспрессии, как правило, представляют собой реплицируемые полинуклеотидные конструкции, которые содержат нуклеиновую кислоту по данному изобретению. Вектор экспрессии может реплицироваться в клетках-хозяевах либо в виде эписом, либо в качестве неотъемлемой части хромосомной ДНК. Подходящие векторы

экспрессии включают, но не ограничиваются ими, плазмиды, вирусные векторы, включая аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы и любой другой вектор.

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии полинуклеотида или вектора, как описано в данном документе, включают прокариотические или эукариотические клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является прокариотической. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например, клетками яичника китайского хомяка (СНО) или лимфоидными клетками. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку человека, *например* клетку почки эмбриона человека (НЕК).

В еще одном аспекте представлены способы получения антитела к P1LRA, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клетки-хозяина, как описано в данном документе (например, клетки-хозяина, экспрессирующей полинуклеотид или вектор, как описано в данном документе), в условиях, подходящих для экспрессии антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело впоследствии выделяют из клетки-хозяина (или среды для культивирования клеток-хозяев).

X. ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ АНТИТЕЛ К P1LRA

В еще одном аспекте представлены терапевтические способы с использованием антитела к P1LRA, как описано в данном документе (например, антитела к P1LRA, как описано в Разделе III выше). В некоторых вариантах осуществления представлены способы лечения нейродегенеративного заболевания. В некоторых вариантах осуществления представлены способы модуляции одной или более активностей P1LRA (например, у субъекта с нейродегенеративным заболеванием).

В некоторых вариантах осуществления представлены способы лечения нейродегенеративного заболевания. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание выбрано из группы, состоящей из: болезни Альцгеймера, первичной возрастной таупатии, прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), лобно-височной деменции, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17, деменции с аргирофильным зерном, бокового амиотрофического склероза, бокового амиотрофического склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуама (БАС-КПД), кортикобазальной дегенерации, хронической травматической энцефалопатии, болезни Крейтцфельда — Якоба, деменции боксеров, диффузных нейрофибрилярных клубков с кальцификацией, синдрома Дауна, семейной деменции британского типа, семейной деменции датского типа, болезни Герстмана —

Штраусслера — Шейнкера, глобулярной глиальной таупатии, паркинсонизма гваделупского типа с деменцией, ПНП гваделупского типа, болезни Галлервордена — Шпатца, наследственной диффузной лейкоэнцефалопатии со сфероидами (НДЛС), болезни Хантингтона, миозита с тельцами включения, множественной системной атрофии, миотонической дистрофии, болезни Насу — Хакола, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, болезни Ниманна — Пика типа С, паллидо-понтонигральной дегенерации, болезни Паркинсона, болезни Пика, постэнцефалитного паркинсонизма, церебральной амилоидной ангиопатии, вызванной прионным белком, прогрессирующего субкортикального глиоза, подострого склерозирующего панэнцефалита и деменции, характеризующейся только клубками. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Насу — Хакола. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание представляет собой лобно-височную деменцию. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Паркинсона. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который специфически связывается с белком hPILRA человека, например, антитела к PILRA, как описано в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей антитело к PILRA, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA (или его антигенсвязывающая часть или фармацевтическая композиция), как описано в данном документе, используется для лечения нейродегенеративного заболевания, которое характеризуется активностью PILRA. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание, характеризующееся активностью PILRA, представляет собой болезнь Альцгеймера.

В некоторых вариантах осуществления представлены способы модуляции одной или более активностей PILRA у субъекта (например, у субъекта с нейродегенеративным заболеванием). В некоторых вариантах осуществления способ включает антагонизацию или снижение активности PILRA, например, блокирование связывания лиганда с hPILRA, изменение фосфорилирования одного или более нижестоящих белков (например, увеличивает фосфорилирование EGFR или STAT3; снижает фосфорилирование STAT1), усиление клеточного дыхания, метаболизм жирных кислот (например, окисление жирных кислот) и продукцию АТФ, усиление миграции клеток, увеличение экспрессии противовоспалительных генов или белков и/или снижение экспрессии цитокиновых

белков. Таким образом, в другом аспекте предложены способы антагонизации активности PILRA, например, у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления способ модуляции одной или более активностей PILRA у субъекта включает введение субъекту выделенного антитела или его антигенсвязывающей части, которая специфически связывается с белком PILRA, например, антитела к PILRA, как описано в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей антитело к PILRA, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, представляет собой человека, например, взрослого человека или ребенка.

В некоторых вариантах осуществления представлены способы уменьшения скопления бляшек у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту антитела или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает болезнью Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой животную модель нейродегенеративного заболевания (например, мышиную модель 5XFAD или APP/PS1). В некоторых вариантах осуществления накопление бляшек измеряют путем визуализации амилоидных бляшек и/или визуализации Тау-белков, например, с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). В некоторых вариантах осуществления введение антитела к PILRA снижает накопление бляшек на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или на по меньшей мере 90% по сравнению с исходным значением (например, уровнем накопления бляшек у субъекта до введения антитела к PILRA).

В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA вводят субъекту в терапевтически эффективном количестве или дозе. Дозы, однако, могут варьировать в зависимости от нескольких факторов, включая выбранный путь введения, состав композиции, реакцию пациента, тяжесть состояния, массу субъекта и мнение лечащего врача. Дозировка может быть увеличена или уменьшена с течением времени, как того требует индивидуальный пациент. В определенных случаях пациенту сначала дают низкую дозу, которую затем повышают до эффективной дозы, переносимой пациентом. Определение эффективного количества находится в пределах компетенции специалистов в данной области техники.

Способ введения антитела к PILRA, описанного в данном документе, может быть пероральным, внутривенным, транскутaneous, подкожным, внутривенным, внутримышечным, внутривенным, ингаляционным, местным, внутриочаговым,

ректальным, внутрибронхиальным, назальным, трансмукозальным, кишечным, посредством введения в глаз или ухо или любым другим способом, известным в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят перорально, внутривенно или внутривентально.

В некоторых вариантах осуществления антитело к pILRA (и, необязательно, другой терапевтический агент) вводят субъекту в течение длительного периода времени, например, по меньшей мере 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350 дней или дольше.

XI. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ И НАБОРЫ

В еще одном аспекте представлены фармацевтические композиции и наборы, содержащие антитело, которое специфически связывается с белком hPILRA. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции и наборы предназначены для применения в лечении нейродегенеративного заболевания. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции и наборы предназначены для применения в модуляции (например, усилении или ингибировании) одной или более активностей PILRA, например, фосфорилирования EGFR, STAT3, и/или STAT1.

Фармацевтические композиции

В некоторых вариантах осуществления представлены фармацевтические композиции, содержащие антитело к PILRA или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело к PILRA представляет собой антитело, описанное в Разделе III выше, или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело к PILRA, описанное в данном документе, и дополнительно содержит один или более фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов. Фармацевтически приемлемый носитель включает любые растворители, дисперсионные среды или покрытия, которые являются физиологически совместимыми и которые не препятствуют или иным образом не препятствуют активности активного агента. Различные фармацевтически приемлемые эксципиенты хорошо известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, перорального, внутривентального, интратекального, чрескожного, местного или подкожного введения. Фармацевтически приемлемые носители могут содержать одно или более физиологически приемлемых соединений, которые действуют, например, стабилизируя композицию или увеличивая или уменьшая абсорбцию активного агента(-ов). Физиологически приемлемые соединения могут включать, например, углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, антиоксиданты, такие как

аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки, композиции, которые уменьшают клиренс или гидролиз активных агентов, или вспомогательные вещества или другие стабилизаторы и/или буферы. Другие фармацевтически приемлемые носители и их составы хорошо известны в данной области техники.

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть получены способом, который известен специалистам в данной области техники, например, посредством обычных способов смешивания, растворения, гранулирования, приготовления драже, эмульгирования, инкапсулирования, захвата, или лиофилизации. Следующие способы и наполнители приведены только в качестве примера и никоим образом не ограничивают.

Для перорального введения антитело к P1LRA может быть составлено путем комбинирования его с фармацевтически приемлемыми носителями, которые хорошо известны в данной области техники. Такие носители позволяют получить соединения в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, эмульсий, липофильных и гидрофильных суспензий, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей, суспензий и т. п. для перорального приема пациентом, подлежащим лечению. Фармацевтические препараты для перорального применения могут быть получены путем смешивания соединений с твердым эксципиентом, необязательного измельчения полученной смеси и обработки смеси гранул после добавления при желании подходящих вспомогательных веществ с получением ядер таблеток или драже. Подходящие эксципиенты включают, например, наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; препараты целлюлозы, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакантовая камедь, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза и/или поливинилпирролидон (ПВП). При желании могут быть добавлены разрыхлители, такие как сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или их соль, такая как альгинат натрия.

Антитело к P1LRA может быть составлено для парентерального введения путем инъекции, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Для инъекций соединение или соединения могут быть включены в препараты путем растворения, суспендирования или эмульгирования их в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие подобные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, сложные эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоль; и, при желании, с обычными добавками, такими как солюбилизаторы,

изотонические агенты, суспендирующие агенты, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты. В некоторых вариантах осуществления соединения могут быть приготовлены в водных растворах, например, в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Препараты для инъекций могут быть представлены в виде стандартной лекарственной формы, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах, с добавлением консерванта. Композиции могут принимать такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и могут содержать рецептурные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

Как правило, фармацевтическая композиция для применения *in vivo* является стерильной. Стерилизация может быть выполнена способами, известными в данной области техники, *например* тепловой стерилизацией, стерилизацией паром, стерильной фильтрацией или облучением.

Дозировки и желаемая концентрация лекарственного средства в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться в зависимости от предполагаемого конкретного использования. Определение подходящей дозировки или пути введения находится в компетенции специалиста в данной области техники. Подходящие дозировки также описаны выше.

Наборы

В некоторых вариантах осуществления предложены наборы, содержащие антитело к P1LRA. В некоторых вариантах осуществления антитело к P1LRA представляет собой антитело, описанное в Разделе III выше, или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит один или более дополнительных терапевтических агентов. Например, в некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело к P1LRA, как описано в данном документе, и дополнительно содержит один или более дополнительных терапевтических агентов для применения в лечении нейродегенеративного заболевания, например, болезни Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой агент для применения в лечении когнитивного или поведенческого симптома нейродегенеративного заболевания (например, антидепрессант, агонист дофамина или антипсихотик). В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой нейропротекторное средство (например, карбидопа/леводопа, антихолинергическое средство, дофаминергическое средство, ингибитор моноаминоксидазы В (МАО-В), ингибитор катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ), глутаматергическое средство, ингибитор деацетилазы гистонов (HDAC), каннабиноид,

ингибитор каспазы, мелатонин, противовоспалительное средство, гормон (например, эстроген или прогестерон) или витамин).

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело к PILRA, как описано в данном документе, и дополнительно содержит один или более реагентов для измерения активности, индуцированной антителом к PILRA (например, для измерения фосфорилирования EGFR, STAT3 и/или STAT1).

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит инструктивные материалы, содержащие указания (т. е. протоколы) по применению описанных в данном документе способов (например, инструкции по применению набора для терапевтического способа, как описано выше). Хотя учебные материалы, как правило, содержат письменные или печатные материалы, это не ограничивается ими. Любой носитель информации, способный хранить такие инструкции и передавать их конечному пользователю, предусмотрен данным изобретением. Такие носители информации включают, но не ограничиваются этим, электронные носители данных (например, магнитные диски, ленты, картриджи, чипы), оптические носители (например, CD-ROM) и т. п. Такие носители информации могут включать адреса интернет-сайтов, на которых предоставлены такие инструктирующие материалы.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение будет описано более подробно на конкретных примерах. Следующие примеры предложены исключительно в иллюстративных целях и никоим образом не подразумевают ограничения изобретения.

Пример 1. Оценка связывания PILRA и PILRB в полученных из иПСК клетках микроглии, HEK293 и CHO-K1

мкАт к PILRA, связывающееся с HEK293, CHO-K1 и микроглией, полученной из иПСК человека

Исходные клетки HEK293 метили реагентом NucBlue Live ReadyProbes в течение 30 минут. Исходные клетки HEK293 и экспрессирующие hPILRA HEK293, смешивали, промывали и инкубировали с различными концентрациями антител к PILRA или антител изотипического контроля в течение 30 минут на льду в разбавителе для FACS (PBS, 0,2% BSA и 1 нМ ЭДТА). Клетки дважды промывали разбавителем для FACS, инкубировали с конъюгированными с Alexa Fluor 647 антителом к IgG человека в течение 30 минут на льду и один раз промывали. Связывание антител с клетками определяли с помощью FACS, а среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) определяли на основе анализа данных, выполненного с помощью программного обеспечения FLOJO (Фиг. 1A-1C).

CHO-K1 и клетки CHO-K1, экспрессирующие hPILRA, инкубировали с антителами

к PILRA или антителами изотипического контроля в одной концентрации 100 нМ в течение 30 минут на льду. Клетки дважды промывали разбавителем для FACS, затем инкубировали с конъюгированными с Alexa Fluor 647 антителом к IgG человека в течение 30 минут на льду и один раз промывали разбавителем для FACS. Связывание антител с клетками определяли с помощью FACS, а MFI получали на основе анализа данных, выполненного с помощью программного обеспечения FLOJO (Фиг. 1G). На Фиг. 1A-1C и 1G показано связывание антител к PILRA с hPILRA, экспрессируемого на клетках HEK293 и CHO-K1. Отсутствие связывания антител к PILRA с исходными клетками HEK293 и CHO-K1 также демонстрирует специфичность связывания.

Человеческую микроглию, полученную из iPSC дикого типа (человеческая iMicroglia; гетерозиготная по PILRA R78/G78) или iPSC с потерей функции (LoF) PILRA (человеческая iMicroglia с потерей функции PILRA), обрабатывали 100 нМ биотинилированных антител к PILRA или антител изотипического контроля в течение 45 минут на льду. Клетки промывали PBS с последующей 30-минутной инкубацией со стрептавидином, конъюгированным с Alexa Fluor 488, в течение 30 минут на льду. Клетки визуализировали с помощью конфокальной микроскопии после нескольких промывок PBS. Программное обеспечение Harmony использовали для расчета средней площади флуоресцентного пятна на клетку. Данные представлены в виде кратности экспрессии относительно фонового сигнала в контрольных лунках, обработанных только стрептавидином, конъюгированным с Alexa Fluor 488, (Фиг. 1J и 1K). На Фиг. 1J и 1K показано связывание антител к PILRA с iMicroglia человека, типом клеток, релевантным для ЦНС, с эндогенными уровнями hPILRA на поверхности клеток. Кроме того, отсутствие связывания антител к PILRA с человеческим iMicroglia с потерей функции PILRA продемонстрировало специфичность связывания с hPILRA. Кроме того, отсутствие связывания антитела изотипического контроля как с iMicroglia человека, так и с iMicroglia с потерей функции PILRA продемонстрировало отсутствие связывания неспецифического антитела с типом клеток, релевантным для ЦНС.

Связывание мкАТ к PILRA с клетками CHO, экспрессирующими супоPILRA или hPILRB

Клетки CHO-K1, CHO-K1, экспрессирующие супоPILRA, и клетки CHO-K1, экспрессирующие hPILRB, инкубировали с антителами к PILRA или антителами изотипического контроля в одной концентрации 100 нМ в течение 30 минут на льду. Клетки дважды промывали разбавителем для FACS, затем инкубировали с конъюгированными с Alexa Fluor 647 антителом к IgG человека в течение 30 минут на льду и один раз промывали разбавителем для FACS. Связывание антител с клетками

определяли с помощью FACS, а MFI получали на основе анализа данных, выполненного с помощью программного обеспечения FLOJO. Как показано на Фиг. 2А, антитела к PILRA связывались с клетками CHO-K1, экспрессирующими супоPILRA, но не связывались с клетками CHO-K1, экспрессирующими hPILRB, или с исходными клетками CHO-K1. Связывание антител к PILRA с супоPILRA, экспрессируемым на клетках CHO-K1, продемонстрировало взаимодействие антител с мишенями на клеточной поверхности и перекрестную реактивность с указанным белком яванского макака, что является уникальным свойством связывания, позволяющим оценивать безопасность антител и проводить исследования ТО/ФК/ФД на яванских макаках.

В целом, антитела к PILRA связывались с клетками HEK293 и CHO-K1, экспрессирующими hPILRA, а также с клетками CHO-K1, экспрессирующими супоPILRA, демонстрируя специфичность связывания и перекрестную реактивность с указанным белком яванского макака. Антитела также связывались с iMicroglia человека, которые экспрессируют hPILRA на уровне эндогенной клеточной поверхности, и не связывались с iMicroglia с потерей функции PILRA.

Пример 2. Характеристика антител к PILRA

Свойства связывания

Аффинность связывания антител к PILRA с hPILRA, hPILRB и внеклеточным доменом супоPILRA (ВКД) измеряли методом SPR с использованием прибора Biacore 8K (таблица 2). Антитела улавливали на сенсорных чипах Biacore™ Series S CM5, иммобилизованных с помощью мышиных античеловеческих Fab (набор для захвата человеческих Fab от GE Healthcare), с последующими инъекциями серийных 3-кратных разведений реагентов рекомбинантных ВКД со скоростью потока 30 мкл/мин. Каждый образец анализировали с использованием 3-минутной ассоциации с последующей 10-минутной диссоциацией. После каждой инъекции сенсорный чип регенерировали с использованием 50 мМ глицинового буфера для регенерации, pH 2,0. Для анализа кинетики использовали модель Ленгмюра 1:1 с одновременной аппроксимацией значений k_{on} и k_{off} .

Эпитопное картирование

Эпитопы на белке PILRA, с которыми связываются антитела против PILRA, были идентифицированы методом SPR с использованием прибора Biacore 8K. Антитела к PILRA захватывали на сенсорных чипах Biacore™ Series S CM5, иммобилизованных с помощью мышиного антитела к Fab (набор для захвата человеческого Fab от GE Healthcare), с последующими инъекциями вариантами с одиночными точечными мутациями, превращающими PILRA в PILRB, в концентрации 1 мкМ. Для эпитоп-

специфической сортировки 1 мкМ рекомбинантного человеческого PILRA вводили в течение 300 секунд в каждый канал сенсорного чипа Biacore™ Series S CM5, иммобилизованного с антителами к PILRA. Связывание вторичного антитела к PILRA контролировали путем последующей инъекции одного антитела к PILRA в каждом цикле.

Блокирование лиганда человеческого PILRA

Характеристики блокирования лигандов антител к PILRA оценивали методом SPR с использованием прибора Biacore 8K (Фиг. 3А и 3В). Антитела к PILRA улавливали на сенсорных чипах Biacore™ Series S CM5, иммобилизованных с помощью мышиного антитела к Fab человека (набор для захвата человеческого Fab от GE Healthcare), с последующими инъекциями 300 нМ рекомбинантного ВКД hPILRA. Взаимодействие hPILRA-лиганд контролировали путем последующего введения рекомбинантных лигандов PILRA: hNPDC1(35-181), hPANP(76-178) и HSV gB(23-279), которые являются известными сиалированными лигандами PILRA. Блокирование связывания лигандов с hPILRA продемонстрировало, что антитела способны антагонизировать hPILRA.

В таблице 2 ниже показаны аффинности связывания антител к PILRA с hPILRA G78, hPILRA R78, hPILRB и супоPILRA, значения EC50 для связывания, измеренные в клетках HEK293, экспрессирующих hPILRA G78, антитела, связывающие эпитопы hPILRA, а также то, блокировали ли антитела различные тестируемые лиганды.

Таблица 2

| Клон антитела к PILRA | Аффинность связывания по SPR | | | | Связывание клеток, EC50 (HEK293 с hPILRA G78) | Эпитоп PILRA человека | Блокирование лиганда |
|-----------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|---|-----------------------|------------------------------|
| | Человеческий PILRA G78 | Человеческий PILRA R78 | PILRB человека | PILRA яванского макака | | | |
| 1 | 2,3 нМ | | Отсутствие связывания | 910 пМ | 13,76 нМ | G78, K106, E143 | Все протестированные лиганды |
| 2 | 690 пМ | 270 нМ | Отсутствие связывания | 1,7 нМ | 12,51 нМ | G78, K106, E143 | Все протестированные лиганды |
| 3 | 1,7 нМ | | Отсутствие связывания | 3,0 нМ | 14,09 нМ | G78, K106, E143 | Все протестированные лиганды |
| 4 | 8,3 нМ | | Отсутствие связывания | 7,4 нМ | 24,88 нМ | G78, K106, E143 | Все протестированные лиганды |

| Клон антитела к PILRA | Аффинность связывания по SPR | | | | Связывание клеток, EC50 (HEK293 с hPILRA G78) | Эпитоп PILRA человека | Блокирование лиганда |
|------------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|---|-----------------------|------------------------------|
| | Человеческий PILRA G78 | Человеческий PILRA R78 | PILRB человека | PILRA яванского макака | | | |
| 5 | 660 нМ | | Отсутствие связывания | 19 нМ | 32,52 нМ | T63, A64 | Все протестированные лиганды |
| 6 | 720 нМ | 9,6 нМ | 90 нМ | 5,6 нМ | 9,30 нМ | G78, K106, E143 | Все протестированные лиганды |
| 7 | 1,2 нМ | 17 нМ | 250 нМ | 4,8 нМ | 13,0 нМ | G78, K106, E143 | Все протестированные лиганды |
| 8 | 11 нМ | | Отсутствие связывания | 59 нМ | 535,9 нМ | T63, A64 | Все протестированные лиганды |
| 9 | 1,6 нМ | | Отсутствие связывания | Отсутствие связывания | 1,283 нМ | K106 | Блокирует только gB |
| 10 | 61 нМ | | Отсутствие связывания | Отсутствие связывания | 1,284 нМ | 116–118 | Блокирует только gB |
| 11 | 140 нМ | | Отсутствие связывания | 110 нМ | 10,50 нМ | Стебель 2 | Отсутствует |
| Эталонное антитело № 1 | | | Отсутствие связывания | Отсутствие связывания | 639 нМ | 116–118 | Блокирует только gB |
| Эталонное антитело № 2 | | | Отсутствие связывания | Отсутствие связывания | 1,33 нМ | 116–118 | Блокирует только gB |
| Эталонное антитело № 3 | | | Отсутствие связывания | Отсутствие связывания | 1,56 нМ | 116–118 | Блокирует только gB |
| Эталонное антитело № 4 | | | Отсутствие связывания | Отсутствие связывания | 2,07 нМ | 116–118 | Блокирует только gB |

Как показано выше, все наши антитела к PILRA продемонстрировали сильное связывание с hPILRA (как варианты G78, так и R78) и с *syn*PILRA, но не показали никакого связывания или очень слабое связывание с hPILRB. Кроме того, 8 из 11 антител блокировали все протестированные лиганды, тогда как клон 9 и клон 10 блокировали

gB(23-279) HSV. Однако все четыре эталонных антитела не связывались с супоPILRA и блокировали только gB (23-279) HSV.

Пример 3. Сигнальные пути, индуцированные антителами к PILRA

Оценка активности белка фосфокиназы в iMicroglia человека и iMicroglia с потерей функции PILRA – EGFR и STAT3 Y705

Понимание нисходящего сигналинга PILRA имеет решающее значение для идентификации антагонистических антител. Человеческая iMicroglia дикого типа и iMicroglia с потерей функции PILRA высевали на 72 день культивирования *in vitro* в содержащую сыворотку среду. Среду меняли через 24 часа для удаления сыворотки, а клетки лизировали через 72 часа. Уровни фосфокиназы pEGFR Y1086 (Фиг. 4А) и pSTAT3 Y705 (Фиг. 4В) измеряли с использованием набора Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit (ARY003C, R&D Systems) согласно инструкциям по применению.

Оценка нисходящего сигналинга для антитела к PILRA в клетках HEK293, экспрессирующих hPILRA G78 или hPILRA R78 – STAT3 Y705, STAT3 S727 и EGFR

Исходные клетки HEK293 или клетки HEK293, экспрессирующие hPILRA G78 (PILRA с Gly в положении 78) или hPILRA R78 (PILRA с Arg в положении 78), обрабатывали 100 нМ мкАт к PILRA или изотипического контроля в течение 30–60 минут в условиях низкого уровня сыворотки (1% эмбриональной бычьей сыворотки). Клетки фиксировали 4% ледяным параформальдегидом и окрашивали на pSTAT3 Y705 (обработка в течение 30 минут; Фиг. 4С), pSTAT3 S727 (обработка в течение 60 минут; Фиг. 4D) и pEGFR Y1086 (обработка в течение 60 минут; Фиг. 4Е) или с использованием стандартного иммуоцитохимического протокола. Клетки визуализировали с помощью конфокального микроскопа, а изображения анализировали в программном обеспечении Harmony для расчета средней площади и интенсивности флуоресцентного пятна на клетку.

Для оценки чувствительности к дозе моноклонального антитела к PILRA клетки HEK293, экспрессирующие hPILRA G78, титровали дозу антител к PILRA (<200 нМ) в течение 30 минут в условиях низкого содержания сыворотки (Фиг. 4F). В таблице 3 приведены значения кратности относительно фона (кратная индукция pSTAT3 Y705 для каждого антитела по сравнению с антителом изотипического контроля) и значения EC50, показывающие эффективность в нМ для индукции pSTAT3 Y705 для каждого антитела. Дозозависимая индукция pSTAT3 Y705 в клетках HEK293, экспрессирующих hPILRA G78, может быть использована для ранжирования антагонистических антител на основе эффективности и максимального эффекта. Индукция фосфорилированных STAT3 Y705,

STAT3 S727 и EGFR Y1086 в клетках HEK293, экспрессирующих hPILRA G78, но не в исходных клетках HEK293, продемонстрировала специфическую PILRA-зависимый нисходящий сигналинг. Кроме того, отсутствие индукции сигналинга антителом изотипического контроля продемонстрировало селективность и специфичность PILRA.

Таблица 3

| Клон антитела к PILRA | Кратность относительно фона | EC50 (нМ) |
|-----------------------|-----------------------------|-----------|
| 11 | 1,423 | н/д |
| 1 | 16,23 | 5,660 |
| 9 | 16,90 | 5,931 |
| 10 | 26,74 | 5,690 |
| 2 | 15,96 | 1,454 |
| 5 | 15,82 | 1,510 |
| 4 | 14,71 | 1,979 |

Гуманизированные антитела к PILRA также тестировали на индукцию сигналинга фосфо-STAT. Как показано на Фиг. 4G и 4H, доза антител к PILRA титруется на человеческих клетках HEK, экспрессирующих PILRA 78G, и индуцирует pSTAT3 Y705 (Фиг. 4G) или pSTAT3 S727 (Фиг. 4H) через 30 минут. Значения EC50 (таблица 4) демонстрируют эффективность в нМ для индукции pSTAT3 Y705 или pSTAT3 S727 для каждого антитела. Данные представлены в виде кратного среднего значения экспрессии +/- СОС относительно изотипического контроля, n=2 биологических повтора (Фиг. 4G), n=2 технических повтора (Фиг. 4H).

Таблица 4

| Клон антитела к PILRA | Индукция фосфо-STAT3 (Y705) | | Индукция фосфо-STAT3 (S727) | |
|-----------------------|-----------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|
| | Кратность относительно фона | EC50 (нМ) | Кратность относительно фона | EC50 (нМ) |
| 6 | 33,12 | 12,07 | 30,06 | 16,00 |
| 12 | 31,31 | 11,67 | 31,60 | 16,04 |
| 15 | 33,47 | 16,95 | 32,19 | 17,53 |
| 7 | 32,53 | 12,98 | 26,59 | 18,62 |
| 23 | 31,39 | 12,19 | 23,57 | 20,11 |
| 35 | 35,53 | 11,39 | 28,89 | 23,01 |

Кроме того, как показано на Фиг. 4К и 4L, дозу антител к PILRA титровали на человеческих клетках HEK293, экспрессирующих PILRA 78R, и индуцировали pSTAT3 Y705 (Фиг. 4К) или pSTAT3 S727 (Фиг. 4L) через 30 минут. Значения EC50 (таблица 5) эффективность в нМ для индукции pSTAT3 Y705 для каждого антитела. Данные представлены в виде кратного среднего значения экспрессии +/- СОС относительно изотипического контроля, n=3 биологических повтора (Фиг. 4К), n=2 технического повтора (Фиг. 4L).

Таблица 5

| Клон антитела к PILRA | Индукция фосфо-STAT3 (Y705) | | Индукция фосфо-STAT3 (S727) | |
|-----------------------|-----------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|
| | Кратность относительно фона | EC50 (нМ) | Кратность относительно фона | EC50 (нМ) |
| 6 | 37,64 | 3,177 | 21,01 | 7,133 |
| 12 | 34,64 | 4,533 | 21,45 | 7,412 |
| 15 | 38,21 | 5,655 | 24,78 | 12,65 |
| 7 | 38,30 | 5,378 | 28,85 | 10,70 |
| 23 | 36,18 | 7,547 | 28,49 | 14,57 |
| 35 | 41,03 | 6,193 | 30,05 | 10,57 |

Дозозависимая индукция pSTAT3 (Y705) и/или pSTAT3 (S727) в клетках HEK293, экспрессирующих hPILRA 78R или 78G, может быть использована для ранжирования антагонистических антител на основе эффективности и максимального эффекта.

Чтобы оценить, зависит ли индукция pSTAT3 Y705 от mTOR, клеткам вводили ингибиторы mTOR Torin 1 (31,25–500 нМ) или AZD8055 (3,125–50 нМ) в течение 2 часов перед введением 100 нМ мкАт к PILRA или антител изотипического контроля в течение 30 минут. На Фиг. 4I показано, что pSTAT3 Y705, индуцированный антителами к PILRA, частично блокировался ингибиторами mTOR.

Кроме того, на Фиг. 4J показано, что антитела к PILRA индуцируют pSTAT3 Y705 в защитных от БА клетках HEK293, экспрессирующих PILRA R78. Антитело к PILRA, которое связывается с PILRA G78 (клон 2 Ат), частично блокирует индукцию pSTAT3 Y705 в клетках HEK293, экспрессирующих защитный от БА PILRA R78. Антитела к PILRA, которые связываются с отличными от G78 эпитопами (клоны 9, 10 и 5 Ат), показали сходную индукцию pSTAT3 Y705 в PILRA G78 и PILRA R78. В исходных клетках HEK293 индукции pSTAT3 не наблюдали. Защитный от БА вариант PILRA R78

имеет пониженную способность связывания лигандов и, вероятно, также меньшую аффинность к антителам, которые связываются с G78 (например, клоны 2 и 4 Ат). Частота этого защитного от БА варианта PILRA R78 варьируется по всему миру. Это минорный аллель в популяциях Африки (10%) и Европы (38%), но главный аллель (65%) в популяциях Восточной Азии. Антитела к PILRA, которые связываются с PILRA R78, могут быть связаны с потерей аффинности у значительной части людей. Однако, Клон 5 Ат, который связывается с другим эпитопом, индуцирует устойчивый нисходящий сигналинг (pSTAT3 Y705) в клетках, экспрессирующих вариант R78 PILRA. Такие антитела к PILRA могут помочь снизить риск потери активности клеток, экспрессирующих PILRA R78, наблюдаемой для антител, которые связываются с G78, например, клон 2 Ат.

Оценка STAT1 в клетках iMicroglia человека, iMicroglia с потерей функции PILRA и клетках HEK293

Человеческая iMicroglia дикого типа и iMicroglia с потерей функции PILRA высевали на 45 день культивирования *in vitro* в содержащую сыворотку среду. Среду меняли через 24 часа для удаления сыворотки. Через 4 дня после посева клетки обрабатывали 100 нМ антитела к PILRA и лизировали через 30 минут. Уровни фосфорилированного STAT1 Y701 (Фиг. 4M) измеряли с помощью анализа AlphaLisa в соответствии с инструкциями.

Человеческая iMicroglia дикого типа и iMicroglia с потерей функции PILRA высевали на 58 день культивирования *in vitro* в содержащую сыворотку среду. Среду меняли через 24 часа для удаления сыворотки, а клетки лизировали через 72 часа. Общие уровни STAT1 (Фиг. 4N) измеряли с помощью анализа AlphaLisa в соответствии с инструкциями по применению. Уровни фосфо-STAT1 Y701 (Фиг. 4O) также измеряли в лизированных исходных клетках или клетках HEK293, экспрессирующих hPILRA G78, с помощью анализа AlphaLisa в соответствии с инструкциями по применению.

Антитела к PILRA использовали для обработки iMicroglia дикого типа человека и iMicroglia с потерей функции PILRA. Как показано на Фиг. 4P, всего лишь 30 минут введения антител к PILRA в концентрации 100 нМ снижали уровни фосфорилированного STAT1 Y701, имитируя фенотип iMicroglia с PILRA. Антитела к PILRA также использовали для обработки исходных клеток HEK293 и клеток HEK293, экспрессирующих PILRA G78. Как показано на Фиг. 4Q и 4R, мкАт к PILRA снижало уровни фосфорилированного STAT1 Y701 и общего STAT1 в клетках HEK293, экспрессирующих PILRA G78. Не наблюдали снижения исходных клеток HEK293 или антитела изотипического контроля.

В целом, как показали результаты, базовые изменения в состояниях фосфорилирования EGFR, STAT3 и STAT1 при обработке антителами к PILRA iMicroglia дикого типа и с потерей функции PILRA позволили предположить, что эти пути находятся ниже PILRA, что является важным открытием, связанным с биологией PILRA, которое ранее не было сделано.

Пример 4. Оценка PILRA-зависимой миграции микроглии

Понимание PILRA-зависимых функций в микроглии человека, полученной из iPSC, *in vitro* может помочь прогнозировать функцию *in vivo*. Повышенная подвижность микроглии может быть полезна при нейродегенеративных заболеваниях.

Человеческая iMicroglia дикого типа, iMicroglia с потерей функции PILRA и iMicroglia с потерей функции PILRA, экспрессирующая hPILRA, (PILRA LoF OE) на 53 день культивирования *in vitro*, высевали по 20000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты с резиновой пробкой, которая создает центральную свободную от клеток зону детекции. Антитела к PILRA (100 нМ), изотипический контроль (100 нМ) или PBS (образцы человеческой iMicroglia дикого типа и iMicroglia с потерей функции PILRA) добавляли в свежую среду и удаляли резиновую пробку на 2 день. NucBlue добавляли на 6 день и клетки визуализировали с помощью конфокальной микроскопии. Изображения были проанализированы в программном обеспечении Harmony для расчета средней площади мечения ядер в зоне детекции.

Повторная экспрессия hPILRA в iMicroglia с потерей функции PILRA восстановила миграционный фенотип до уровней дикого типа, демонстрируя, что миграция является PILRA-зависимой и специфичной конечной точкой (Фиг. 5A). Антитела к PILRA, которые воспроизводят фенотип функций iMicroglia с потерей функции PILRA, классифицируются как функциональные антагонисты. Как показано на Фиг. 5B и Фиг. 5C, антитела к PILRA усиливали миграцию iMicroglial дикого типа в бесклеточную зону детекции через 120 часов после удаления пробки, аналогично клеткам iMicroglia с потерей функции PILRA. Отсутствие миграционного фенотипа для антитела изотипического контроля продемонстрировало специфичность. В iMicroglia с потерей функции PILRA и iMicroglia дикого типа вводили только носитель (PBS).

Кроме того, было показано, что антитела к PILRA усиливают миграцию клеток к хемоаттрактантному компоненту 5a (C5a). Клетки iMicroglia дикого типа и iMicroglia с потерей функции PILRA на 62 день культивирования *in vitro* (Фиг. 5D) или на 110 день культивирования *in vitro* (Фиг. 5E) собирали и впоследствии метили красителем кальцеин-AM для анализа Transwell. Клетки на Фиг. 5E предварительно обрабатывали антителом к PILRA или изотипическим контролем (100 нМ) в течение 4 дней перед сбором.

Человеческий комплемент 5a (10 нг/мл) добавляли в качестве хемоаттрактанта в нижнюю камеру в момент времени 0. Данные представлены в виде среднего значения +/- СОС, n=3 технических повтора. На Фиг. 5D и 5E показано, что потеря функции PILRA усиливает миграцию iMicroglial к хемоаттрактантному комплементу 5a (C5a) (Фиг. 5D) и антитела к PILRA усиливали хемотаксис iMicroglia к C5a, аналогично клеткам iMicroglia с потерей функции PILRA (Фиг. 5E).

Антитела к PILRA также усиливали секрецию подвижных белков микроглией. Человеческую iMicroglia, полученную из иПСК дикого типа (гетерозиготные по PILRA R78/G78), высевали в среду, содержащую сыворотку, на 42 день культивирования *in vitro*. Через 24 часа среду меняли для удаления сыворотки, а клетки обрабатывали клоном 5 антитела к PILRA (100 нМ) или изотипическим контролем в течение 4 дней. Растворимые анализы в супернатантах, которые обрабатывали клоном 5 антитела к PILRA или изотипическим контролем, анализировали с помощью набора Proteome Profiler; набора Human Soluble Receptor Array Kit - Non-Hematopoietic Panel (R&D ARY012). Данные представлены в виде среднего значения +/- станд. откл. экспрессии относительно изотипа, n=2 технических повтора. На Фиг. 5F и 5G показано, что антитела к PILRA усиливают секрецию интегринов (Фиг. 5F) и кадгеринов (Фиг. 5G) iMicroglia в супернатанте через 4 дня обработки.

Этот пример демонстрирует, что антитела к PILRA действовали как функциональные антагонисты PILRA и воспроизводили фенотип функции iMicroglia с потерей функции PILRA, усиливая миграцию клеток. Антитела также увеличили клеточную секрецию кадгеринов и интегринов, подвижных белков, ассоциированных с усиленной миграцией клеток.

Пример 5. Влияние PILRA на противовоспалительный фенотип iMicroglia

Понимание PILRA-зависимых функций в iMicroglia человека *in vitro* может помочь спрогнозировать функцию *in vivo*. Модуляция состояния воспаления может быть полезной при нейродегенеративных заболеваниях. Для оценки PILRA-зависимых транскрипционных изменений iMicroglia дикого типа и iMicroglia с потерей функции PILRA высевали в среду, содержащую сыворотку. Среду меняли через 24 часа для удаления сыворотки. LPS (10 нг/мл) или носитель добавляли через 72 часа для стимуляции цитокинового ответа. Клетки собирали через 24 часа после обработки LPS и РНК выделяли из 5 независимых сборов (59, 63, 70, 73, 77 дни культивирования *in vitro*), полученных из одной и той же партии дифференцированной iMicroglia дикого типа или iMicroglia с потерей функции PILRA. Два технических повтора объединяли для каждого условия каждого сбора.

Для оценки PILRA-зависимой секреции цитокинов IL1RA iMicroglia дикого типа и iMicroglia с потерей функции PILRA высевали в среду, содержащую сыворотку, на 70 день культивирования *in vitro*. Среду меняли через 24 часа для удаления сыворотки и обработки клеток антителами (100 нМ). Супернатанты собирали через 72 часа после смены среды и анализировали с помощью MSD на IL1RA человека.

Что касается изменения транскрипции IL1RN и секреции цитокинов IL1RA, потеря функции PILRA способствовала экспрессии гена IL1RN (Фиг. 6А) и секреции цитокинов IL1RA (Фиг. 6В) в iMicroglia с потерей функции PILRA по сравнению с iMicroglia дикого типа в бессывороточной среде. Кроме того, антитела к PILRA (100 нМ, 72 часа) стимулировали секрецию цитокина IL1RA в iMicroglia дикого типа в бессывороточной среде, имитируя фенотип, наблюдаемый в iMicroglia с потерей функции PILRA (Фиг. 6С). Антитела к PILRA не увеличивали секрецию IL1RA в iMicroglia с потерей функции PILRA.

Для оценки LPS-индуцированной PILRA-зависимой секреции провоспалительных цитокинов iMicroglia дикого типа и iMicroglia с потерей функции PILRA высевали в среду, содержащую сыворотку, на 53 день культивирования *in vitro*. Через 24 часа среду меняли для удаления сыворотки, а клетки дикого типа обрабатывали антителом (100 нМ). LPS (10 нг/мл) добавляли через 72 часа для стимуляции цитокинового ответа. Супернатанты собирали через 24 часа после обработки LPS и анализировали на наличие человеческих провоспалительных молекул с помощью MSD (4-плексного анализа), а также на наличие человеческого IP-10 с помощью MSD.

Что касается индуцированных LPS изменений транскрипции, то потеря функции PILRA подавляла индуцированную LPS экспрессию генов TNF, IL-6 и CXCL10 в iMicroglia с потерей функции PILRA по сравнению с iMicroglia дикого типа (Фиг. 6D-6F). Что касается LPS-индуцированных изменений секреции цитокинов, потеря функции PILRA подавляла индуцированную LPS секрецию TNF-альфа, IL-6 и IP-10 в iMicroglia с потерей функции PILRA по сравнению с iMicroglia дикого типа (Фиг. 6G-6I).

Более того, антитела к PILRA были способны ослаблять индуцированную LPS секрецию цитокинов IP-10, TNF-альфа и IL-6 в iMicroglia дикого типа, имитируя фенотип, наблюдаемый в iMicroglia с потерей PILRA (Фиг. 6J-6O).

Кроме того, гомозиготные iMicroglia, экспрессирующие PILRA G78 или R78, также использовали для проверки противовоспалительных эффектов антител. Линии с KI, опосредованным CRISPR, были созданы для определения воздействия антител на гомозиготные генетические варианты G78R PILRA (защитный от БА; R78) и R78G PILRA (нормальный риск БА; G78). Микроглию высевали в среду, содержащую сыворотку, на 54

день культивирования *in vitro*. Через 24 часа среду меняли для удаления сыворотки, а клетки *iMicroglia* обрабатывали антителами (100 нМ). LPS (10 нг/мл) добавляли через 72 часа для стимуляции цитокинового ответа. Супернатанты собирали через 24 часа после обработки LPS и анализировали с помощью MSD на наличие человеческого IP-10. Данные представлены в виде среднего значения +/- СОС. На Фиг. 6P и 6Q показано, что антитела к PILRA (100 нМ) ослабляют индуцированную LPS секрецию цитокина IP-10 в гомозиготных полученных из иПСК клетках *iMicroglia*, экспрессирующих G78 (Фиг. 6P) и R78 (Фиг. 6Q) PILRA, в бессывороточной среде. Антитела к PILRA стимулировали противовоспалительный фенотип в полученной из иПСК микроглии с комбинацией аллелей PILRA (R78/R78, R78/G78 или G78/G78), что демонстрировало антагонистическую функцию в типе клеток, релевантном для ЦНС, с эндогенными уровнями рецептора hPILRA на поверхности клеток.

Этот пример демонстрирует, что антитела к PILRA стимулировали секрецию цитокина IL1RA в *iMicroglia* дикого типа, имитируя фенотип, наблюдаемый в *iMicroglia* с потерей функции PILRA. Кроме того, антитела к PILRA ослабляли секрецию цитокинов, индуцированную LPS, в *iMicroglia* дикого типа и *iMicroglia*, полученной из иПСК, с эндогенным уровнем hPILRA. В целом антитела к PILRA стимулировали противовоспалительный фенотип.

Пример 6. Влияние PILRA на митохондриальное дыхание

Метаболическая дисфункция микроглии является патологическим признаком нейродегенеративного заболевания. Для оценки PILRA-зависимого воздействия на митохондриальное дыхание в базальных условиях *iMicroglia* дикого типа, *iMicroglia* с потерей функции PILRA и *iMicroglia* с потерей функции PILRA, экспрессирующую hPILRA (51 день культивирования *in vitro*), высевали с плотностью 20 тыс./лунку в предварительно покрытый 96-луночный планшет, подходящий для анализов Seahorse XF. Среду, содержащую сыворотку, (C+++), заменяли средой с ограниченным содержанием субстрата (SLM) для подготовки клеток к жировому метаболизму через 72 часа после посева в течение ночи. В день анализа использовали набор для окисления длинноцепочечных жирных кислот Seahorse в соответствии с инструкциями производителя с последовательными инъекциями олигомицина (1,5 мкМ), FCCP (2 мкМ) и ротенона/антимидина (0,5 мкМ) для определения митохондриальной функциональности и потенциала. Как показано на Фиг. 7A и 7B, *iMicroglia* с потерей функции PILRA продемонстрировала повышенное максимальное дыхание и резервный митохондриальный потенциал. Повторная экспрессия PILRA в *iMicroglia* с потерей функции PILRA, экспрессирующей hPILRA (PILRA LoF + OE), восстанавливала митохондриальное

дыхание до уровней, соответствующих дикому типу.

Для оценки зависимоого воздействия мкАт к PILRA на митохондриальное дыхание клетки iMicroglia дикого типа и с потерей функции PILRA (67 день культивирования *in vitro*) высевали с плотностью 20 тыс./лунку в предварительно покрытые 96-луночные планшеты, подходящие для анализов Seahorse XF. Содержащую сыворотку среду (C+++), заменяли средой с ограниченным содержанием субстрата (SLM) для подготовки клеток к жировому метаболизму через 24 часа после посева. Антитела к PILRA добавляли в концентрации 100 нМ во время ограничения концентрации субстрата в течение 72 часов. В день анализа использовали набор для окисления длинноцепочечных жирных кислот Seahorse в соответствии с инструкциями производителя с последовательными инъекциями этомоксира (4 мкМ), олигомицина (1,5 мкМ), FCCP (2 мкМ) и ротенона/антимидина (0,5 мкМ) для определения митохондриальной функциональности и потенциала. Антитела к PILRA (100 нМ) увеличивали максимальное дыхание (Фиг. 7С и Фиг. 7Е) и резервный дыхательный потенциал митохондрий (Фиг. 7D и Фиг. 7F) в iMicroglia дикого типа по сравнению с изотипическим контролем. Дополнительного влияния антител на iMicroglia с потерей функции PILRA не наблюдали, что указывает на специфичность антител. Лечение антителами и эффекты генотипа были смягчены ингибированием карнитинпальмитоилтрансферазы 1 (CPT1), что позволяет предположить, что окисление жирных кислот является важным фактором улучшения функции митохондрий.

Для оценки влияния потерю функции PILRA на индуцированное фибриллами Abeta1-42 снижение скорости немитохондриального потребления кислорода, iMicroglia дикого типа и iMicroglia с потерей функции PILRA (67 день культивирования *in vitro*) высевали с плотностью 20 тыс./лунку в предварительно покрытый 96-луночный планшет, подходящий для анализов Seahorse XF. Содержащую сыворотку среду (C+++), заменяли не содержащей глутамин средой для анализа DMEM XF, содержащей фибриллы Abeta1-42 (100 нМ). Перед обработкой клеток в течение ночи была проведена 10-минутная обработка фибрилл ультразвуком. В один день анализа использовали набор Seahorse Mito Stress в соответствии с инструкциями производителя с последовательными инъекциями олигомицина (1,5 мкМ), FCCP (1 мкМ) и ротенона/антимидина (0,5 мкМ) для определения митохондриальной функциональности и потенциала. Для оценки влияния мкАт к PILRA iMicroglia дикого типа и iMicroglia с потерей функции PILRA (80 день культивирования *in vitro*) высевали с плотностью 20 тыс./лунку. Антитела к PILRA использовали через 24 часа после посева в концентрации 100 нМ и добавляли во время замены на среду DMEM XF, не содержащую глутамин. Как показано на Фиг. 7G и 7H: индуцированное фибриллами Abeta1-42 снижение скорости немитохондриального потребления кислорода

в iMicroglia дикого типа (серая полоса на Фиг. 7G) может быть восстановлено с помощью антитела к PILRA (полосатый серый столбец на Фиг. 7H).

Для оценки PILRA-зависимого воздействия на скорость продукции митохондриальной АТФ iMicroglia дикого типа, iMicroglia с потерей функции PILRA и iMicroglia с потерей функции PILRA, экспрессирующую hPILRA (61 день культивирования *in vitro*), помещали с плотностью 20 тыс./лунку в предварительно покрытый 96-луночный планшет, подходящий для анализов Seahorse XF. Клетки инкубировали в содержащей сыворотку среде в течение 72 часов, а затем проводили анализ набора Seahorse АТФ в соответствии с инструкциями производителя в среде для анализа DMEM XF. Для определения скорости продукции АТФ (Фиг. 7I) применяли последовательные инъекции олигомицина (1,5 мкМ) и ротенона/антимицина (0,5 мкМ). Для оценки эффекта моноклонального антитела к PILRA iMicroglia дикого типа (40 день культивирования *in vitro*) высевали с плотностью 20 тыс./лунку. Антитела к PILRA использовали через 24 часа после посева в концентрации 100 нМ и добавляли во время замены на среду DMEM XF. iMicroglia с потерей функции PILRA продемонстрировала более высокую митохондриальную активность OXPHOS с увеличением продукции АТФ (Фиг. 7I). Антитела к PILRA воспроизводили эффект потери функции PILRA в человеческой iMicroglia дикого типа с повышенной скоростью образования АТФ (Фиг. 7J).

В целом антитела к PILRA повышали митохондриальную активность в iMicroglia дикого типа, включая максимальный дыхательный потенциал, резервный дыхательный потенциал и скорость продукции АТФ. Антитела к PILRA также усиливали окисление жирных кислот в iMicroglia дикого типа, имитируя фенотип, наблюдаемый в iMicroglia с потерей функции PILRA, что предполагает потенциально большую способность метаболизировать накапливающиеся липидные субстраты в контексте заболевания. Кроме того, немитохондриальное дыхание также усиливалось под действием потери функции PILRA и антител к PILRA. Немитохондриальное дыхание осуществляется главным образом за счет выработки супероксида NOX2, который, если его не контролировать, может иметь пагубные последствия, такие как окисление липидов и белков.

Пример 7. Влияние PILRA на периферические иммунные клетки

Человеческий PILRA экспрессируется на нейтрофилах и моноцитах. Связывание антител к PILRA с этими периферическими иммунными клетками позволяет провести периферическую оценку терапевтической эквивалентности. Для оценки связывания мкАт к PILRA человеческие лейкоциты выделяли из гепаринизированной цельной крови путем

гипотонического лизиса эритроцитов и ресуспендировали в холодном PBS, содержащем 0,5% BSA и 2 mM ЭДТА. Fc-рецепторы были заблокированы с помощью Human TruStain FcX. Затем клетки метили флуоресцентными антителами к CD3, CD14, CD19, CD45, CD66b и PILRA. Интенсивность флуоресценции определяли количественно с помощью проточной цитометрии. Антитело к PILRA было способно связываться *ex vivo* с моноцитами (Фиг. 8A) и нейтрофилами (Фиг. 8B). Связывание с В-клетками и Т-клетками не наблюдали (Фиг. 8C и 8D).

Чтобы оценить, активируют ли моноклональные антитела к PILRA нейтрофилы и моноциты, человеческие лейкоциты выделяли из гепаринизированной цельной крови путем гипотонического лизиса эритроцитов и ресуспендировали в полной среде для культивирования клеток RPMI 1640. Клетки обрабатывали антителами в концентрации 100 nM или LPS в концентрации 10 нг/мл как в водной, так и в твердой фазе в течение 24 часов. Затем их промывали и метили флуоресцентными антителами к CD11b, CD14, CD25, CD66b и HLA-DR. Интенсивность флуоресценции определяли количественно с помощью проточной цитометрии. Антитела к PILRA не активировали нейтрофилы и моноциты человека *ex vivo*. Клетки, обработанные антителом к PILRA, не показали повышенного уровня CD25 (Фиг. 8E) или HLA-DR (Фиг. 8F и 8G). Экспрессию CD25 и HLA-DR сравнивали с положительными (т. е. обработанными LPS и обработанными антителами к CD3) и отрицательными (т. е. обработанными изотипическим контролем и обработанными PBS) контролями.

Чтобы оценить, активируют ли моноклональные антитела к PILRA человеческие лейкоциты *ex vivo*, человеческие лейкоциты выделяли из гепаринизированной цельной крови путем гипотонического лизиса эритроцитов и ресуспендировали в полной среде для культивирования клеток RPMI 1640. Клетки обрабатывали антителами в концентрации 100 nM или LPS в концентрации 10 нг/мл как в водной, так и в твердой фазе в течение 24 часов. Супернатанты собирали после центрифугирования при 1000 g в течение 20 минут и хранили при 80 °C. Растворимые белки определяли количественно с использованием набора MSD Human Proflaming Panel I. Как показано на Фиг. 8H и 8I, человеческие лейкоциты *ex vivo* не увеличивали продукцию провоспалительных цитокинов после обработки антителами PILRA в водной фазе (Фиг. 8H) или твердой фазе (Фиг. 8I) в концентрации 100 nM в течение 24 часов.

В целом, антитела к PILRA не оказали существенного влияния на активацию миелоидных клеток *ex vivo*, что обусловлено отсутствием ключевых маркеров клеточной поверхности и секретируемых провоспалительных цитокинов.

Пример 8. Эпитопные группы для антител к PILRA

Эпитопы на PILRA, распознаваемые антителами к PILRA, описанными в данном документе, и четырьмя эталонными антителами к PILRA, были идентифицированы методом SPR с использованием прибора Biacore 8K. Антитела к PILRA улавливали на сенсорных чипах Biacore™ Series S CM5, иммобилизованных с помощью мышиного антитела к Fab человека (набор для захвата Fab человека от GE Healthcare), с последующими инъекциями различных вариантов с мутациями, превращающими PILRA в PILRB, (hPILRA M1 – hPILRA M11 (SEQ ID NO:109–119)) в концентрации 1 мкМ. На Фиг. 9А представлена молекулярная структура, показывающая эпитопы hPILRA для антител к PILRA. Эпитопы на PILRA были идентифицированы по отсутствию связывания антител с определенной мутацией, превращающей PILRA в PILRB, (Фиг. 9В). Как показано на Фиг. 9В, было идентифицировано, что эталонные антитела № 1-№ 4 связывают эпитопную группу № 3 (аминокислоты 116-118 hPILRA). Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи каждого из эталонных антител № 1-№ 4 представлены в SEQ ID NO:128–135. В каждой последовательности легкой цепи и тяжелой цепи последовательности CDR1–3 выделены жирным шрифтом, а последовательности V_L и V_H подчеркнуты. Из описанных в данном документе антител к PILRA только клон 10 связывается с эпитопной группой № 3, в то время как все остальные антитела связываются с эпитопами, отличными от эпитопов для эталонных антител № 1-№ 4.

Нам удалось идентифицировать различные эпитопы на PILRA, распознаваемые нашими антителами к PILRA, и результаты также продемонстрировали разнообразие эпитопов, покрываемых нашими антителами.

Пример 9. Оценка эталонных антител к PILRA

Аффинность связывания четырех эталонных антител к PILRA с hPILRA, hPILRB и супоPILRA измеряли методом SPR с использованием прибора Biacore 8K (описанного в Примере 2). Значения EC₅₀ для связывания четырех эталонных антител также измеряли в клетках HEK293, экспрессирующих hPILRA G78.

Таблица 6

| Эталонные мкАТ | hPILRA, K _D | hPILRB, K _D | супоPILRA, K _D | Эпитоп (группа) | HEK с PILRA G78, EC ₅₀ |
|------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| Эталонное антитело № 1 | 18 нМ | Отсутствие связывания | Отсутствие связывания | 116–118 (Группа № 3) | 639 пМ |
| Эталонное антитело № 2 | 5,6 нМ | Отсутствие связывания | Отсутствие связывания | 116–118 (Группа № 3) | 1,33 нМ |

| Эталонные мкАт | hPILRA, K _D | hPILRB, K _D | суноPILRA, K _D | Эпитоп (группа) | НЕК с PILRA G78, EC50 |
|------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------|-----------------------|
| Эталонное антитело № 3 | 3,8 нМ | Очень слабое связывание | Очень слабое связывание | 116–118 (Группа № 3) | 1,56 нМ |
| Эталонное антитело № 4 | 86 нМ | Отсутствие связывания | Отсутствие связывания | 116–118 (Группа № 3) | 2,06 нМ |

Как показано в таблице 6 ниже и на Фиг. 11, эталонные антитела №1-№4 не связывались с суноPILRA и, следовательно, не имели перекрестной реактивности между hPILRA и суноPILRA.

Пример 10. Гуманизированные антитела к PILRA и их характеристика

Иллюстративные антитела к PILRA гуманизировали. Характеристика аффинности связывания гуманизированных антител с ВКД hPILRA измеряли методом SPR с использованием прибора Biacore 8K (таблица 7). Каждое из антител, перечисленных в таблице 7, содержит два полипептида Fc дикого типа (например, SEQ ID NO:94), образующие домен Fc в антителе.

Таблица 7

| Клон антитела к PILRA | Аффинность связывания с hPILRA согласно SPR |
|-----------------------|---|
| 12 | 1,58 нМ |
| 13 | 655 пМ |
| 14 | 1,63 нМ |
| 15 | 917 пМ |
| 16 | 11,0 нМ |
| 17 | 1,29 нМ |
| 18 | 7,53 нМ |
| 19 | 2,00 нМ |
| 20 | 1,73 нМ |
| 21 | 667 пМ |
| 22 | 515 пМ |
| 23 | 495 пМ |
| 24 | 1,45 нМ |
| 25 | 794 пМ |
| 26 | 511 пМ |
| 27 | 536 пМ |
| 28 | 1,25 нМ |
| 29 | 1,28 нМ |
| 30 | 878 пМ |
| 31 | 915 пМ |
| 32 | 2,80 нМ |
| 33 | 2,04 нМ |
| 34 | 1,80 нМ |

| | |
|------------------------------|--|
| Клон антитела к PILRA | Аффинность связывания с hPILRA согласно SPR |
| 35 | 1,71 нМ |

Кроме того, были получены клоны гуманизированных антител 36–39. Аффинность связывания этих клонов с hPILRA G78, hPILRA R78, hPILRB и PILRA яванского макака измеряли методом SPR (таблица 8).

Таблица 8

| Клон антитела к PILRA | Аффинность связывания согласно SPR (нМ) | | | |
|------------------------------|--|-------------------|---------------|-------------------------------|
| | hPILRA G78 | hPILRA R78 | hPILRB | PILRA яванского макака |
| 36 | 0,4-0,5 | 7,1–11 | 42–97 | 0,2–0,3 |
| 37 | 1,6-2 | 33–34 | 100–150 | 5,1–6,1 |
| 38 | 0,3-0,7 | 11 | 35-53 | 0,2–0,3 |
| 39 | 0,2-0,4 | 6,2–6,3 | 38–56 | 0,4 |

Кроме того, значения EC50 для связывания гуманизированных антител с модифицированными полипептидами Fc измеряли в клетках HEK293, экспрессирующих hPILRA G78 или hPILRA R78 (таблица 9). Кроме того, также измеряли значения EC50 для индукции фосфо-pSTAT3 Y705.

Таблица 9

| Клон антитела к PILRA | EC50 (нМ) в клетках HEK293 | | EC50 (нМ) для индукции фосфо-STAT3 (Y705) в клетках HEK293 | |
|------------------------------|-----------------------------------|-------------------|---|-------------------|
| | hPILRA G78 | hPILRA R78 | hPILRA G78 | hPILRA R78 |
| 36 | 4-13 | 1–4 | 12–13 | 3–4 |
| 37 | 8-17 | 3 | 12–13 | 3–5 |
| 38 | 13-14 | 2–4 | 7–8 | 2–3 |
| 39 | 7–8 | 1–2 | 6–9 | 3–4 |

В таблице 10 ниже также показана аффинность связывания отобранных гуманизированных антител к PILRA с hPILRA G78, hPILRA R78, hPILRB и супоPILRA, значения EC50 для связывания, измеренные на клетках HEK293, экспрессирующих hPILRA G78, и эпитопы на hPILRA, связываемые этими антителами.

Таблица 10

| Клон антитела к PILRA | Аффинность связывания по SPR | | | | Связывание клеток, EC50 (НЕК293 с hPILRA G78) | Эпитоп PILRA человека |
|-----------------------|------------------------------|------------------------|----------------|------------------------|---|-----------------------|
| | Человеческий PILRA G78 | Человеческий PILRA R78 | PILRB человека | PILRA яванского макака | | |
| 12 | 1,2 нМ | 17 нМ | 263 нМ | 1,8 нМ | 12,0 нМ | G78, K106, E143 |
| 15 | 650 пМ | 10 нМ | 95 нМ | 720 пМ | 11,2 нМ | G78, K106, E143 |
| 23 | 2,8 нМ | 47 нМ | 117 нМ | 7,3 нМ | 21,4 нМ | G78, K106, E143 |
| 35 | 1,4 нМ | 25 нМ | 150 нМ | 5,3 нМ | 12,8 нМ | G78, K106, E143 |

Мы успешно создали гуманизированные антитела к PILRA, которые сохраняли высокую аффинность связывания с hPILRA (как варианты G78, так и R78) и супоPILRA, а также гораздо более слабое связывание с hPILRB.

Пример 11. Связывание с клетками гуманизированных антител к PILRA

Клетки НЕК293, сверхэкспрессирующие PILRA G78 или R78, окрашивали красителем для оценки жизнеспособности клеток NucBlue Live в течение 30 минут при комнатной температуре. Исходные клетки НЕК293 и НЕК с hPILRA G78 смешивали, промывали и инкубировали с различными концентрациями антител к PILRA или антител изотипического контроля в течение 30 минут при 290 об/мин при 4 °С с использованием разбавителя для FACS (PBS 2% FBS 1 mM ЭДТА). Клетки дважды промывали разбавителем для FACS, инкубировали с конъюгированными с Alexa Fluor 647 антителом к IgG человека при 290 об/мин при 4 °С в течение 30 минут. Связывание антител с клетками определяли с помощью BD FACS Canto II, а медианную интенсивность флуоресценции (MFI) определяли после анализа результатов с помощью программного обеспечения FLOJO и PRISM. Линии клеток анализировали в двух повторностях для учета внутренней изменчивости, всего N=3. Тот же протокол использовали для клеток CHO-K1, экспрессирующих hPILRA G78. На Фиг. 1D и 1E показано, что антитела к PILRA связываются с клетками НЕК293, экспрессирующими PILRA G78, но не с исходными клетками. Антитела имеют следующие значения EC50 на клетках НЕК293,

экспрессирующих PILRA G78: клон 6: 9,3 нМ; клон 7: 12,95 нМ; клон 12: 12,04 нМ; клон 15: 11,2 нМ; клон 23: 21,4 нМ; и клон 35: 12,8 нМ. На Фиг. 1F дополнительно показано, что гуманизированные антитела также связывались с клетками HEK293, экспрессирующими PILRA R78. Антитела имеют следующие значения EC50 на клетках HEK293, экспрессирующих PILRA R78: клон 2 5,1 нМ; клон 6 2 нМ; клон 7: 2,5 нМ; клон 12 2,7 нМ; клон 15 2,7 нМ; клон 23 3,7 нМ; и клон 35 3,1 нМ. На Фиг. 1H и 1I также показано, что антитела к PILRA связываются с клетками CHO-K1, экспрессирующими PILRA G78, но не с исходными клетками. Антитела имеют следующие значения EC50 на клетках CHO-K1, экспрессирующих PILRA G78: клон 6: 7,6 нМ; клон 7: 10 нМ; клон 12: 10,8 нМ; клон 15: 9 нМ; клон 23: 18,2 нМ; и клон 35.

Антитела также тестировали на связывание с iMicroglia. Линии с CRISPR-опосредованным нокином были созданы для определения связывания антител с клетками с гомозиготными генетическими вариантами G78R PILRA (защитный от БА; R78) или R78G PILRA (нормальный риск БА; G78). Человеческую iMicroglia, гетерозиготную по PILRA G78 или PILRA R78, обрабатывали 100 нМ биотинилированных антител к PILRA или антител изотипического контроля в течение 45 минут на льду. Клетки промывали PBS с последующей 30-минутной инкубацией со стрептавидином, конъюгированным с Alexa Fluor 488, в течение 30 минут на льду. Клетки визуализировали с помощью конфокальной микроскопии после нескольких промывок PBS. Программное обеспечение Harmony использовали для расчета средней площади флуоресцентного пятна на клетку. Данные представлены в виде кратности экспрессии относительно фонового сигнала в контрольных лунках, обработанных только стрептавидином, конъюгированным с Alexa Fluor 488, (среднее значение +/- станд. откл.). Как показано на Фиг. 1L и 1M, антитела к PILRA, связанные с полученной из iPSC человеческой iMicroglia, гомозиготной по PILRA G78 (Фиг. 1L) или R78 PILRA (Фиг. 1M). Клон 2, который связывает эпитоп G78, не продемонстрировал специфического связывания с iMicroglia, экспрессирующей PILRA R78. Защитный от БА вариант R78 PILRA имеет пониженную способность связывания лигандов и меньшую аффинность к клону 2. Частота этого защитного от БА варианта варьируется по всему миру. Это минорный аллель в популяциях Африки (10%) и Европы (38%), но главный аллель (65%) в популяциях Восточной Азии. Антитела к PILRA, которые связываются с этим эпитопом, могут быть связаны с потерей аффинности у значительной части людей, поэтому мы стремились разработать антитела, которые связываются с обоими вариантами.

Связывание антител к PILRA с iMicroglia, гомозиготной по защитному R78 PILRA, или с человеческим R78 PILRA, экспрессированным на HEK293, продемонстрировало

взаимодействие с мишенью на поверхности клетки. Связывание антител к PILRA с полученной из иПСК микроглией с любой комбинацией аллелей PILRA (R78/R78, R78/G78 или G78/G78) продемонстрировало связывание с типом клеток, релевантным для ЦНС, с эндогенными уровнями рецептора hPILRA на поверхности клеток. Этот результат предсказывает высокую аффинность связывания антител с PILRA у людей независимо от аллеля.

Антитела также продемонстрировали связывание с PILRA яванского макака, но не с hPILRB, что является желательным. Клетки CHO-K1 и CHO, экспрессирующие PILRA яванского макака, окрашивали красителем для оценки жизнеспособности клеток NucBlue Live в течение 30 минут при комнатной температуре. Клетки смешивали, промывали и инкубировали с различными концентрациями антител к PILRA или антител изотипического контроля в течение 30 минут при 290 об/мин при 4 °C с использованием разбавителя для FACS (PBS 2% FBS 1 mM ЭДТА). Клетки дважды промывали разбавителем для FACS, инкубировали с конъюгированными с Alexa Fluor 647 антителом к IgG человека при 290 об/мин при 4 °C в течение 30 минут. Связывание антител с клетками определяли с помощью BD FACS Canto II, а медианную интенсивность флуоресценции (MFI) определяли после анализа результатов с помощью программного обеспечения FLOJO и PRISM. Линии клеток анализировали в двух повторностях для учета внутренней изменчивости, всего N=3 (B) или N=1 (C). На Фиг. 2B и 2C показано, что антитела к PILRA связывались с клетками CHO, экспрессирующими PILRA яванского макака, (Фиг. 2B), и не связывались с клетками CHO, экспрессирующими hPILRB (Фиг. 2C).

Кроме того, было показано, что антитела не связывают hPILRB. Клетки человека PILRB-DAP12 OE HEK293 окрашивали красителем для оценки жизнеспособности клеток NucBlue Live в течение 30 минут при комнатной температуре. Клетки смешивали, промывали и инкубировали с различными концентрациями антител к PILRA, антител изотипического контроля или PILRB-связывающего антитела положительного контроля (HC SEQ ID NO: 156; и LC SEQ ID NO: 157; EC50 для клеток hPILRB-DAP12 OE HEK293 составляет 1,2 нМ) в течение 30 минут при 290 об/мин при 4 °C с использованием разбавителя для FACS (PBS 2% FBS 1 mM ЭДТА). Клетки дважды промывали разбавителем для FACS, инкубировали с конъюгированными с Alexa Fluor 647 антителом к IgG человека при 290 об/мин при 4 °C в течение 30 минут. Связывание антител с клетками определяли с помощью BD FACS Canto II, а медианную интенсивность флуоресценции (MFI) определяли после анализа результатов с помощью программного обеспечения FLOJO и PRISM. Линии клеток анализировали в двух повторностях для учета

внутренней изменчивости, всего N=3. На Фиг. 2D показано, что антитела к PILRA не связывались с клетками HEK293, экспрессирующими hPILRB-DAP12.

Этот пример дополнительно продемонстрировал, что гуманизированные антитела к PILRA сохраняют желаемый профиль селективного связывания с сильным связыванием для hPILRA и супоPILRA и очень слабым связыванием для hPILRB с различными типами клеток, например, клетками HEK293, экспрессирующими PILRA G78 или R78, клетками CHO-K1, экспрессирующими hPILRA G78, или супоPILRA, и iMicroglia, полученной из человеческих iPSC, которая экспрессирует PILRA G78 или R78.

Пример 12. Сравнение с эталонными антителами

Мы попытались сравнить наши антитела с эталонными антителами к PILRA, чтобы определить профили связывания против hPILRA, hPILRB и супоPILRA. Для этого клетки CHO-K1, CHO-hPILRA, CHO-hPILRB или CHO-супоPILRA инкубировали с антителами к PILRA или антителами изотипического контроля в одной концентрации 100 нМ в течение 30 минут на льду. Клетки дважды промывали разбавителем для FACS, затем инкубировали с конъюгированными с Alexa Fluor 647 антителом к IgG человека в течение 30 минут на льду и один раз промывали разбавителем для FACS. Связывание антител с клетками определяли с помощью FACS, а среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) определяли на основе анализа данных, выполненного с помощью программного обеспечения FLOJO. Данные представлены в виде кратного сигнала относительно фона (изотипический контроль). Среднее значение +/- станд. откл., n=2 технических повтора.

На Фиг. 2E и 2F показано, что эталонные антитела связывали клетки CHO, экспрессирующие hPILRA, но, что особенно важно, не связывались с клетками CHO, экспрессирующими супоPILRA. Наши антитела, напротив, связывались как с hPILRA, так и с супоPILRA и не связывались с hPILRB.

Пример 13. Обработка сиалидазой клеток HEK с PILRA G78 или R78

Клетки HEK293, экспрессирующие 78G PILRA или 78R PILRA, обрабатывали SialEXO (Genovis). SialEXO используется для удаления сиаловых кислот из нативных гликопротеинов и действует как на O-, так и на N-связанные гликаны. Это комбинация двух сиалидаз, действующих на связи α 2-3, α 2-6 и α 2-8. Клетки инкубировали с 400 нМ сиалидазой в течение 1 часа при 37 °C в бессывороточной среде DMEM для удаления сиаловых кислот с нативных гликопротеинов (т. е. лигандов PILRA). Затем клетки дважды промывали, инкубировали и окрашивали красителем NucBlue Live для оценки жизнеспособности клеток в течение 30 минут при комнатной температуре. Как исходные клетки HEK293, так и клетки HEK с 78G (или 78R) PILRA человека смешивали, промывали и инкубировали с различными концентрациями антител к PILRA или антител

изотипического контроля в течение 30 минут. Клетки дважды промывали разбавителем для FACS (PBS с 2% FBS и 1 мМ ЭДТА) и инкубировали с конъюгированным с Alexa Fluor 647 антителом к IgG человека при 290 об/мин при 4 °С в течение 30 минут. Связывание антител с клетками определяли с помощью BD FACS Canto II, а медианную интенсивность флуоресценции (MFI) определяли после анализа результатов с помощью программного обеспечения FLOJO и Prism. Антитела имеют следующие значения EC50 на клетках HEK293 с PILRA G78 без обработки сиалидазой: клон 5: 17 нМ; клон 6: 13 нМ; клон 7: 9,5 нМ; и клон 1: 6,8 нМ. Антитела имеют следующие значения EC50 на клетках HEK293 с PILRA G78, обработанных сиалидазой: клон 5: 9,8 нМ; клон 6: 4,8 нМ; клон 7: 3,2 нМ; и клон 1: 1,8 нМ. На Фиг. 3С-3F показано, что обработка сиалидазой клеток HEK с PILRA G78 усиливала связывание антитела к PILRA.

Следуя тому же протоколу, обработку сиалидазой также проводили на клетках HEK, экспрессирующих PILRA R78. Антитела имеют следующие значения EC50 на клетках HEK293 с PILRA R78 без обработки сиалидазой: клон 5: 1,3 нМ; клон 6: 0,7 нМ; клон 7: 0,7 нМ; и клон 1: 14 нМ. Антитела имеют следующие значения EC50 на клетках HEK293 с PILRA R78, обработанных сиалидазой: клон 5: 0,9 нМ; клон 6: 0,3 нМ; клон 7: 0,3 нМ; и клон 1: 5,6 нМ. На Фиг. 3G-3J показано, что обработка сиалидазой клеток HEK с PILRA R78 имела минимальный эффект на связывание антитела к PILRA.

Удаление сиалилированных лигандов на клеточной поверхности увеличивало связывание антител к PILRA с клетками, сверхэкспрессирующими PILRA G78, что указывает на то, что наши антитела конкурируют за связывание PILRA с эндогенными цис-лигандами. Это дополнительно подтверждается минимальным эффектом обработки сиалидазой на связывание антитела к PILRA с клетками с PILRA R78, которое демонстрировало снижение связывания лиганда.

Пример 14. Антитела к PILRA продемонстрировали взаимодействие с мишенью *in vivo*

Для тестирования антител к PILRA *in vivo* мы создали ВАС-трансгенных мышей (ВАСtg), которые имели геномную последовательность человека, включая ген PILRA. Этим мышам получали путем микроинъекции клон ВАС CTD-2110B7 в эмбрионы линии C57BL/6J (JAX Stock# 000664). Этот клон ВАС содержит всю человеческую кодирующую область PILRA (версия R78) и PILRB, а также ее регуляторные элементы. Мы подтвердили экспрессию человеческого PILRA в этой модели. Этим мышам вводили клон 6 в дозе 50 мг/кг за 1 день и за 4 дня до умерщвления. Мышей позже подвергали анестезии авертином и перфузировали PBS, а головной мозг извлекали и замораживали на сухом льду. Ткань головного мозга гомогенизировали для получения лизатов головного мозга и

определяли общую концентрацию белка с помощью ВСА. Покрытые стрептавидином планшеты Mesoscale Discovery дополнительно покрывали биотинилированным захватывающим PILRA антителом (R&D Systems AF6484) на 1 час при комнатной температуре и 800 об/мин, затем промывали 3 раза TBST. Образцы лизата головного мозга разделяли на две аликвоты по 50 мкл. В первую аликвоту добавляли клон 6 (конечная концентрация 10 мкг/мл) для насыщения всего присутствующего PILRA, тогда как вторая аликвота получала только аналитический буфер для количественного определения количества PILRA, которое связалось при введении *in vivo*. Эти аликвоты затем наносили на планшет и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при 800 об/мин с последующей 3-кратной промывкой TBST. Наконец, в качестве детектирующего реагента добавляли меченное Sulfo-Tag антитело человека в концентрации 0,25 мкг/мл и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при 800 об/мин с последующей 3-кратной промывкой TBST. Флуоресценцию измеряли с помощью планшет-ридера Meso SECTOR S, и концентрации PILRA нормализовали по уровню общего белка.

Фиг. 12А и 12В показано, что антитело к PILRA достигло взаимодействия с мишенью в головном мозге и плазме через 1 день и 4 дня после введения дозы 50 мг/кг мышам ВАСtg, экспрессирующим PILRA человека. Антитело к PILRA повышало общие уровни рецепторов полноразмерного (головной мозг) и растворимого (плазма) рецептора PILRA человека по сравнению с животными, которым вводили изотипическое антитело.

Концентрации антител в различных органах также исследовали с помощью ELISA с антителом к IgG человека (захватывающее антитело: ослиный (Fab')₂ к huIgG с минимальной перекрестной реактивностью (JIR # 709-006-098); детектирующее антитело: козий (Fab')₂ к huIgG с минимальной перекрестной реактивностью (JIR #109-036-098)). На Фиг. 12С-12Н показано, что антитело к PILRA продемонстрировало IgG-подобную фармакокинетику в головном мозге, плазме, печени, легких, селезенке и костном мозге через 1 день и 4 дня после внутривенного введения 50 мг/кг мышам PILRA, экспрессирующим ВАСtg человека.

Фармакокинетические профили антитела к PILRA или контрольного (ненацеленного) антитела в мышинной модели PILRA/PILRB ВАСtg привели к сопоставимым профилям экспозиции лекарственного средства в плазме и других тестируемых тканях. Эти данные свидетельствуют о том, что мкАт к PILRA действовали как иллюстративные антитела, не взаимодействуя с мишенью в этой животной модели.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

| SEQ ID NO | Последовательность | Описание |
|-----------|---|--|
| 94 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Последовательность Fc человека дикого типа |
| 95 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK | Последовательность домена CH2 |
| 96 | GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | последовательность домена CH3 |
| 97 | EPKSCDKTHTCPPCP | частичная шарнирная область IgG1 человека |
| 98 | DKTHTCPPCP | частичная шарнирная область IgG1 человека |
| 99 | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Последовательность Fc с LALA |
| 100 | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Последовательность Fc с LALA PG |
| 101 | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Последовательность Fc с LALA PS |
| 102 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK | Последовательность Fc с LS |
| 103 | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK | Последовательность Fc с LALA LS |

| SEQ ID NO | Последовательность | Описание |
|-----------|---|--|
| 104 | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVLHEA LHSHYTQKSLSLSPGK | Последовательность Fc с LALA PG LS |
| 105 | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVLHEA LHSHYTQKSLSLSPGK | Последовательность Fc с LALA PS LS |
| 106 | QPSGSTGSGPSYLYGVTQPKHLSASMGGSV EIPFSFYYPWE LATAPDVRISWRRGHFHGQSFYSTRPPSIHKDYVNRLFLNW TEGQKSGFLRISNLQKQDQSVYFCRVELDTRSSGRQQWQSI EGTKLSITQAVTTTTQRPSSMTTWRLSSTTTTGLRVTQG KRRSDSWHISLETGGGSGGGSHHHHHHHH | Часть белка hPILRA-линкер-His- метка |
| 107 | QPGGSAGSGSPYGV TQRKHL SAPMGGSV EIPFSFYHPWE LAAAPNMKISWRRGNFHGEFFYRTRPAFIHEDYSNRLLLN WTEGQDRGLLRIWNLKEDQSVYFCRVELDTRSSGRQRW QSI EGTKL TITQAVTTTTQRPSSMTTTRPSSATTTAGLRVT QGKRHSDSWHL SLK TGGGSGGGSHHHHHHHH | Часть белка супоPILRA-линкер- His-метка |
| 108 | QPGGSTGSGPSYLYGVTQPKHLSASMGGSV EIPFSFYYPWE LAIVPNVRISWRRGHFHGQSFYSTRPPSIHKDYVNRLFLNW TEGQESGFLRISNLKEDQSVYFCRVELDTRSSGRQQWQSI KGTKL TITQAVTTTTWRPSSTTIAGLRVTESKGHSESWH LSLDTGGGSGGGSHHHHHHHH | Часть белка hPILRB-линкер-His- метка |
| 109 | QPSGSTGSGPSYLYGVTQPKHLSASMGGSV EIPFSFYYPWE LATAPDVRISWRRGHFHGQSFYSTRPPSIHKDYVNRLFLNW TEGQKSGFLRISNLQKQDQSVYFCRVELDTRSSGRQQWQSI EGTKLSITQAVTTTTWRLSSTTTTGLRVTQ GKRRSDSWH ISLETGGGSGGGSHHHHHHHH | PILRA-Стебель- Укороченный-His (hPILRA M1) |
| 110 | QPSGSTGSGPSYLYGVTQPKHLSASMGGSV EIPFSFYYPWE LAIVPNVRISWRRGHFHGQSFYSTRPPSIHKDYVNRLFLNW TEGQKSGFLRISNLQKQDQSVYFCRVELDTRSSGRQQWQSI EGTKLSITQAVTTTTQRPSSMTTWRLSSTTTTGLRVTQG KRRSDSWHISLETGGGSGGGSHHHHHHHH | PILRA- TAPD63IVPN (hPILRA M2) |
| 111 | QPSGSTGSGPSYLYGVTQPKHLSASMGGSV EIPFSFYYPWE LATAPDVRISWRRGHFHRQSFYSTRPPSIHKDYVNRLFLNW TEGQKSGFLRISNLQKQDQSVYFCRVELDTRSSGRQQWQSI EGTKLSITQAVTTTTQRPSSMTTWRLSSTTTTGLRVTQG KRRSDSWHISLETGGGSGGGSHHHHHHHH | PILRA-G78R-His (hPILRA M3) |
| 112 | QPSGSTGSGPSYLYGVTQPKHLSASMGGSV EIPFSFYYPWE LATAPDVRISWRRGHFHGQSFYSTRPPSIHKDYVNRLFLNW TEGQESGFLRISNLQKQDQSVYFCRVELDTRSSGRQQWQSI EGTKLSITQAVTTTTQRPSSMTTWRLSSTTTTGLRVTQG KRRSDSWHISLETGGGSGGGSHHHHHHHH | PILRA-K106E-His (hPILRA M4) |
| 113 | QPSGSTGSGPSYLYGVTQPKHLSASMGGSV EIPFSFYYPWE LATAPDVRISWRRGHFHGQSFYSTRPPSIHKDYVNRLFLNW TEGQKSGFLRISNLKEDQSVYFCRVELDTRSSGRQQWQSI EGTKLSITQAVTTTTQRPSSMTTWRLSSTTTTGLRVTQG KRRSDSWHISLETGGGSGGGSHHHHHHHH | PILRA- QKQ116RKE-His (hPILRA M5) |

| SEQ ID NO | Последовательность | Описание |
|-----------|--|--|
| 114 | QPSGSTGSGPSYLYGVTQPKHLSASMGGGSVEIPFSFYYPWE LATAPDVRISWRRGHFHGQSFYSTRPPSIHKDYVNRLFLNW TEGQKSGFLRISNLQKQDQSVYFCRVELDTRSSGRQQWQSI EGTKLSITQAVTTTTQRPSSMTTWTWRLSSTTTTTGLRVTQG KRRSDSWHISLETGGGSGGGSHHHHHHHH | PILRA-S133R-His (hPILRA M6) |
| 115 | QPSGSTGSGPSYLYGVTQPKHLSASMGGGSVEIPFSFYYPWE LATAPDVRISWRRGHFHGQSFYSTRPPSIHKDYVNRLFLNW TEGQKSGFLRISNLQKQDQSVYFCRVELDTRSSGRQQWQSI EGTKLSITQAVTTTTQRPSSMTTWTWRLSSTTTTTGLRVTQG KRRSDSWHISLETGGGSGGGSHHHHHHHH | PILRA-W139L-His (hPILRA M7) |
| 116 | QPSGSTGSGPSYLYGVTQPKHLSASMGGGSVEIPFSFYYPWE LATAPDVRISWRRGHFHGQSFYSTRPPSIHKDYVNRLFLNW TEGQKSGFLRISNLQKQDQSVYFCRVELDTRSSGRQQWQSI KGTKLSITQAVTTTTQRPSSMTTWTWRLSSTTTTTGLRVTQG KRRSDSWHISLETGGGSGGGSHHHHHHHH | PILRA-E143K-His (hPILRA M8) |
| 117 | QPSGSTGSGPSYLYGVTQPKHLSASMGGGSVEIPFSFYYPWE LATAPDVRISWRRGHFHGQSFYSTRPPSIHKDYVNRLFLNW TEGQKSGFLRISNLQKQDQSVYFCRVELDTRSSGRQQWQSI EGTKLSITQAVTTTTQRPSSMTTWTWRLSSTTTTTGLRVTQG KRRSDSWHISLETGGGSGGGSHHHHHHHH | PILRA-L169P-His (hPILRA M9) |
| 118 | QPSGSTGSGPSYLYGVTQPKHLSASMGGGSVEIPFSFYYPWE LATAPDVRISWRRGHFHGQSFYSTRPPSIHKDYVNRLFLNW TEGQKSGFLRISNLQKQDQSVYFCRVELDTRSSGRQQWQSI EGTKLSITQAVTTTTQRPSSMTTWTWRLSSTTTIAGLRVTQG KRRSDSWHISLETGGGSGGGSHHHHHHHH | PILRA-TT175IA-His (hPILRA M10) |
| 119 | QPSGSTGSGPSYLYGVTQPKHLSASMGGGSVEIPFSFYYPWE LATAPDVRISWRRGHFHGQSFYSTRPPSIHKDYVNRLFLNW TEGQKSGFLRISNLQKQDQSVYFCRVELDTRSSGRQQWQSI EGTKLSITQAVTTTTQRPSSMTTWTWRLSSTTTTTGLRVTESK GHSESWHLSLDTGGGSGGGSHHHHHHHH | PILRA-CT-замена- His (hPILRA M11) |
| 120 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP | Константный домен тяжелой цепи 1 (CH1) |
| 121 | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | Константный домен легкой цепи (CL) |
| 122 | EVQLVESGGGLVQGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQ APGKGLEWVSGFSWNSGSIQYPSVSKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRRAEDTAFYYCAKDKSISAAAGRFDYWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKLSLSLSPGK | Последовательность тяжелой цепи Ат.2 |
| 123 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASRRINNYLNWYQQKPG KAPKLLIYDASNLETGVPSRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDIA TYCYCQQYDNLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC | Последовательность легкой цепи Ат.2 |

| SEQ ID NO | Последовательность | Описание |
|-----------|---|---|
| 124 | EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAIHWVRQA PGKGLEWVSGMSWNSGSGYGDSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAFYYCAKDKSIGAAGRFDSWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK | Последовательность тяжелой цепи Ат.4 |
| 125 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQGINNYLNWYQQKPG KAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDIA TYYCQQYDNLPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC | Последовательность легкой цепи Ат.4 |
| 126 | QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYTFIGFYIHWVRQA PGQGLEWMGWINPESGDTTYAQKFQGRVTMTTDSINTA YMDLNRLRSDDSAVYFCARGNWNFPDTDFWQGMVIV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK | Последовательность тяжелой цепи Ат.5 |
| 127 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQSISYLNWHQQIPGK APKLLIYVASSLQSGIPSRFSGRSGTEFTLTISLQPEDFAT YYCQQSYSAFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC | Последовательность легкой цепи Ат.5 |
| 128 | <u>QVTLQESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTFGMGVGVWIRQ</u> <u>PSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNPALKSRLTISKDTSKNQV</u> <u>FLKIASVDTADIATYYCARVEDYGNPFDYWGQGTTLTVSS</u> ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK | Последовательность тяжелой цепи эталонного антитела № 1 |
| 129 | <u>DIOMNQSPSSLSASLGDTITITCHASONIHVWLNWYQOKP</u> <u>GNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTVTISLQPEDI</u> <u>ATYYCQQGQSYPLTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDE</u> QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC | Последовательность легкой цепи эталонного антитела № 1 |

| SEQ ID NO | Последовательность | Описание |
|-----------|--|---|
| 130 | <u>QVILKESGPGILQSSQTL</u> <u>SLTCSFSGFSLSTFGMGVGVWIRQP</u> <u>SGKGGLESLAHIWWDDDKFYNPALKSRLTISKDTSKSOVFL</u> <u>KIANVDTADIATYYCTRIEDYGSYFAYWGQGTTLTVSSAS</u> TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK | Последовательность тяжелой цепи эталонного антитела № 2 |
| 131 | <u>DVQMNQSPSSLSASLGDPTITICHASQNIHVWLNWYQORP</u> <u>GNIPRLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLOPEDI</u> <u>ATYYCOQGOSYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ</u> LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC | Последовательность легкой цепи эталонного антитела № 2 |
| 132 | <u>QVTLKESGPGMLQPSQTL</u> <u>SLACSFSGFSLNSFGVAVGWIRQ</u> <u>PSGKGLEWLAHIWWDDDKSYNPALKSRLTISKDTSKNQV</u> <u>FLKLANVDTADTATYYCTRIADYGNHFDYWGQGTALTVS</u> SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK | Последовательность тяжелой цепи эталонного антитела № 3 |
| 133 | <u>DIQMNQSPSSLSASLGDPTITICHASQNSHVWLSWYQOKP</u> <u>GNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISGLQPEDI</u> <u>ATYYCOQGOTYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ</u> LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC | Последовательность легкой цепи эталонного антитела № 3 |
| 134 | <u>QVTLKESGPGILQPSQTL</u> <u>SLTCSFSGFSLTTFGMGVGVWIRQ</u> <u>PSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNPALKSRLTISKDISKNQV</u> <u>FLKIANVDTADTATYYCARIEDYGNPFYWGQGTTLTVSS</u> ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK | Последовательность тяжелой цепи эталонного антитела № 4 |
| 135 | <u>DIQMNQSPSSLSASLGDPTITICHASQNIHVWLSWYQOKPG</u> <u>NIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLOPEDIA</u> <u>TYCYCOQGOSYPLTFGAGTKLELRTVAAPSVFIFPPSDEQL</u> KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC | Последовательность легкой цепи эталонного антитела № 4 |

| SEQ ID NO | Последовательность | Описание |
|-----------|---|---|
| 136 | MGRPLLLPLLLPLLLPPAFLQPSGSTGSGPSYLYGVTQPKHLS ASMGGSVEIPFSFYYPWELATAPDVRISWRRGHFHRQSFYS TRPPSIHKDYVNRLFLNWTEGQKSGFLRISNLQKQDQSVYF CRVELDTRSSGRQQWQSIEGTKLSITQAVTTTTQRPSSMTT TWRLSSTTTTTGLRVTQGKRRSDSWHISLETAVGVAVAVT VLGIMILGLICLLRWRRRKGQQRKATTPAREPFQNTTEEPY ENIRNEGQNTDPKLNPKDDGIVYASLALSSSTSPRAPPSHRP LKSPQNETLYSVLKA | Человеческий белок PILRA (R78) |
| 150 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEYYMYWVRQ APGQGLELIGRIDPEDGGTDYIEKFKNRVTITADTSTSTAYL ELSSLRSEDTAVYYCATTIRGTVFAFWGQGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK | Последовательность тяжелой цепи Ат.12 |
| 151 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASEDIFNGLAWYQQKPG KSPKLLIYNAKTLHTGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDF ATYFCQQYYDYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC | Последовательность легкой цепи Ат.12 и Ат.15 |
| 152 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEYYMYWVRQ APGQGLELIGRIDPEDGGTDYIEKFKNRSTLTADTSTSTAYL ELSSLRSEDTAVYFCATTIRGTVFAFWGQGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK | Последовательность тяжелой цепи Ат.15 |
| 153 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEYYMYWVRQ APGQGLELIGRIDPEDGGTDYVEKFKNRATLTADTSTSTAY LESSLRSEDTAVYFCASTIRGTVFVYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK | Последовательность тяжелой цепи Ат.23 и Ат.35 |

| SEQ ID NO | Последовательность | Описание |
|-----------|--|---|
| 154 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRPSEDIYNGLAWYQQKPGKAPKLLIYNANSLHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | Последовательность легкой цепи Ат.23 |
| 155 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRPSEDIYNGLAWYQQKPGKSPKLLIYNANSLHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQYYDYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | Последовательность легкой цепи Ат.35 |
| 156 | QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSIS NH WWSWVRQPPGKGLEWIG EIYHYGTTDYNPSLQSR VTISVDKSKNQFSLKLTSVTAADTAVYFCAR GLRDY YYYMDVWGKGTTVTVSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Последовательность тяжелой цепи связывающего PILRB антитела положительного контроля (CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты) |
| 157 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQTI SSYLNWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSG VPSRFSGSGFGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QOQSYIPLT FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | Последовательность легкой цепи связывающего PILRB антитела положительного контроля (CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты) |

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с парным иммуноглобулин-подобным рецептором альфа 2 типа яванского макака (суноPILRA), причем аффинность связывания для суноPILRA по меньшей мере в 2 раза выше, чем аффинность связывания для парного иммуноглобулин-подобного рецептора бета 2 типа человека (hPILRB).

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также связываются с парным иммуноглобулин-подобным рецептором альфа 2 типа человека (hPILRA).

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с парным иммуноглобулин-подобным рецептором альфа 2 типа человека (hPILRA) и PILRA яванского макака (суноPILRA), причем аффинность связывания для суноPILRA находится в пределах 100-кратной относительно аффинности связывания с hPILRA.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2 или 3, отличающиеся тем, что аффинность связывания с hPILRA по меньшей мере в 10 раз выше, чем аффинность связывания с hPILRB.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–4, отличающиеся тем, что аффинность связывания с суноPILRA по меньшей мере в 10 раз выше, чем аффинность связывания с hPILRB.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с парным иммуноглобулин-подобным рецептором альфа 2 типа человека (hPILRA), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с одной или более аминокислотами в одном или более из следующих положений: 63, 64, 78, 106, 143, 116–118 и 182–186, причем положения определены со ссылкой на последовательность SEQ ID NO:1.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, отличающиеся тем, что связываются с одной или более аминокислотами в одном или более из следующих положений: 78, 106 и 143.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6 или 7, отличающиеся тем, что связываются с G78, K106 и E143 SEQ ID NO: 1.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6 или 7, отличающиеся тем, что связываются с R78, K106 и E143 SEQ ID NO: 136.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6,

отличающиеся тем, что связываются с одной или более аминокислотами в одном или более из следующих положений: 63 и 64.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6 или 10, отличающиеся тем, что связываются с T63 и A64 SEQ ID NO:1.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, отличающиеся тем, что связываются с одной или более аминокислотами в одном или более из следующих положений: 106, 116–118 и 182–186.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6 или 12, отличающиеся тем, что связываются с K106 SEQ ID NO:1.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6 или 12, отличающиеся тем, что связываются с Q116, K117 и/или Q118 SEQ ID NO: 1.

15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6 или 12, отличающиеся тем, что связываются с Q182, G183, K184, R185 и/или R186 SEQ ID NO:1.

16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–15, отличающиеся тем, что содержат:

(a) последовательность CDR1 тяжелой цепи (CDR-H1), имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:4–11 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:4–11;

(b) последовательность CDR2 тяжелой цепи (CDR-H2), имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:12–19 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:12–19;

(c) последовательность CDR3 тяжелой цепи (CDR-H3), имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:20–29 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:20–29;

(d) последовательность CDR1 легкой цепи (CDR-L1), имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:30–38 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:30–38;

(e) последовательность CDR2 легкой цепи (CDR-L2), имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 39–46 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной

последовательности SEQ ID NO:39–46; и

(f) последовательность CDR3 легкой цепи (CDR-L3), имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:47–53 или имеющую до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:47–53.

17. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 16, отличающиеся тем, что аминокислотные замены представляют собой консервативные замены.

18. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 16 или 17, отличающиеся тем, что содержат:

(i) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:4 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:4; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:12 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:12; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:20 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:20; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:30 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:30; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:39 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:39; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:47 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:47; или

(ii) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:5 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:5; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:13 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:13; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:22 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:22; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:31 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:31; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:39 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:39; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:47 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:47; или

(iii) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:6 или одну или более

(vi) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:8 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:8; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:16 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:16; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:26 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:26; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:35 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:35; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:43 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:43; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:50 или одну или более консервативных замен относительно последовательности SEQ ID NO:50.

19. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–16, отличающиеся тем, что содержат:

(a) последовательность CDR-H1, содержащую последовательность $GX_1TFX_2X_3X_4X_5X_6H$ (SEQ ID NO:74), где X_1 представляет собой F или Y; X_2 представляет собой D или I; X_3 представляет собой D или G; X_4 представляет собой Y или F; X_5 представляет собой A или Y; и X_6 представляет собой M или I;

(b) последовательность CDR-H2, содержащую последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5SGX_6X_7X_8$ (SEQ ID NO:75), где X_1 представляет собой G или W; X_2 представляет собой F, M, или I; X_3 представляет собой S или N; X_4 представляет собой W или P; X_5 представляет собой N или E; X_6 представляет собой S или D; X_7 представляет собой I или T; и X_8 представляет собой G или T;

(c) последовательность CDR-H3, содержащую последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9FDX_{10}$ (SEQ ID NO:76), где X_1 представляет собой D или отсутствует; X_2 представляет собой K или G; X_3 представляет собой S или N; X_4 представляет собой I или W; X_5 представляет собой S, G, или N; X_6 представляет собой A или F; X_7 представляет собой A или P; X_8 представляет собой G или D; X_9 представляет собой R или T; и X_{10} представляет собой Y, S, или F;

(d) последовательность CDR-L1, содержащую последовательность $X_1X_2SX_3X_4IX_5X_6YLN$ (SEQ ID NO:77), где X_1 представляет собой Q или R; X_2 представляет собой A или S; X_3 представляет собой R или Q; X_4 представляет собой R, G, или S; X_5 представляет собой N или S; и X_6 представляет собой N или I;

(e) последовательность CDR-L2, содержащую последовательность $X_1ASX_2LX_3X_4$ (SEQ ID NO:78), где X_1 представляет собой D или V; X_2 представляет собой N или S; X_3

представляет собой E или Q; и X₄ представляет собой T или S; и

(f) последовательность CDR-L3, содержащую последовательность QQQX₁X₂X₃X₄PX₅T (SEQ ID NO:79), где X₁ представляет собой Y или S; X₂ представляет собой D или Y; X₃ представляет собой N или S; X₄ представляет собой L или A; и X₅ представляет собой L или F.

20. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 19, отличающиеся тем, что содержат:

(i) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:4; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:12; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:20; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:30; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:39; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:47; или

(ii) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:5; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:13; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:22; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:31; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:39; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:47; или

(iii) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:6; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:14; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:23; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:32; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:40; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:48.

21. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–16, отличающиеся тем, что содержат:

(i) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:7; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:15; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:24; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:33; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:41; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:49; или

(ii) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:7; CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:15; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:25; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:34; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:42; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:49; или

(iii) CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:8; CDR-H2,

содержащую последовательность SEQ ID NO:16; CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:26; CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:35; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:43; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:50.

22. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–21, содержащие последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H), которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 54–63.

23. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 22, отличающиеся тем, что последовательность V_H содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 54–63.

24. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–21, содержащие последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H), которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 137–144 и 158.

25. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 24, отличающиеся тем, что последовательность V_H содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 137–144 и 158.

26. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–25, содержащие последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L), которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 64–73.

27. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 26, отличающиеся тем, что последовательность V_L содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 64–73.

28. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–25, содержащие последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L), которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 145–149.

29. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 28, отличающиеся тем, что последовательность V_L содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 145–149.

30. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–29, отличающиеся тем, что содержат:

- (i) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:54, и последовательность

V_L , содержащую SEQ ID NO:65; или

(ii) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:56, и последовательность V_L , содержащую SEQ ID NO:66; или

(iii) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:57, и последовательность V_L , содержащую SEQ ID NO:67; или

(iv) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:58, и последовательность V_L , содержащую SEQ ID NO:68; или

(v) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:59, и последовательность V_L , содержащую SEQ ID NO:69; или

(vi) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:60, и последовательность V_L , содержащую SEQ ID NO:70.

31. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–30, отличающиеся тем, что содержат:

(i) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:54, и последовательность V_L , содержащую SEQ ID NO:65; или

(ii) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:56, и последовательность V_L , содержащую SEQ ID NO:66; или

(iii) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:57, и последовательность V_L , содержащую SEQ ID NO:67.

32. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–29, отличающиеся тем, что содержат:

(i) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:137, и последовательность V_L , содержащую SEQ ID NO:145; или

(ii) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:140, и последовательность V_L , содержащую SEQ ID NO:145; или

(iii) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:143, и последовательность V_L , содержащую SEQ ID NO:146; или

(iv) последовательность V_H , содержащую SEQ ID NO:143, и последовательность V_L , содержащую SEQ ID NO:149.

33. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–32, отличающиеся тем, что антитело содержит два полипептида Fc, образующие домен Fc.

34. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 33, отличающиеся тем, что один или оба полипептида Fc содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:94.

35. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–34, отличающиеся тем, что антитело представляет собой IgG1.

36. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–35, отличающиеся тем, что антитело представляет собой полноразмерное антитело.

37. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с парным иммуноглобулин-подобным рецептором альфа 2 типа человека (hPILRA), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент распознают эпитоп, который является тем же самым или по существу таким же, как эпитоп, распознаваемый клоном антитела, выбранным из группы, состоящей из: клонов антител 1–39 в таблице 1.

38. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 37, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент распознают эпитоп, который является тем же или по существу таким же, как эпитоп, распознаваемый клоном антитела, выбранным из группы, состоящей из: клонов антитела 2, 4 и 5.

39. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–38, отличающиеся тем, что антагонизируют активность hPILRA.

40. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–39, отличающиеся тем, что блокируют связывание сиалированного белка с hPILRA.

41. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 40, отличающиеся тем, что сиалированный белок представляет собой сиалированный NPDC1, PANP, gB HSV-1, COLEC12, C4a, C4b, DAG1 или Clec4g.

42. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–41, отличающиеся тем, что усиливают фосфорилирование EGFR или STAT3 или снижают фосфорилирование STAT1.

43. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–42, отличающиеся тем, что усиливают миграцию клеток.

44. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 43, отличающиеся тем, что усиливают миграцию микроглии.

45. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–44, отличающиеся тем, что усиливают экспрессию противовоспалительного гена или белка.

46. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 45, отличающиеся тем, что усиливают экспрессию гена IL1RN.

47. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–46, отличающиеся тем, что снижают экспрессию или секрецию белка провоспалительных цитокинов.

48. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 47, отличающиеся тем, что снижают экспрессию TNF, IL-6 и/или IP-10.
49. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–48, отличающиеся тем, что усиливают клеточное дыхание.
50. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 49, отличающиеся тем, что усиливают митохондриальное дыхание.
51. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–50, отличающиеся тем, что увеличивают выработку АТФ.
52. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–51, отличающиеся тем, что повышают метаболизм жирных кислот.
53. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–52, отличающиеся тем, что не активируют периферические иммунные клетки.
54. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 53, отличающиеся тем, что не активируют нейтрофилы и моноциты.
55. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–54, отличающиеся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело.
56. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–55, отличающиеся тем, что антитело представляет собой химерное антитело.
57. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–56, отличающиеся тем, что антитело представляет собой гуманизированное антитело.
58. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–57, отличающиеся тем, что антитело представляет собой полностью человеческое антитело.
59. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–58, отличающиеся тем, что антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, F(ab')₂, scFv, или двухвалентный scFv.
60. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют с выделенным антителом по любому из пп. 1–59 за связывание с hPILRA.
61. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–59 и фармацевтически приемлемый носитель.
62. Полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–59.

63. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 62.
64. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 62.
65. Способ получения выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина в условиях, в которых экспрессируется выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, кодируемые полинуклеотидом по п. 62.
66. Набор, содержащий:
выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–59 или фармацевтическую композицию по п. 61; и
инструкции по их применению.
67. Способ лечения нейродегенеративного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту выделенного антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1–59 или фармацевтической композиции по п. 61.
68. Способ по п. 67, отличающийся тем, что нейродегенеративное заболевание выбрано из группы, состоящей из: болезни Альцгеймера, первичной возрастной таупатии, прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), лобно-височной деменции, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17, деменции с аргирофильным зерном, бокового амиотрофического склероза, комплекса боковой амиотрофический склероз/паркинсонизм-деменция Гуама (БАС-КПД), кортикобазальной дегенерации, хронической травматической энцефалопатии, болезни Крейтцфельда — Якоба, деменции боксеров, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, синдрома Дауна, семейной деменции британского типа, семейной деменции датского типа, болезни Герстмана — Штраусслера — Шейнкера, глобулярной глиальной таупатии, паркинсонизма гваделупского типа с деменцией, ПНП гваделупского типа, болезни Галлервордена — Шпатца, наследственной диффузной лейкоэнцефалопатии со сфероидами (НДЛС), болезни Хантингтона, миозита с тельцами включения, множественной системной атрофии, миотонической дистрофии, болезни Насу — Хакола, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, болезни Ниманна — Пика типа С, паллидо-пункто-нигральной дегенерации, болезни Паркинсона, болезни Пика, постэнцефалитного паркинсонизма, церебральной амилоидной ангиопатии, вызванной прионным белком, прогрессирующего субкортикального глиоза, подострого склерозирующего панэнцефалита и деменции, характеризующейся только клубками.
69. Способ по п. 68, отличающийся тем, что нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера.
70. Способ определения того, обладает ли молекула активностью в отношении

белка PILRA, включающий:

(а) приведение в контакт клетки, которая экспрессирует белок PILRA, с молекулой;

(b) до, одновременно с или после стадии (а), приведение в контакт клетки того же типа, что и на стадии (а), имеющей более низкую экспрессию PILRA, с молекулой; и

(с) измерение одного из следующих показателей: уровня фосфорилированного STAT3 (pSTAT3), уровня фосфорилированного STAT1 (pSTAT1), уровня фосфорилированного EGFR (pEGFR), экспрессии кадгерина, экспрессии интегрина и миграции микроглии в обеих клетках, при этом изменение уровня одного из этих показателей между клетками указывает на то, что молекула обладает активностью в отношении белка PILRA на стадии (а).

71. Способ по п. 70, отличающийся тем, что клетка, полученная на стадии (а), естественным образом экспрессирует белок PILRA.

72. Способ по п. 70 или 71, отличающийся тем, что в клетке с более низкой экспрессией PILRA белок PILRA нокаутирован.

73. Способ по п. 72, отличающийся тем, что клетка представляет собой микроглию.

74. Способ по п. 73, отличающийся тем, что клетка представляет собой iMicroglia.

75. Способ по п. 74, отличающийся тем, что клетка представляет собой iMicroglia с потерей функции PILRA.

76. Способ по п. 70, отличающийся тем, что клетка, полученная на стадии (а), сконструирована или модифицирована для экспрессии или сверхэкспрессии белка PILRA.

77. Способ по п. 76, отличающийся тем, что клетка, имеющая более низкую экспрессию PILRA, естественным образом экспрессирует белок PILRA или не была сконструирована или модифицирована для экспрессии белка PILRA.

78. Способ по любому из пп. 70–77, отличающийся тем, что молекула получена из библиотеки молекул.

79. Способ по любому из пп. 70–78, отличающийся тем, что известно, что указанная молекула связывает белок PILRA.

80. Способ по любому из пп. 70–78, отличающийся тем, что неизвестно, связывает ли молекула белок PILRA.

81. Способ по любому из пп. 70–80, отличающийся тем, что молекула представляет собой антитело, пептид, малую органическую молекулу или нуклеиновую

кислоту.

82. Способ определения того, модулирует ли молекула, которая связывает белок PILRA, сигнальный ответ или активность в клетке, экспрессирующей PILRA, причем способ включает:

(a) приведение в контакт клетки с молекулой; и

(b) измерение одного из следующих показателей: уровня фосфорилированного STAT3 (pSTAT3), уровня фосфорилированного STAT1 (pSTAT1), уровня фосфорилированного EGFR (pEGFR), экспрессии кадгерина, экспрессии интегрина и миграции микроглии,

при этом изменение уровня одного из показателей указывает на то, что молекула модулирует сигнальный ответ или активность в экспрессирующей PILRA клетке.

83. Способ по п. 82, отличающийся тем, что изменение представляет собой увеличение или снижение уровня одного из показателей, когда молекулу приводят в контакт с клеткой, по сравнению с уровнем в клетке без молекулы.

84. Способ по п. 82 или п. 83, отличающийся тем, что клетка применяется в анализе *in vitro*.

85. Способ по п. 82 или п. 83, отличающийся тем, что клетка находится в организме млекопитающего.

86. Способ по п. 85, отличающийся тем, что стадия (a) включает введение молекулы млекопитающему.

87. Способ по любому из пп. 82–86, отличающийся тем, что клетка представляет собой микроглию, миелоидную клетку, моноцит или нейтрофил.

88. Человеческая сконструированная индуцированная плюрипотентная стволовая клетка (иПСК) или линия клеток иПСК, отличающиеся тем, что иПСК модифицирована для экспрессии двух копий гена, который кодирует вариант R78 или вариант G78 белка PILRA.

89. Человеческая сконструированная иПСК или линия клеток иПСК по п. 88, отличающиеся тем, что иПСК модифицирована в эндогенном геномном локусе.

90. Модель сконструированных микроглиальных клеток, полученная из человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК), причем иПСК модифицированы для экспрессии двух копий гена, который кодирует вариант R78 или вариант G78 белка PILRA.

91. Модель сконструированных микроглиальных клеток по п. 90, отличающаяся тем, что иПСК модифицирована в эндогенном геномном локусе.

92. Подобранный пара линий клеток, отличающаяся тем, что:

(a) первая линия клеток пары гомозиготна по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA; и

(b) вторая линия клеток пары гомозиготна по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA,

при этом как первая, так и вторая линии клеток пары происходят от одной и той же исходной линии клеток, и одна или обе линии клеток были сконструированы с применением эндогенного гена PILRA.

93. Подобранный пара линий клеток по п. 92, отличающаяся тем, что исходная линия клеток является гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA.

94. Подобранный пара линий клеток по п. 92, отличающаяся тем, что исходная линия клеток является гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA.

95. Подобранный пара линий клеток по п. 92, отличающаяся тем, что исходная линия клеток является гетерозиготной по гену, кодирующему вариант R78 и вариант G78 белка PILRA.

96. Подобранный пара линий клеток по любому из пп. 92–95, дополнительно содержащая третью линию клеток, которая является гетерозиготной по гену, кодирующему вариант G78 и вариант R78 белка PILRA.

97. Подобранный пара линий клеток по п. 96, отличающаяся тем, что третья линия клеток происходит из исходной линии клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 или вариант G78 белка PILRA.

98. Способ получения линии миелоидных клеток или линии стволовых клеток, способной дифференцироваться в линию миелоидных клеток, с модифицированным геном PILRA, включающий:

(a) определение того, является ли существующая линия миелоидных клеток или существующая линия стволовых клеток гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA, или гетерозиготной по гену, кодирующему варианты R78 и G78 белка PILRA; и

(b) конструирование линии клеток путем модификации гена, который кодирует белок PILRA, для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, который кодирует вариант R78 белка PILRA или вариант G78 белка PILRA,

при этом линия сконструированных клеток до ее получения не была гомозиготной по гену, который кодирует выбранный вариант.

99. Способ получения подобранной пары линий клеток, включающий:

(a) определение того, является ли существующая линия миелоидных клеток или существующая линия стволовых клеток, которая способна дифференцироваться в линию

миелоидных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белок PILRA, или гетерозиготной по гену, кодирующему варианты R78 и G78 белка PILRA; и

(b) получение (i) первой линии клеток путем модификации гена, который кодирует белок PILRA, для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA, и/или (ii) второй линии клеток путем модификации гена, который кодирует белок PILRA, для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, который кодирует вариант G78 белка PILRA.

100. Способ по п. 99, отличающийся тем, что линия сконструированных клеток до ее получения не была гомозиготной по гену, который кодирует выбранный вариант.

101. Способ по любому из пп. 98–100, отличающийся тем, что существующая линия клеток, полученная на стадии (a), является гомозиготной по варианту R78 белка PILRA, а конструирование на стадии (b) включает модификацию существующей линии клеток для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA.

102. Способ по любому из пп. 98–100, отличающийся тем, что существующая линия клеток, полученная на стадии (a), является гомозиготной по варианту G78 белка PILRA, а конструирование на стадии (b) включает модификацию существующей линии клеток для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA.

103. Способ по любому из пп. 98–100, отличающийся тем, что существующая линия клеток, полученная на стадии (a), является гетерозиготной по гену, который кодирует варианты R78 и G78 белка PILRA, а конструирование на стадии (b) включает модификацию существующей линии клеток для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующей вариант R78 белка PILRA, и линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, который кодирует вариант G78 белка PILRA.

104. Способ по любому из пп. 98–103, отличающийся тем, что линия миелоидных клеток представляет собой линию iPСК.

105. Способ создания совпадающей пары линий клеток из существующей линии миелоидных клеток или существующей линии стволовых клеток, способной дифференцироваться в линию миелоидных клеток, которая является гетерозиготной по гену, кодирующему варианты R78 и G78 белка PILRA, включающий:

(a) конструирование существующей линии клеток для получения первой линии

сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA; и

(b) конструирование либо линии клеток, созданной на стадии (a), либо существующей линии клеток для получения второй линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA.

106. Способ создания совпадающей пары линий клеток из существующей линии миелоидных клеток или существующей линии стволовых клеток, способной дифференцироваться в линию миелоидных клеток, которая является гетерозиготной по гену, кодирующему варианты R78 и G78 белка PILRA, включающий:

(a) конструирование существующей линии клеток для получения первой линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA; и

(b) конструирование либо линии клеток, созданной на стадии (a), либо существующей линии клеток для получения второй линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA.

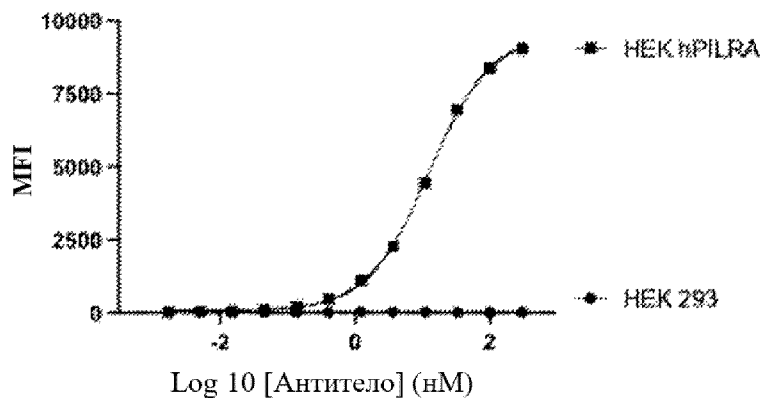
107. Способ создания подобранной пары линий клеток из существующей линии миелоидных клеток или существующей линии стволовых клеток, способной дифференцироваться в линию миелоидных клеток, гомозиготной по гену, который кодирует вариант R78 белка PILRA, причем способ включает: конструирование существующей линии клеток для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант G78 белка PILRA.

108. Способ создания подобранной пары линий клеток из существующей линии миелоидных клеток или существующей линии стволовых клеток, способной дифференцироваться в линию миелоидных клеток, гомозиготной по гену, который кодирует вариант G78 белка PILRA, причем способ включает: конструирование существующей линии клеток для получения линии сконструированных клеток, гомозиготной по гену, кодирующему вариант R78 белка PILRA.

109. Способ по любому из пп. 105–108, отличающийся тем, что линия миелоидных клеток представляет собой линию iPSC.

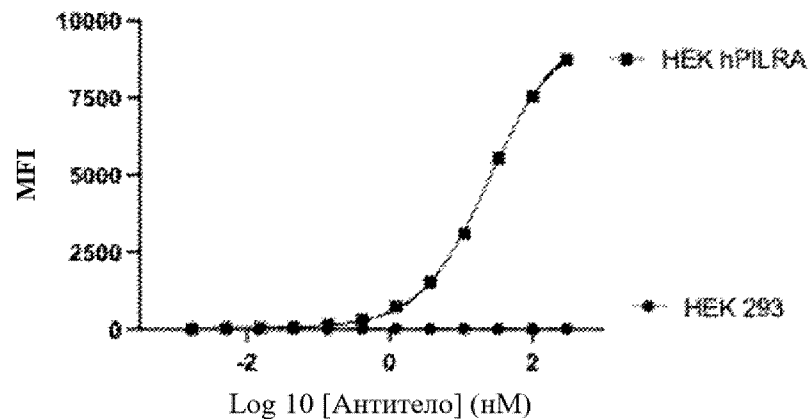
ФИГ. 1А

Клон 2 связывающего клетки антитела



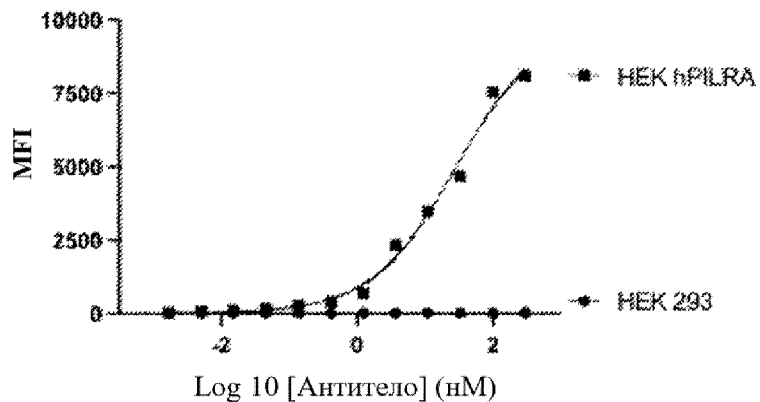
ФИГ. 1В

Клон 4 связывающего клетки антитела

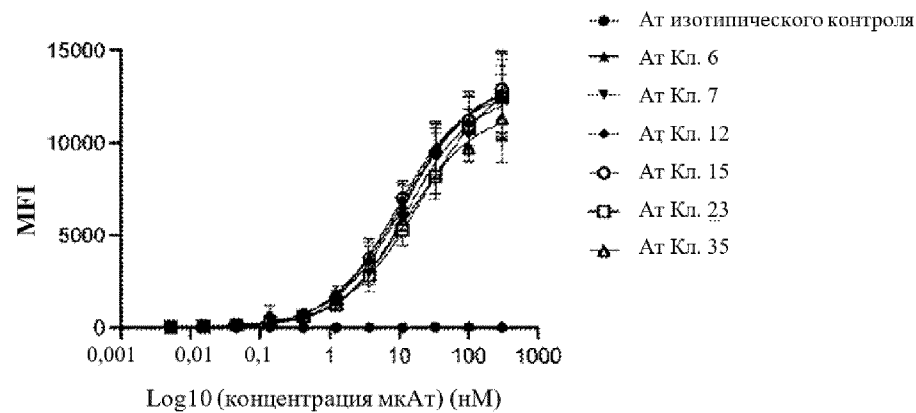


ФИГ. 1С

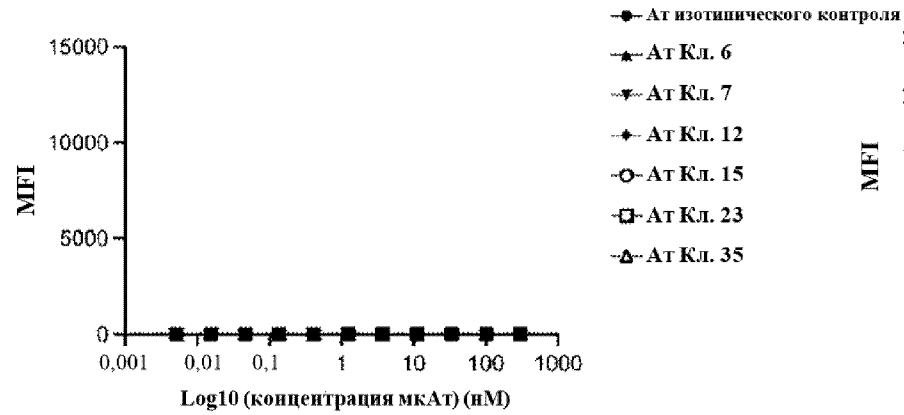
Клон 5 связывающего клетки антитела



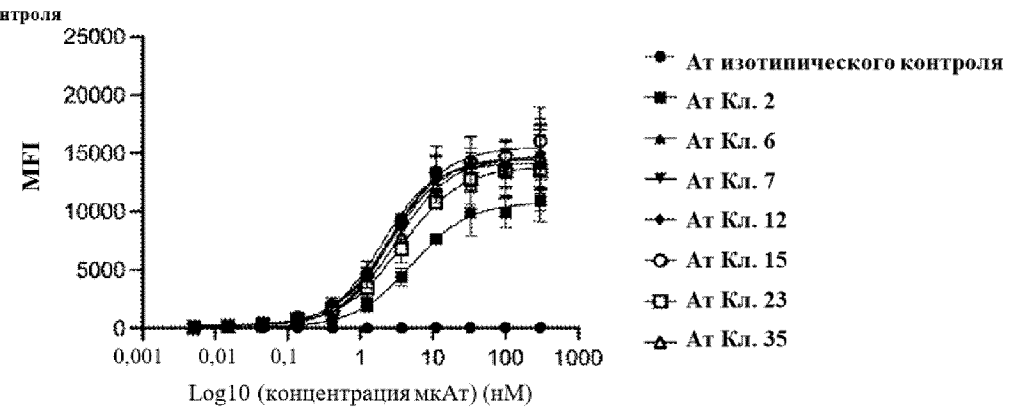
ФИГ. 1D
HEK hPILRA G78



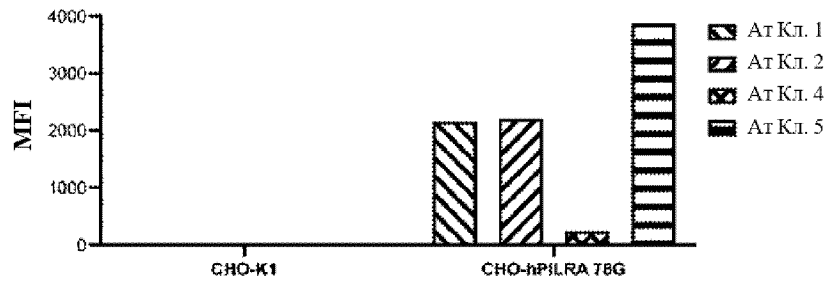
ФИГ. 1Е
HEK 293



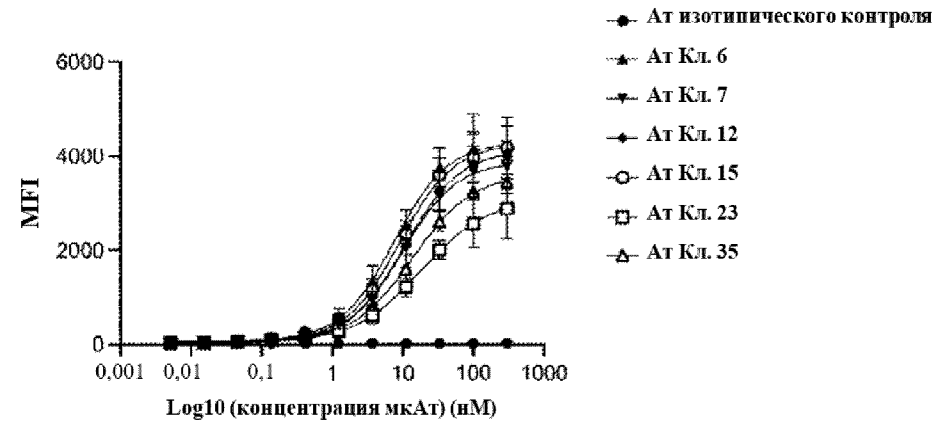
ФИГ. 1F
HEK hPILRA R78



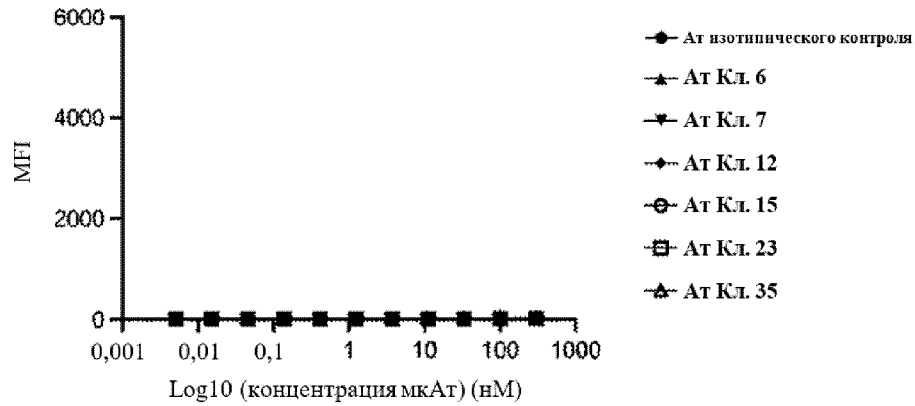
ФИГ. 1G



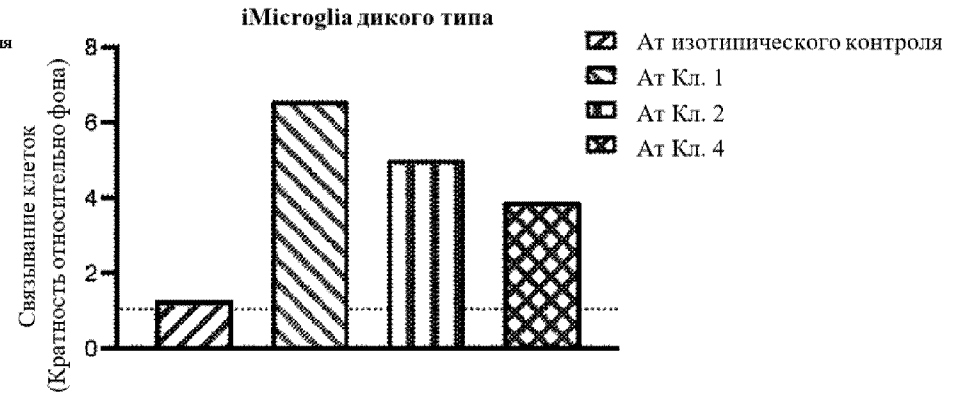
ФИГ. 1H
CHO hPILRA



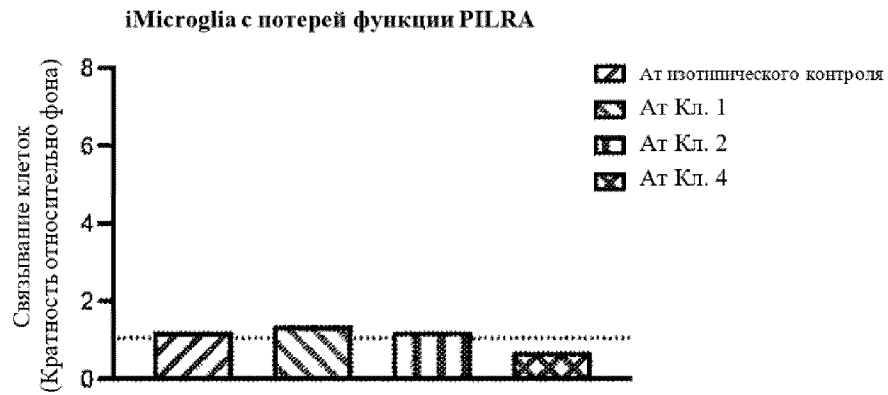
ФИГ. 1I
СНО-К1



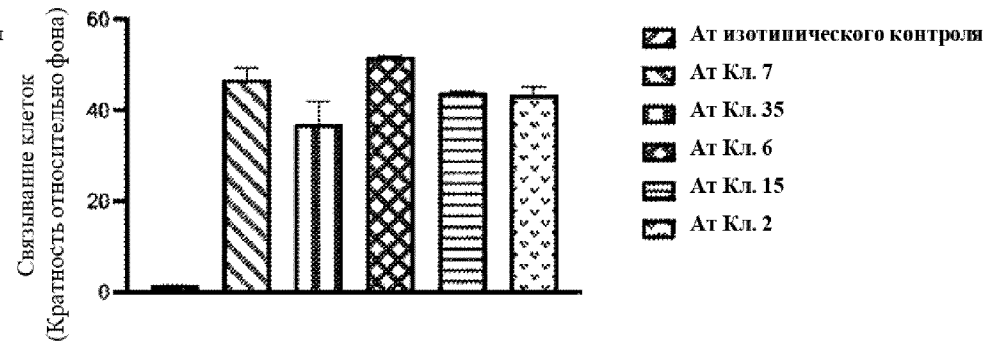
ФИГ. 1J

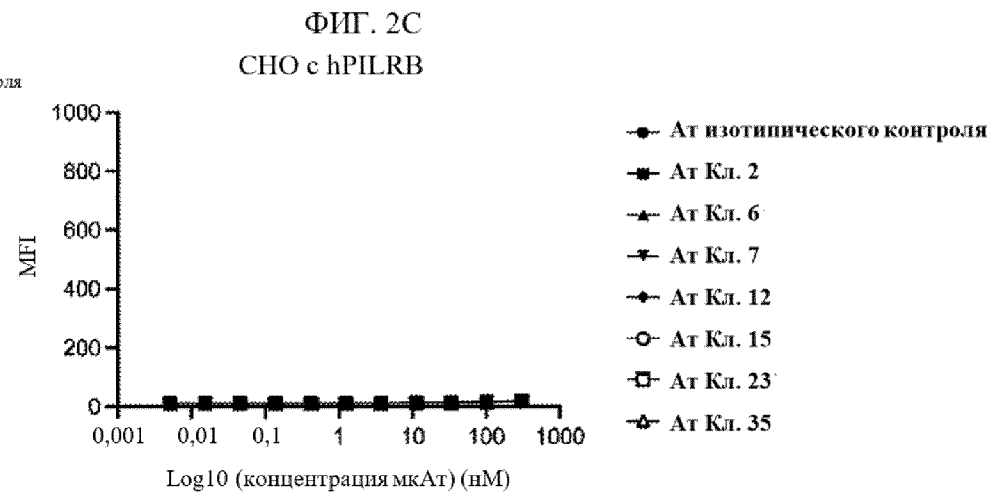
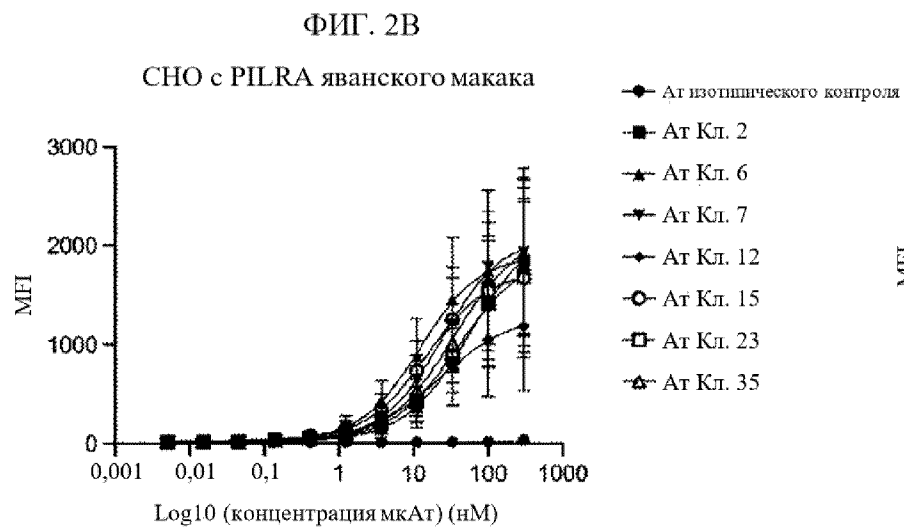
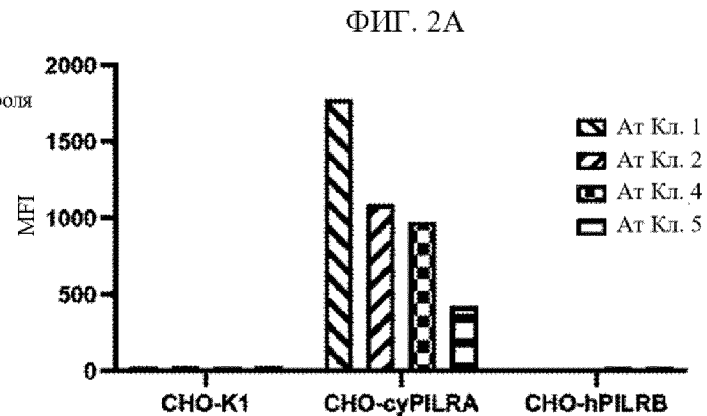
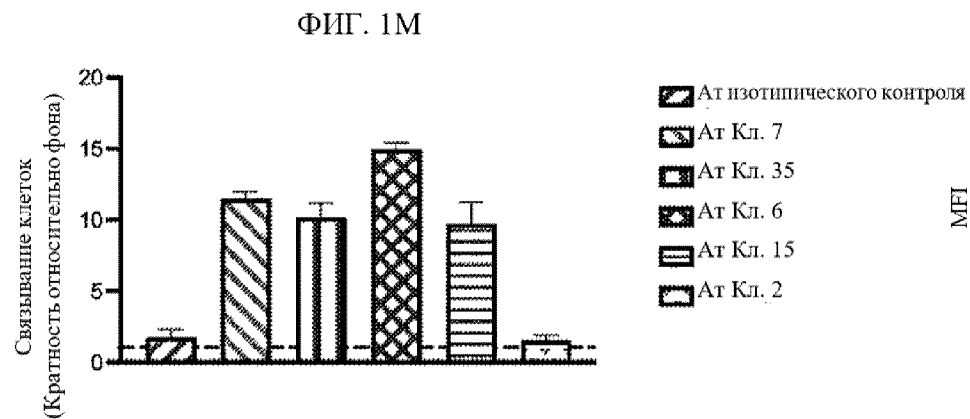


ФИГ. 1K

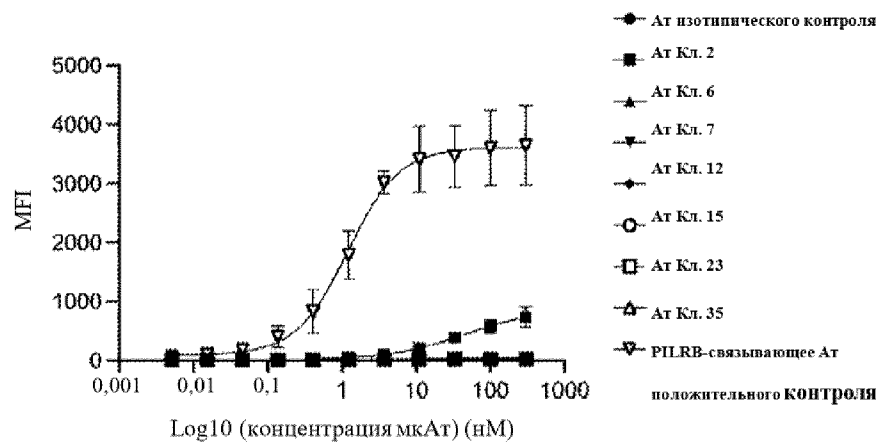


ФИГ. 1L

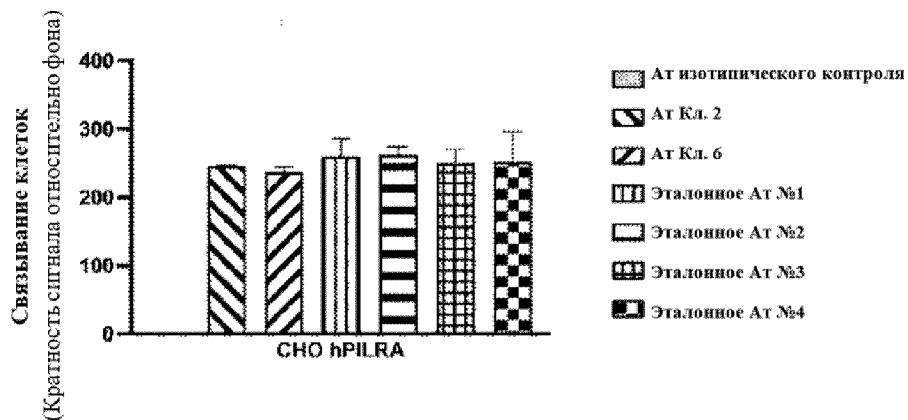




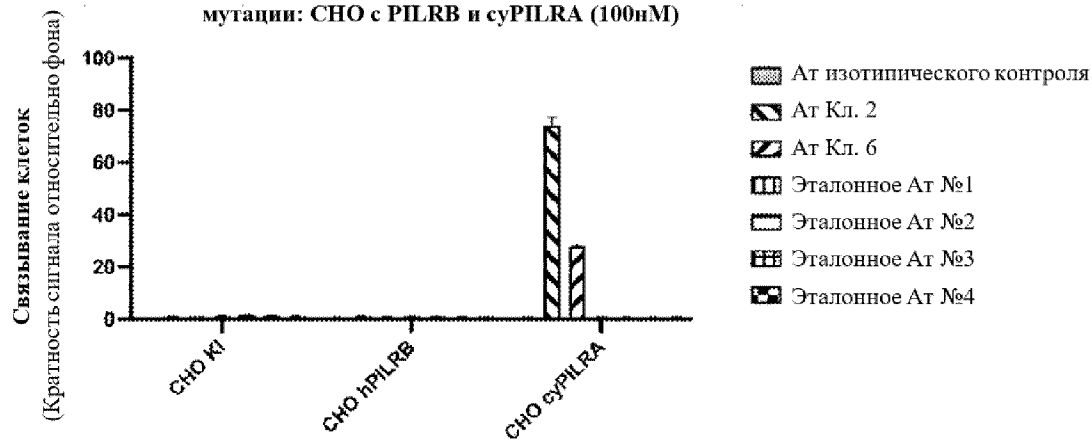
ФИГ. 2D
HEK hPILRB DAP12



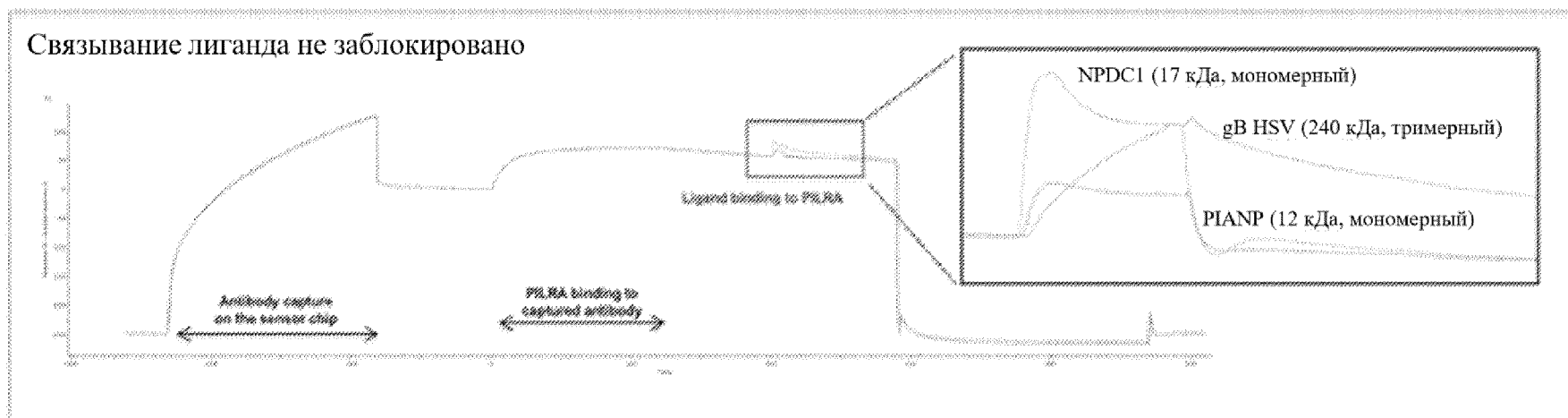
ФИГ. 2E
Связывание с клетками при единичной точечной мутации: CHO с hPILRA (100нМ)



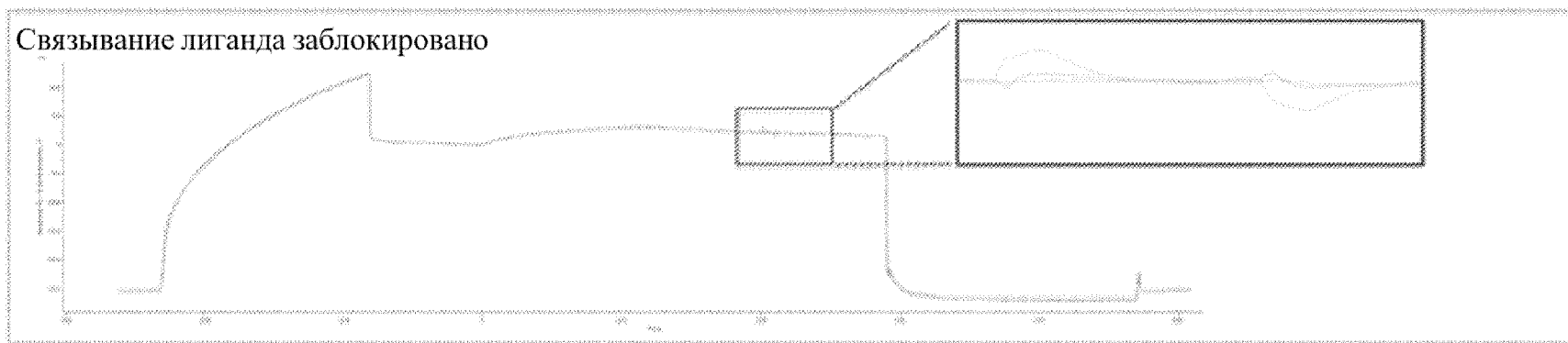
ФИГ. 2F
Связывание с клетками при единичной точечной мутации: CHO с PILRB и суPILRA (100нМ)



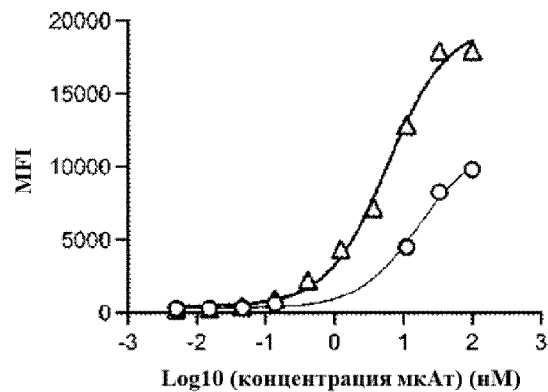
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

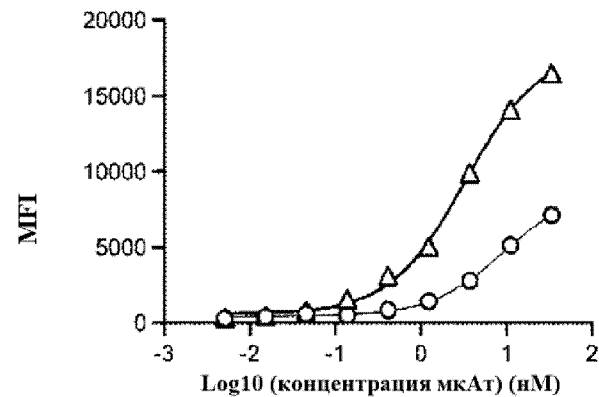


ФИГ. 3С
HEK hPILRA 78G



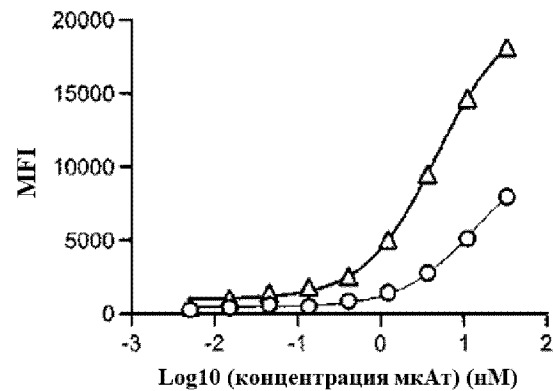
○ At Кл. 5
△ At Кл. 5 + Сиалидаза

ФИГ. 3D
HEK hPILRA 78G



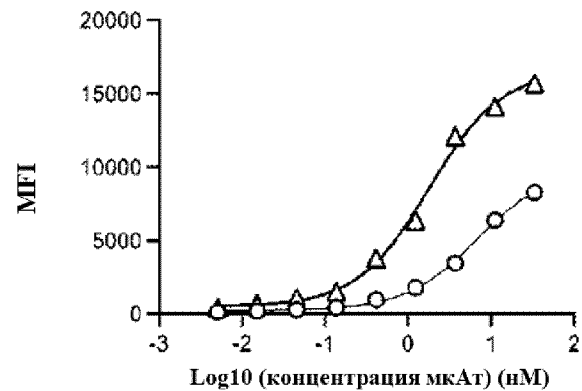
○ At Кл. 6
△ At Кл. 6 + Сиалидаза

ФИГ. 3Е
HEK hPILRA 78G



○ At Кл. 7
△ At Кл. 7 + Сиалидаза

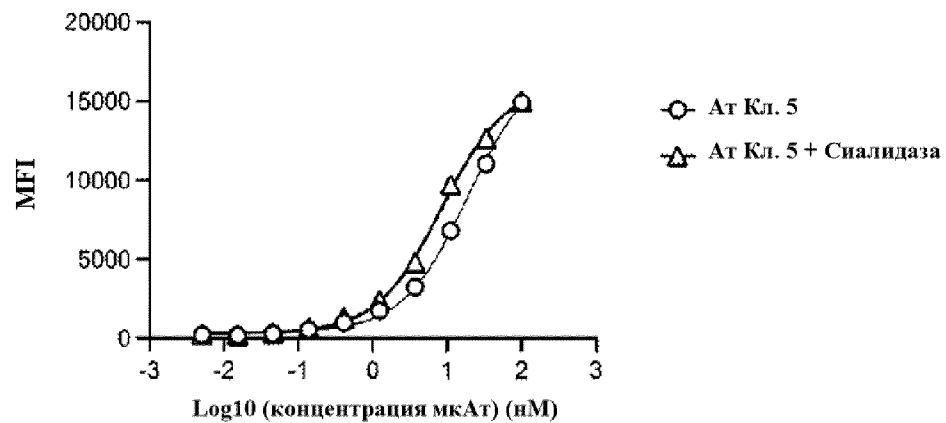
ФИГ. 3F
HEK hPILRA 78G



○ At Кл. 1
△ At Кл. 1 + Сиалидаза

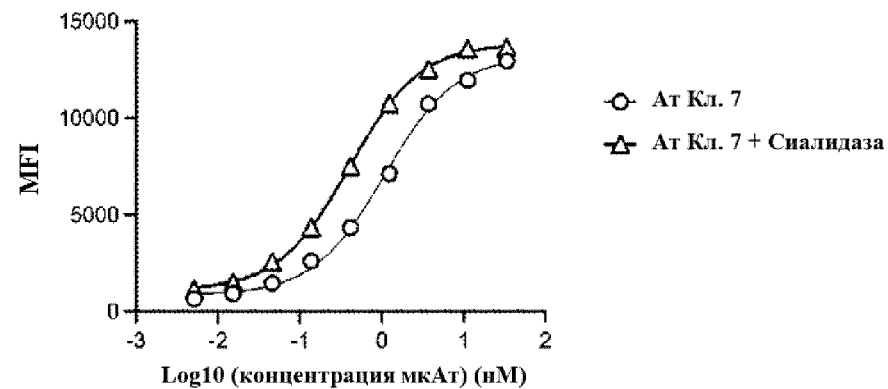
ФИГ. 3G

HEK hPILRA 78R



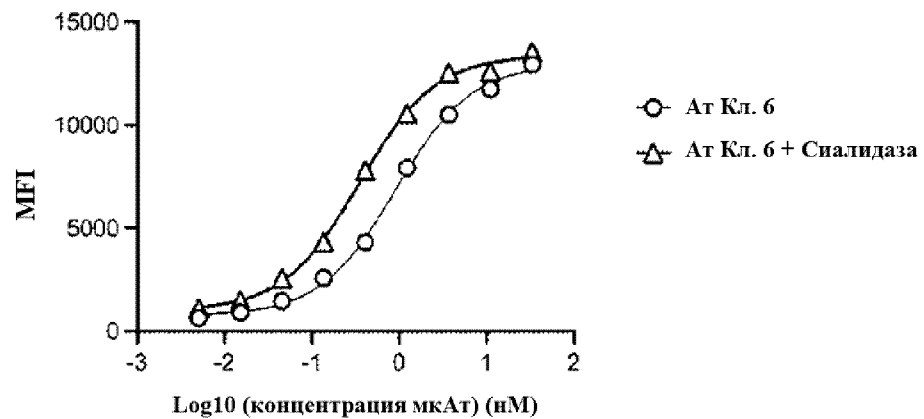
ФИГ. 3H

HEK hPILRA 78R



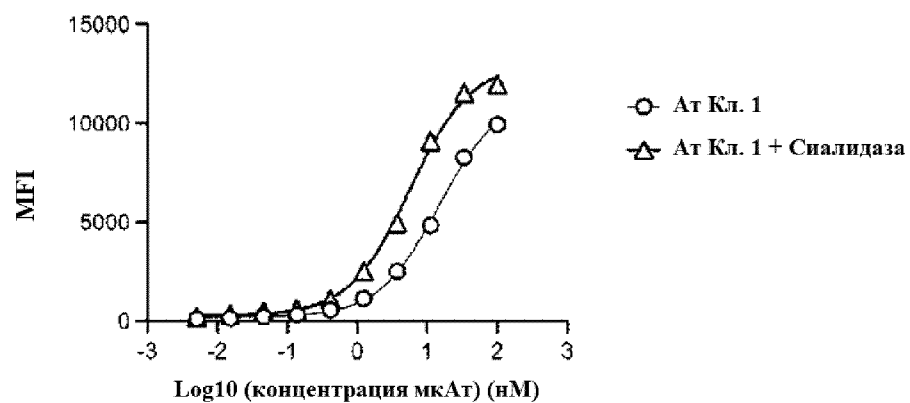
ФИГ. 3I

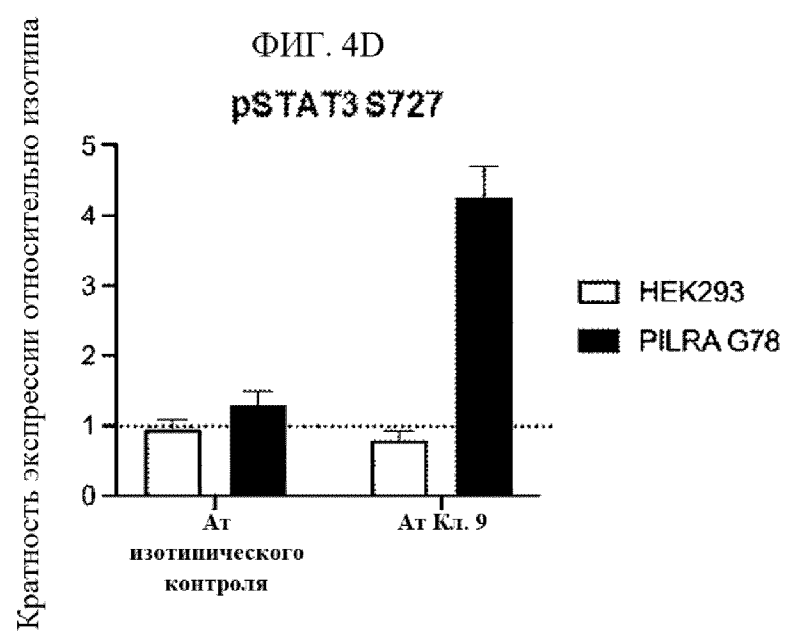
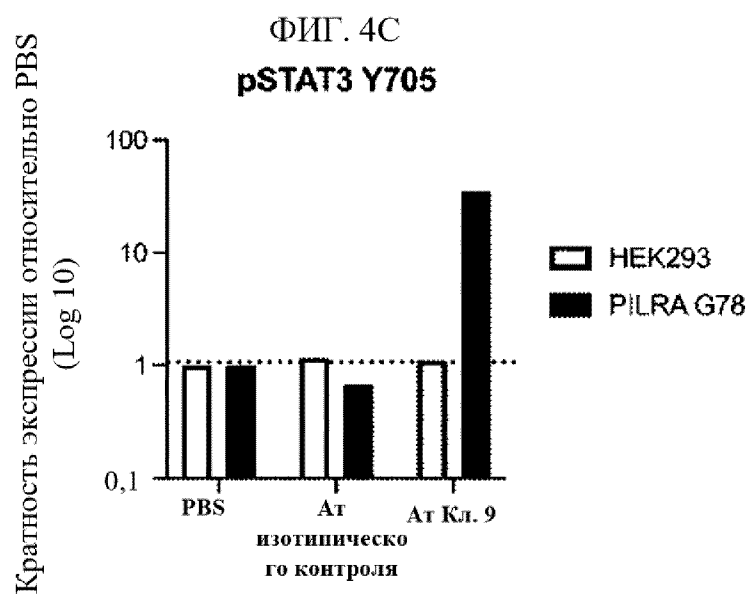
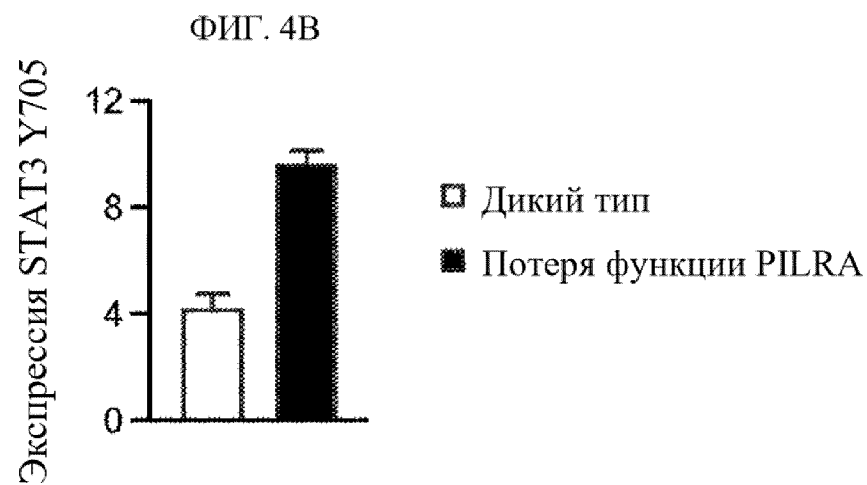
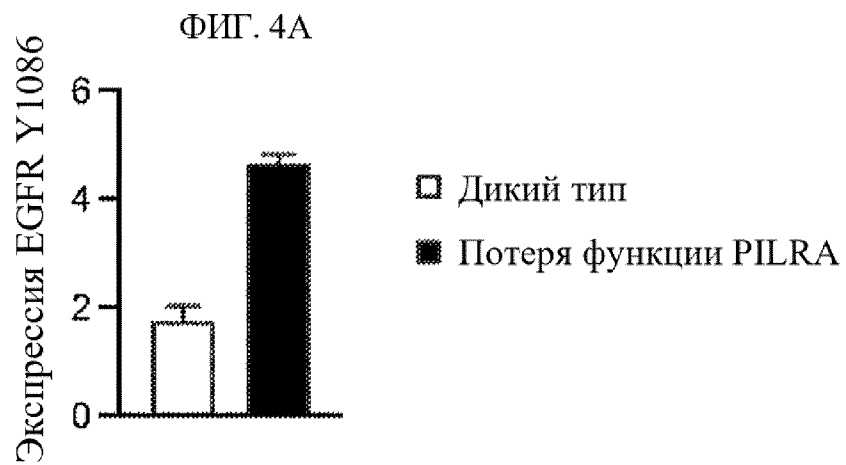
HEK hPILRA 78R



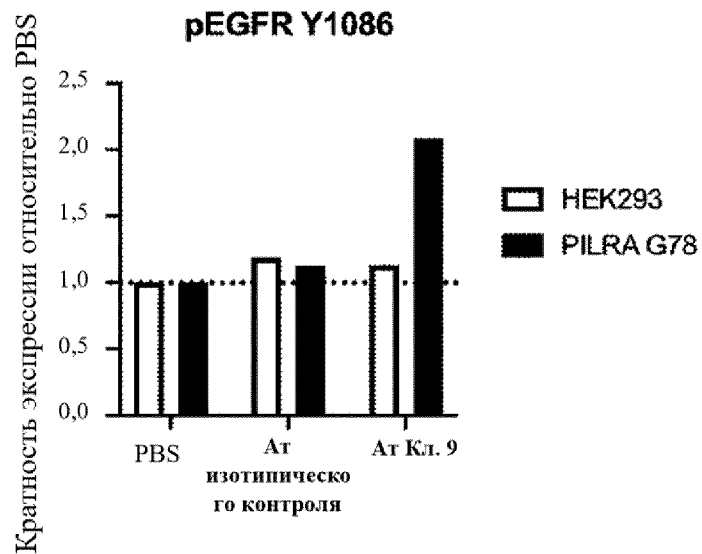
ФИГ. 3J

HEK hPILRA 78R

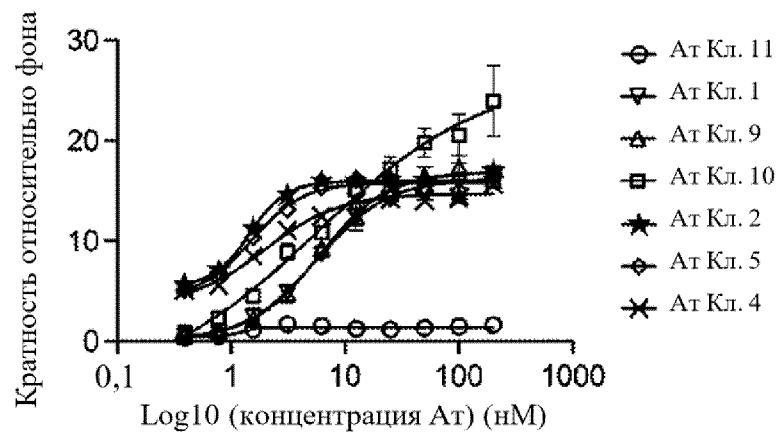




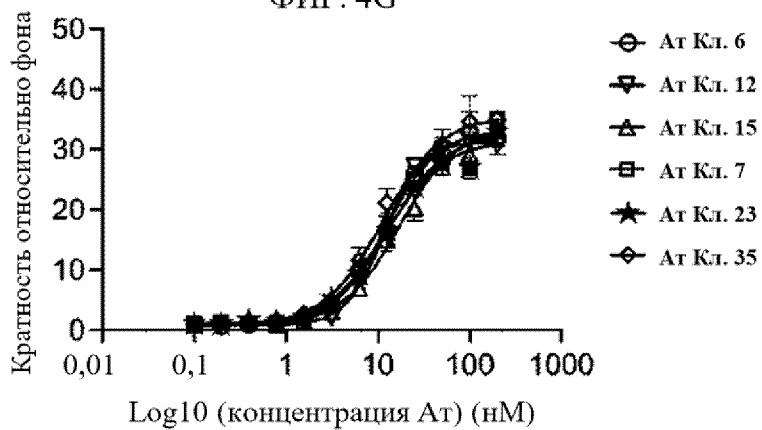
ФИГ. 4Е



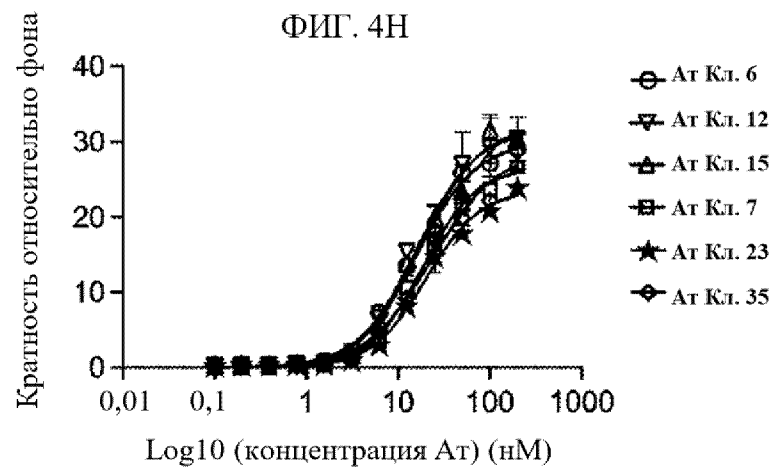
ФИГ. 4F



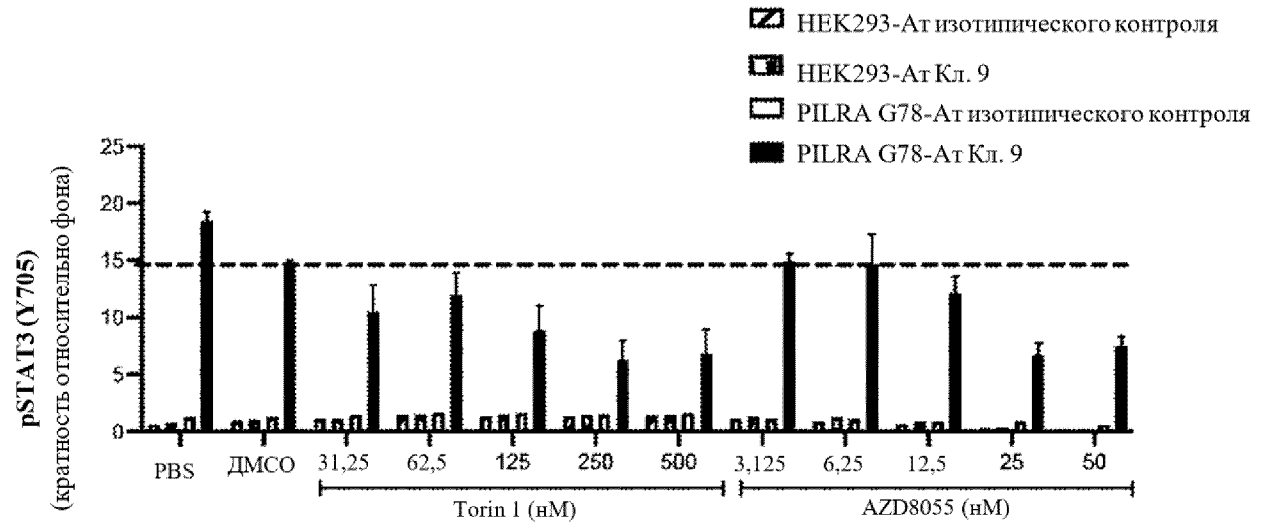
ФИГ. 4G



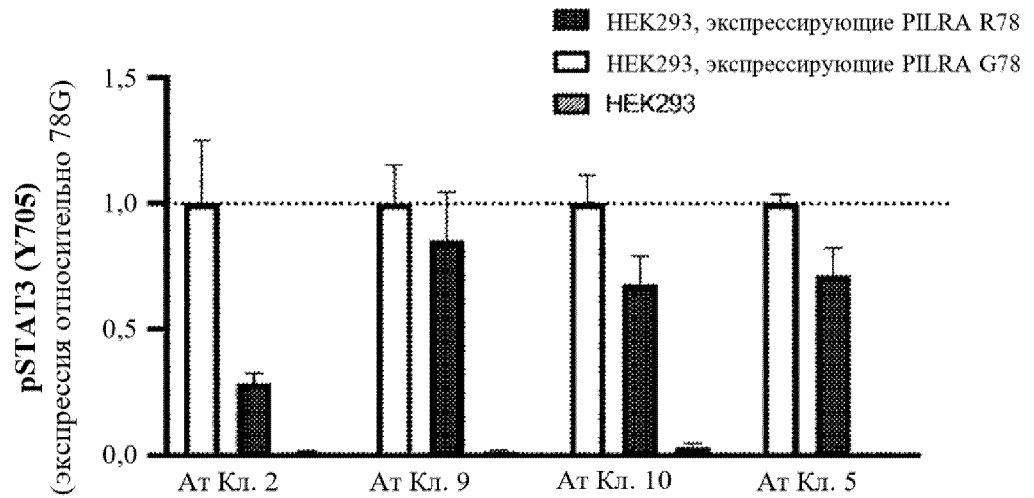
ФИГ. 4H

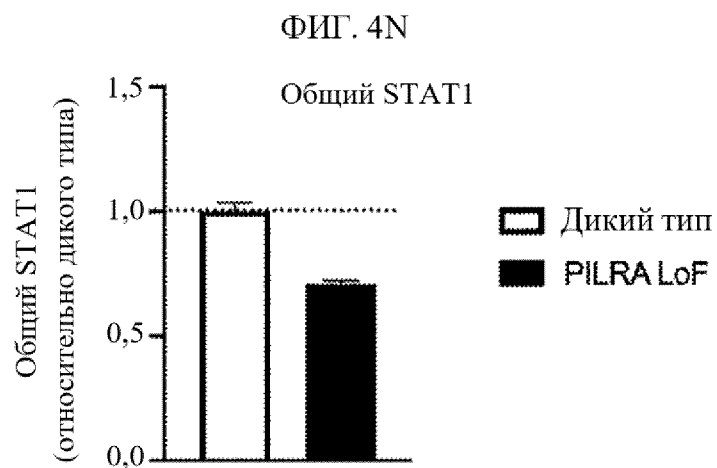
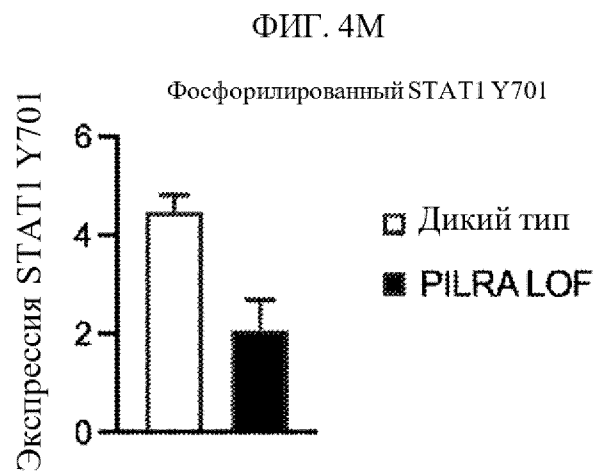
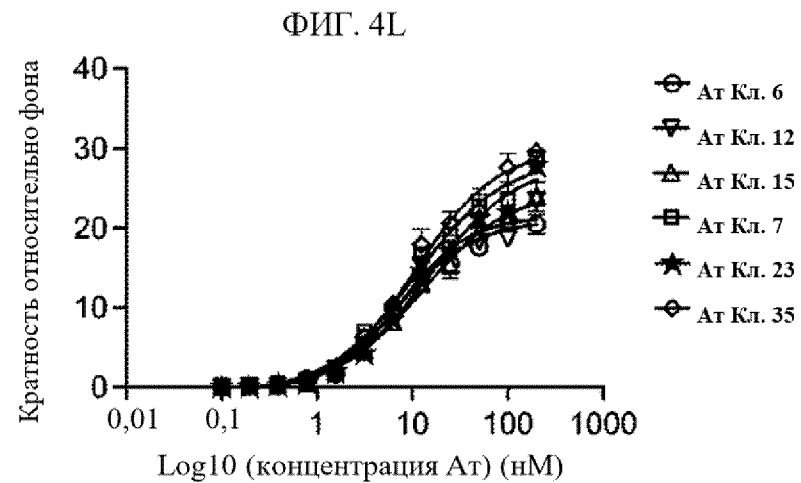
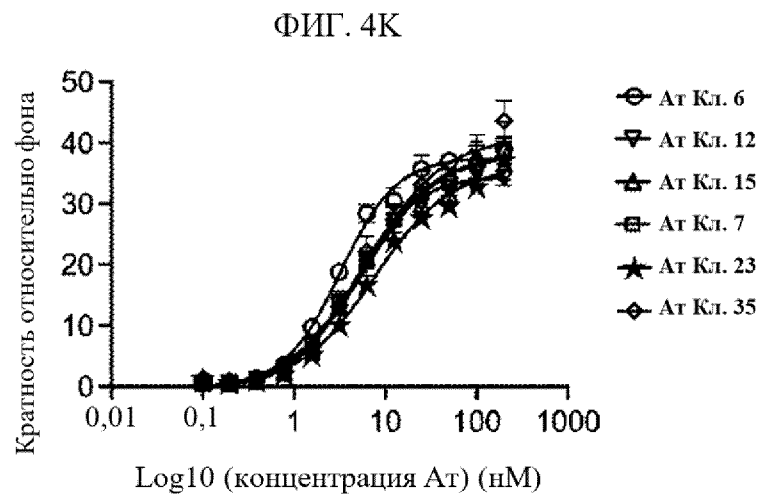


ФИГ. 4I

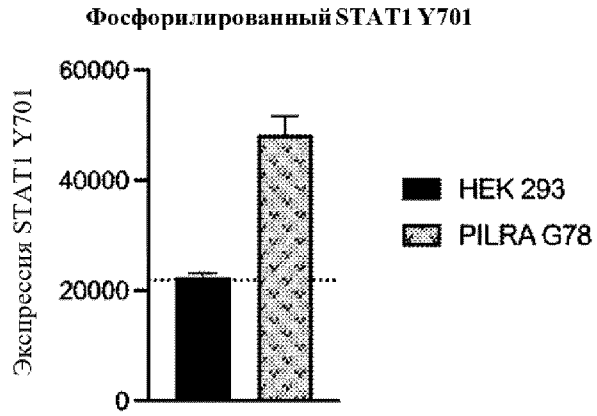


ФИГ. 4J

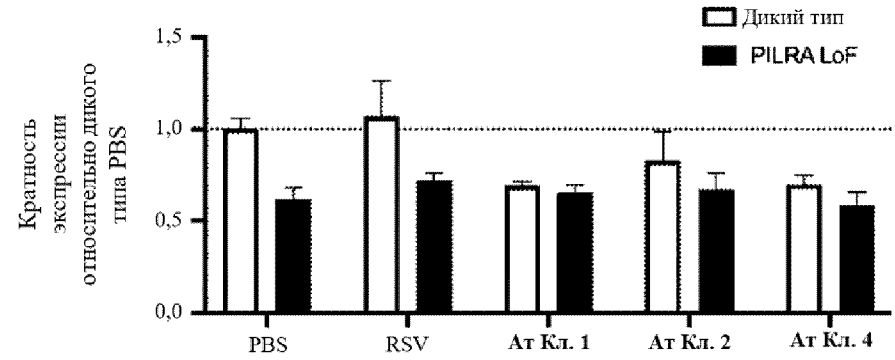




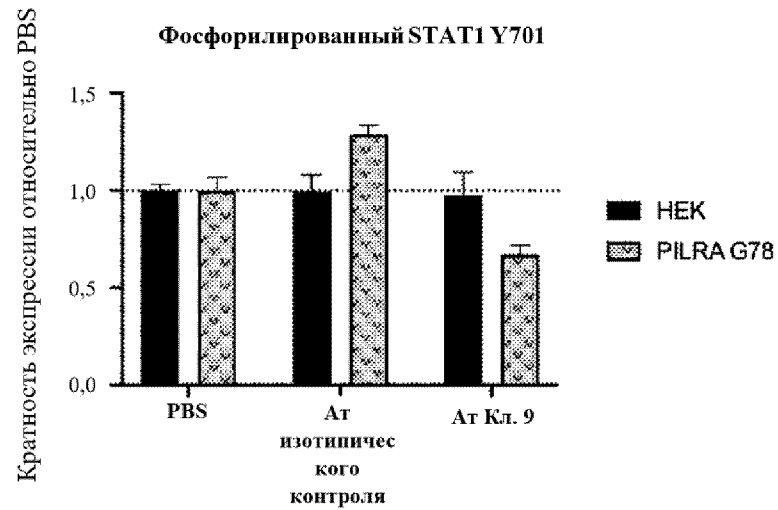
ФИГ. 4O



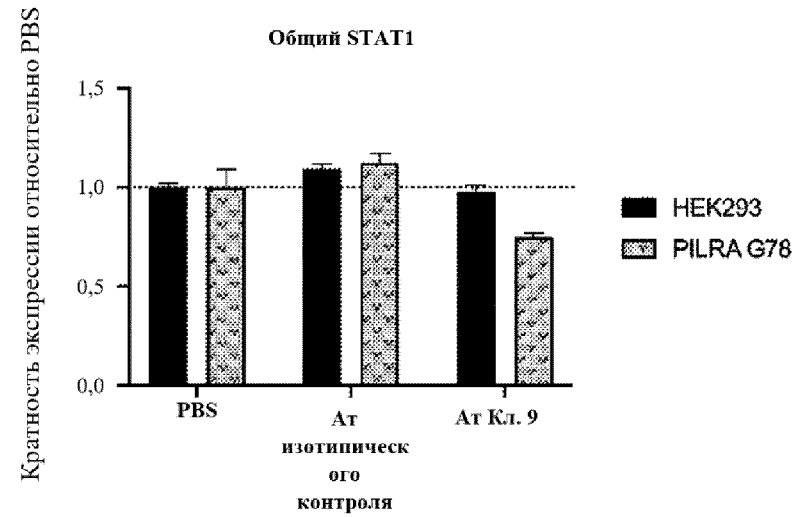
ФИГ. 4P



ФИГ. 4Q

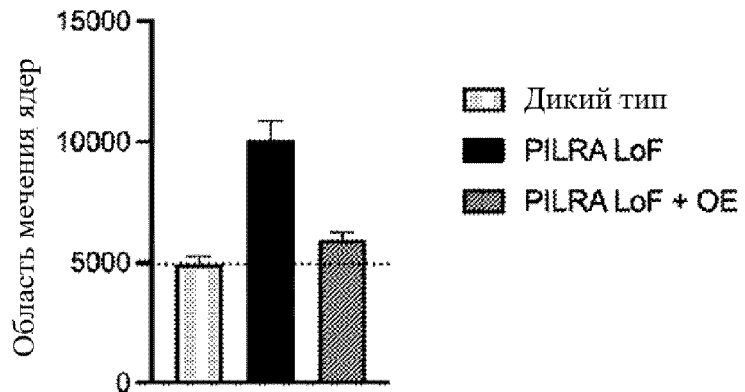


ФИГ. 4R



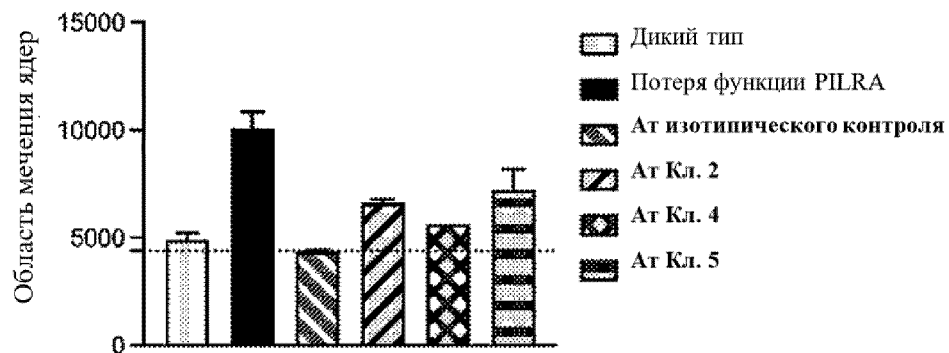
ФИГ. 5А

Миграция в зону детекции



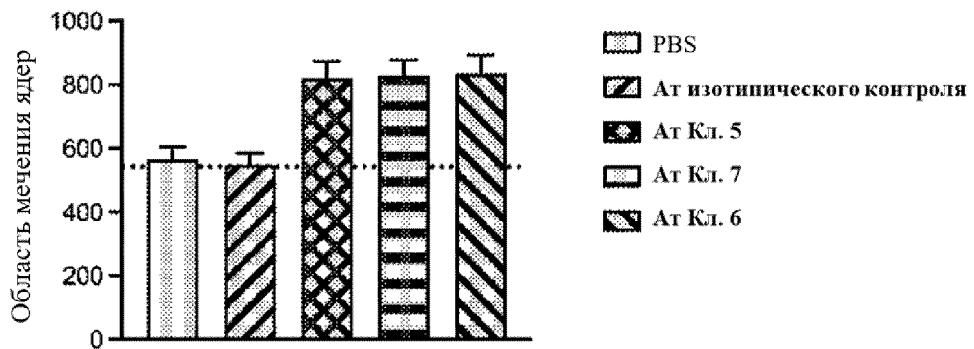
ФИГ. 5В

Миграция в зону детекции

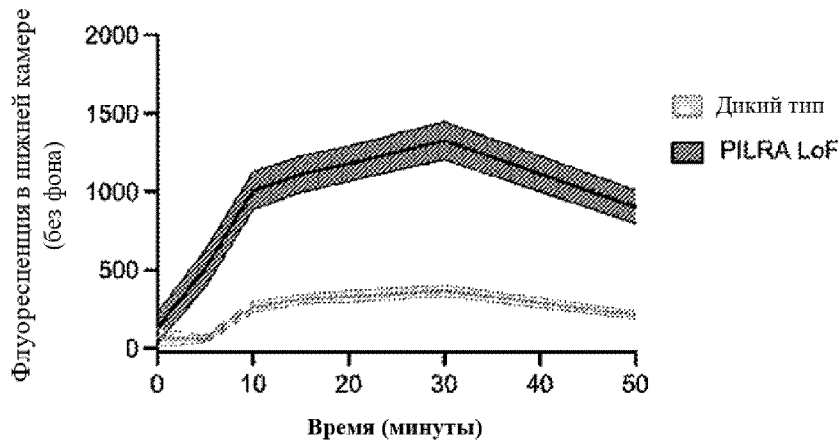


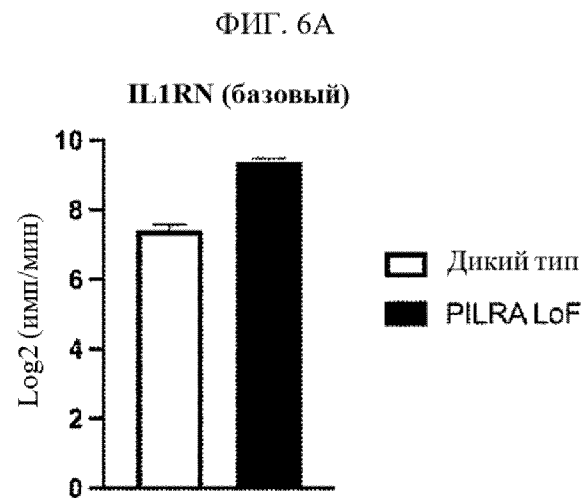
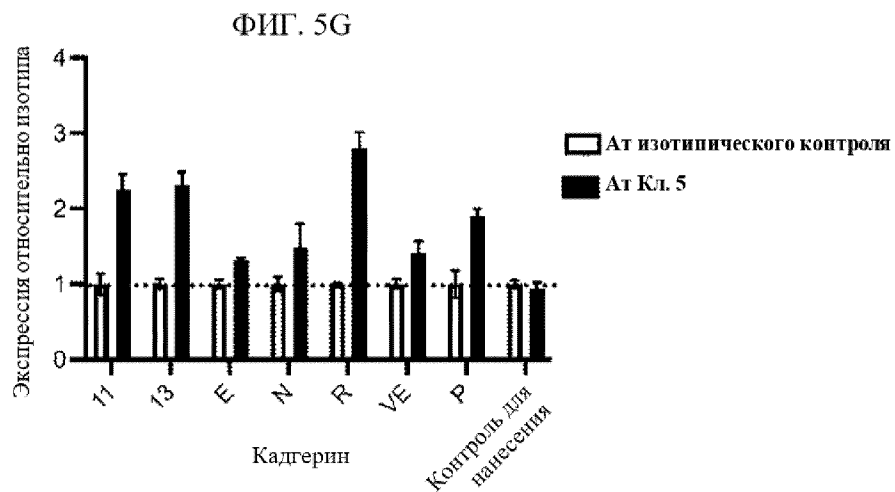
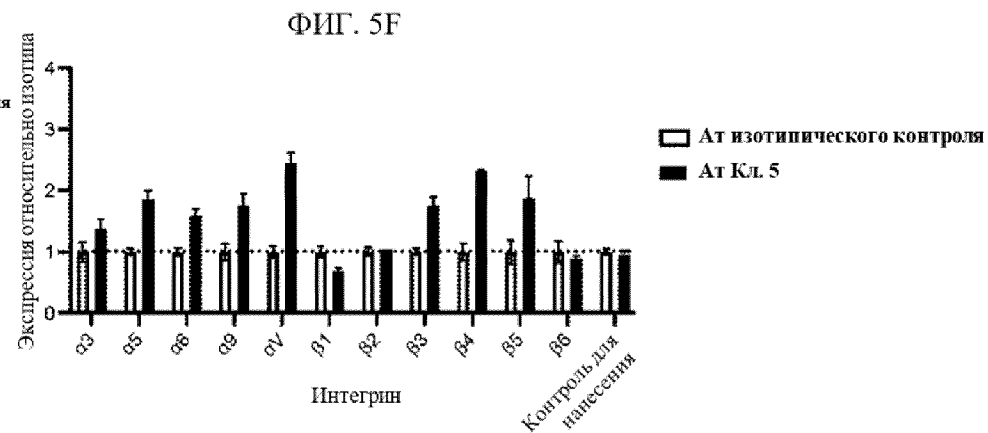
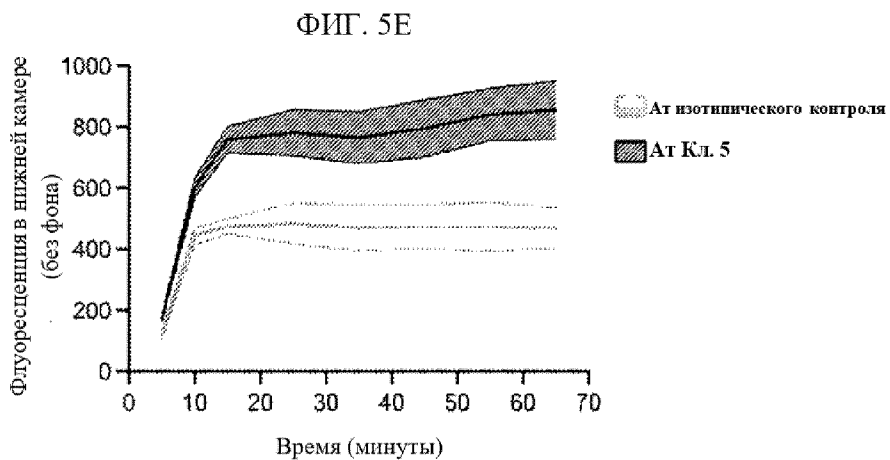
ФИГ. 5С

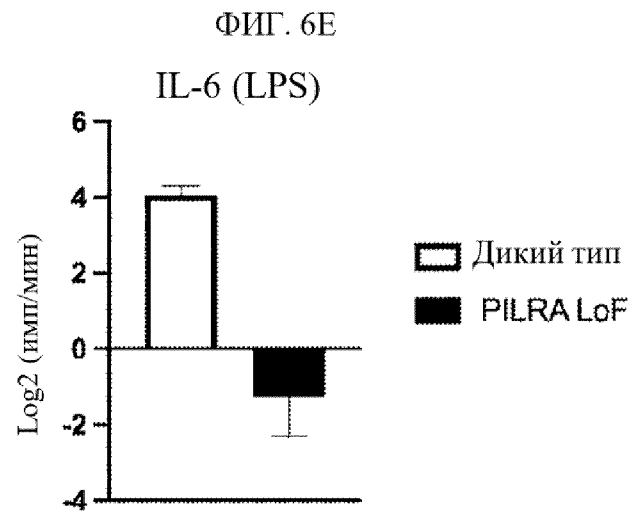
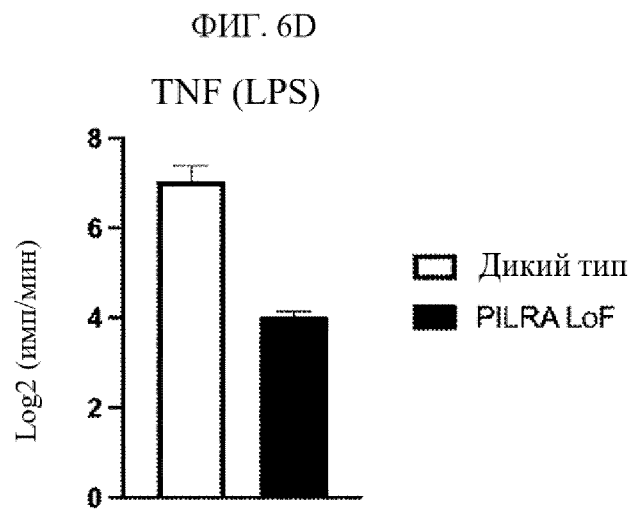
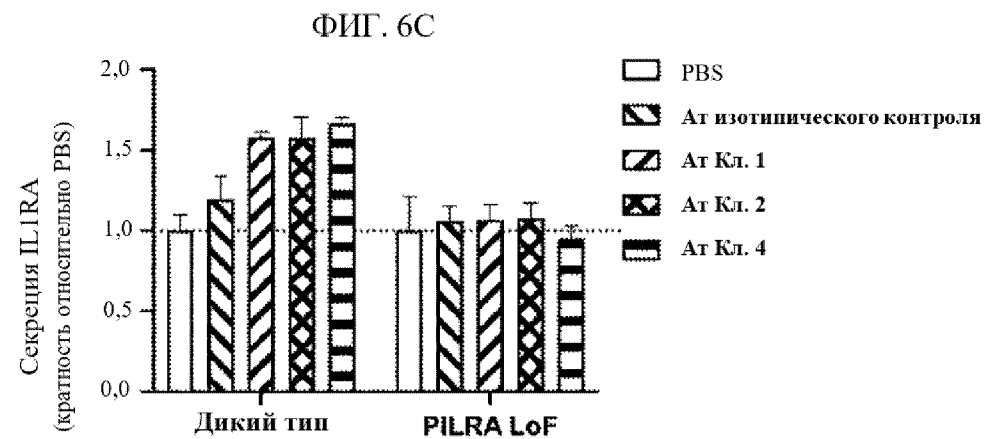
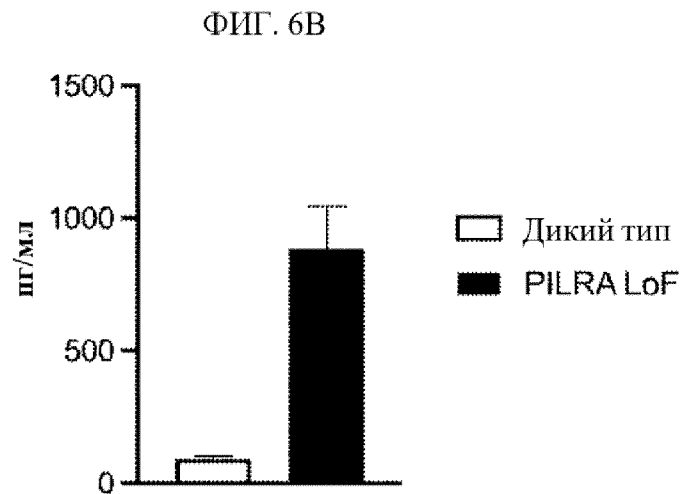
Миграция в зону детекции

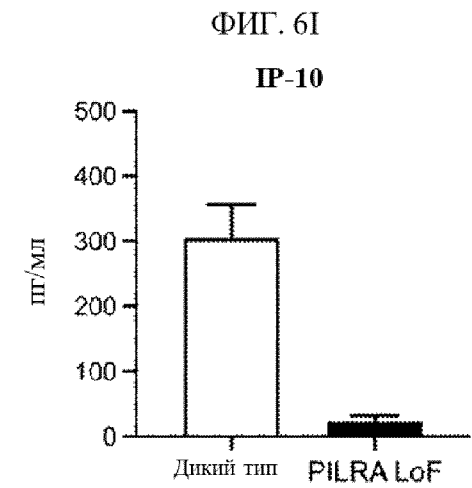
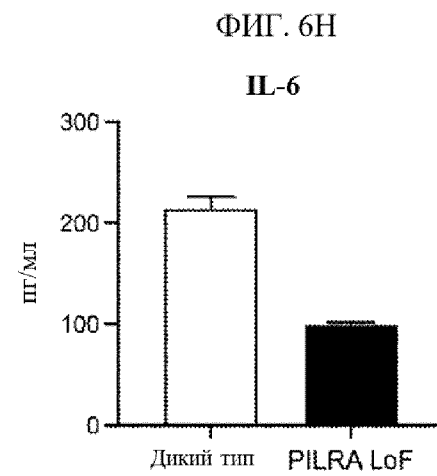
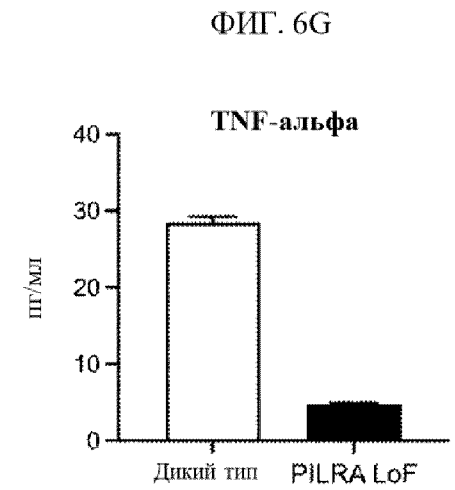
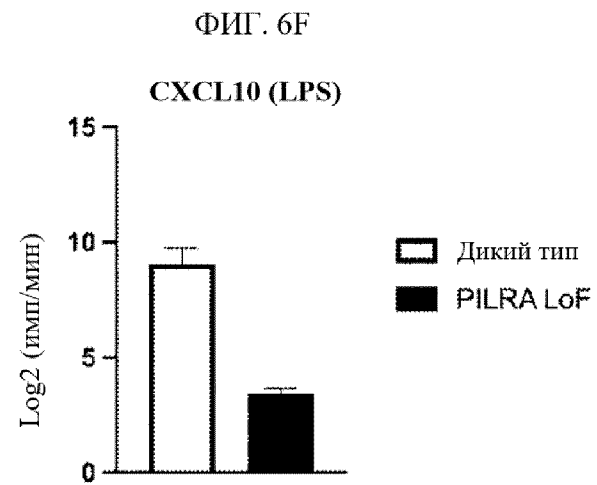


ФИГ. 5D



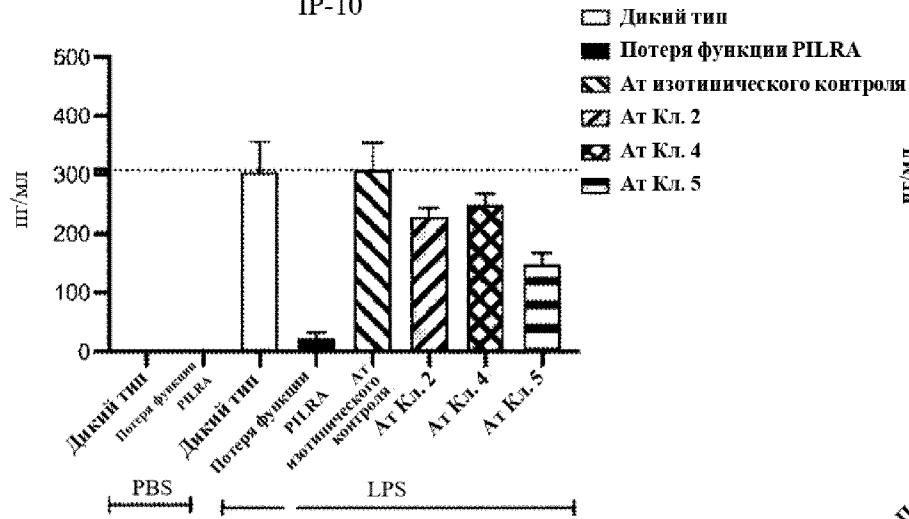






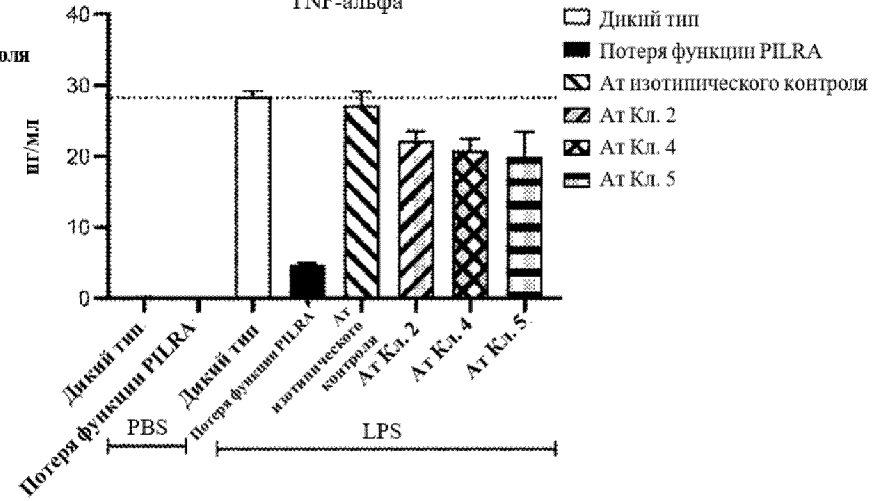
ФИГ. 6J

IP-10



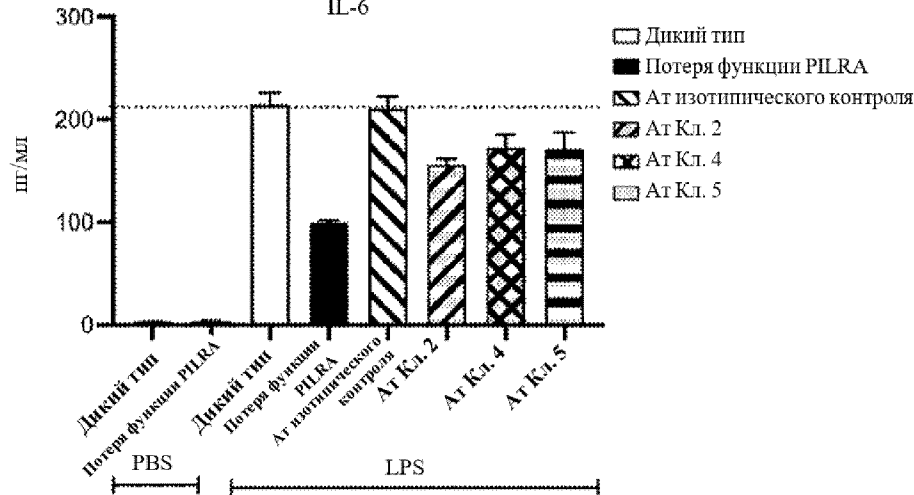
ФИГ. 6K

TNF-альфа



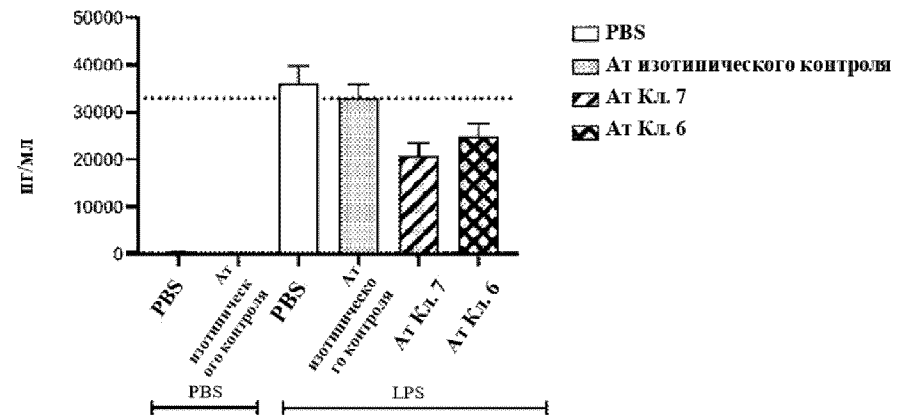
ФИГ. 6L

IL-6

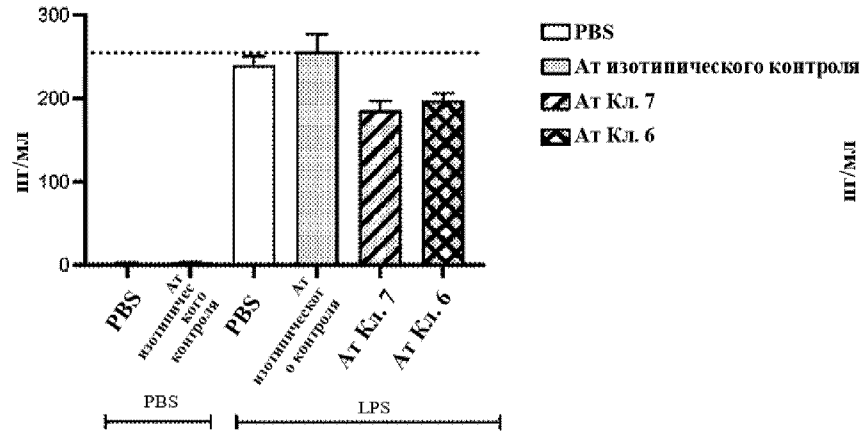


ФИГ. 6M

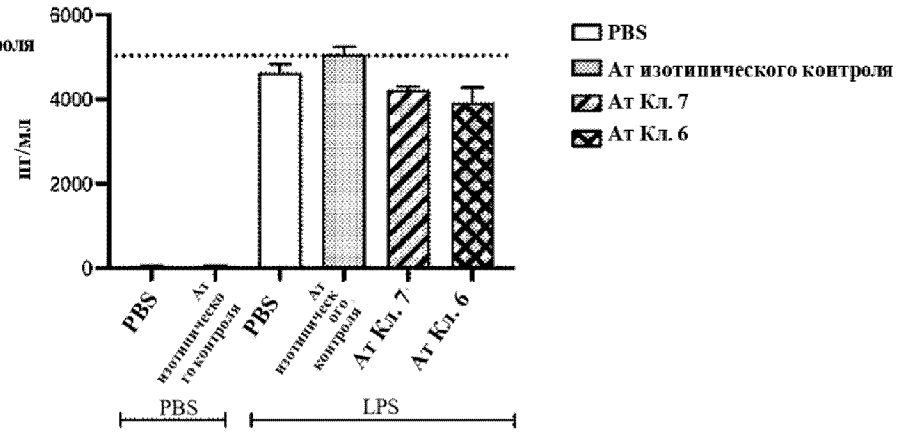
IP-10



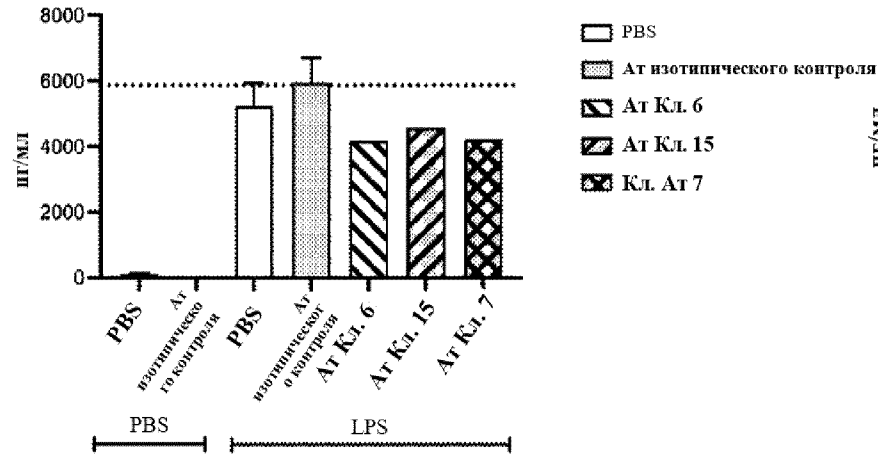
ФИГ. 6N
TNF-альфа



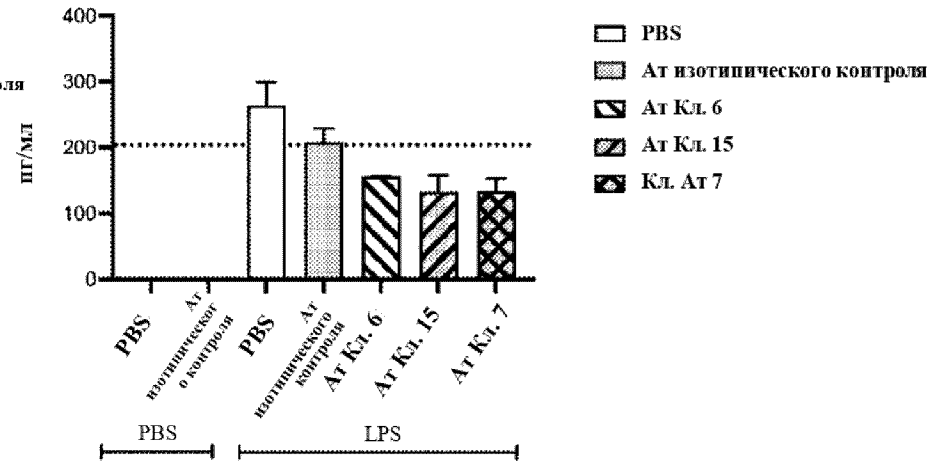
ФИГ. 6O
IL-6



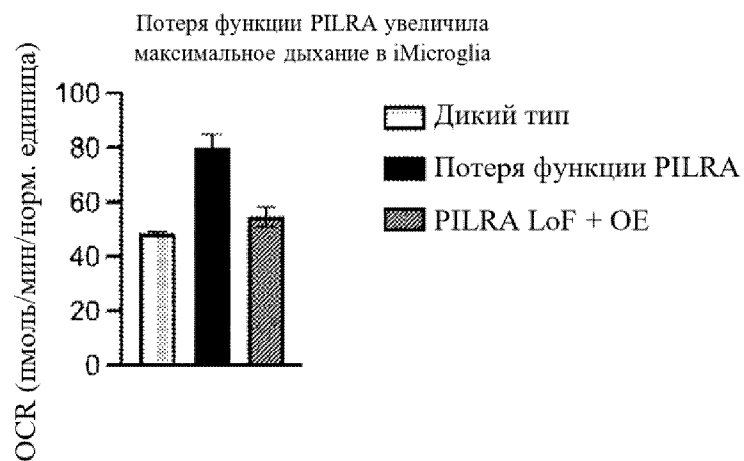
ФИГ. 6P
IP-10



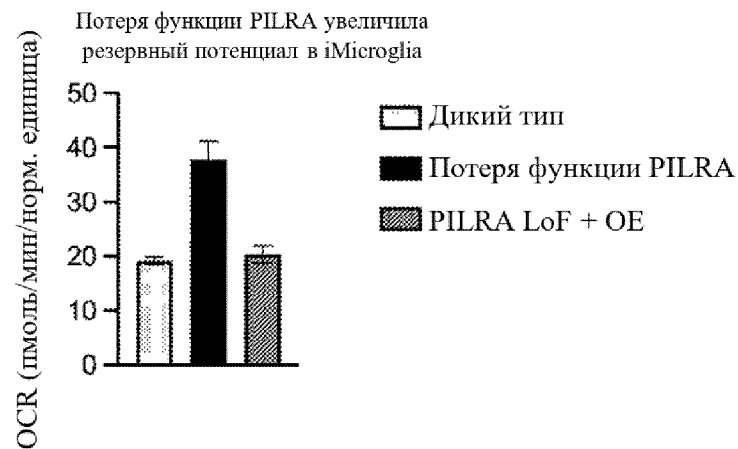
ФИГ. 6Q
IP-10



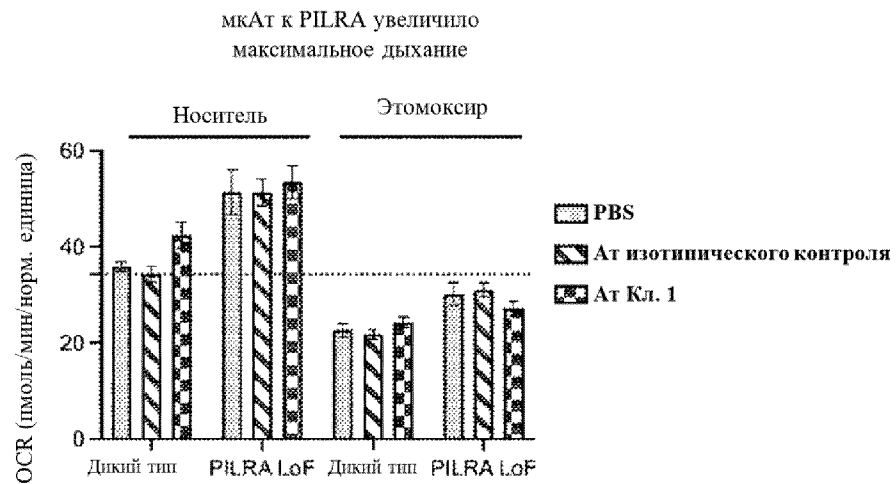
ФИГ. 7А



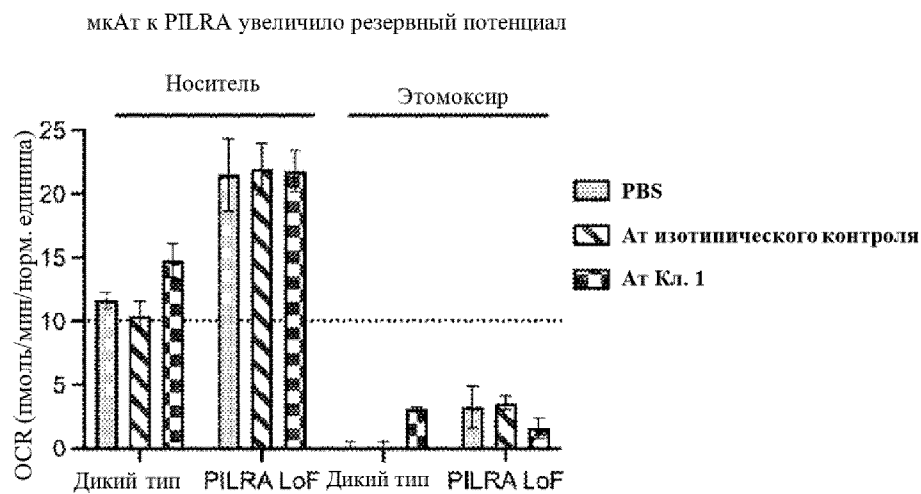
ФИГ. 7В

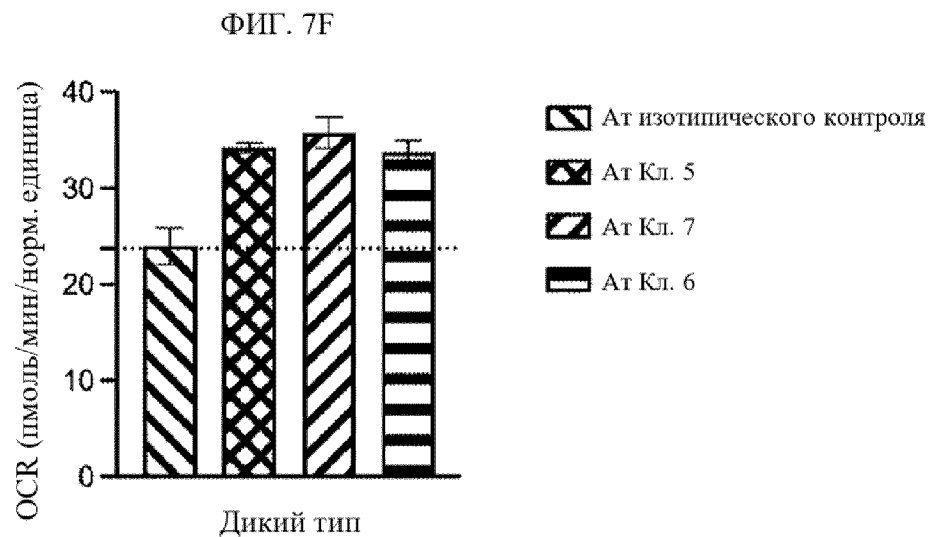
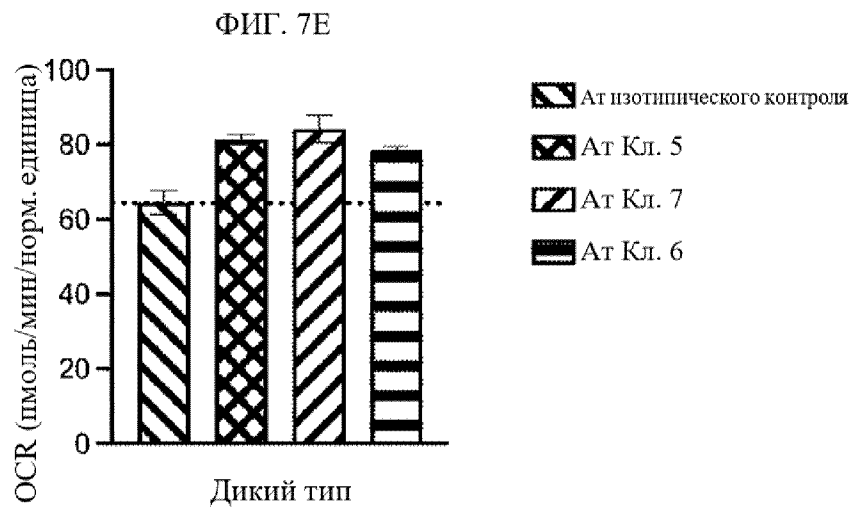


ФИГ. 7С

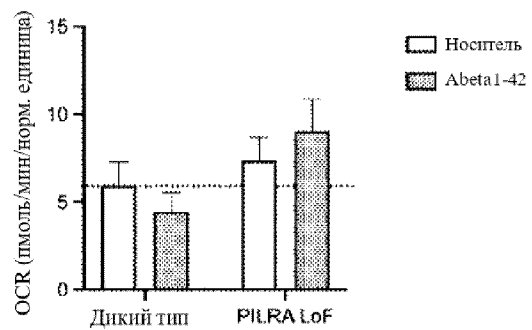


ФИГ. 7D

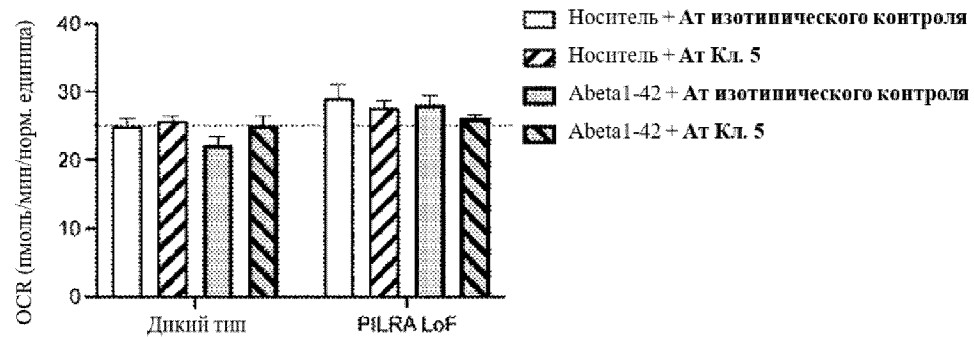




ФИГ. 7G
Немитохондриальное потребление кислорода

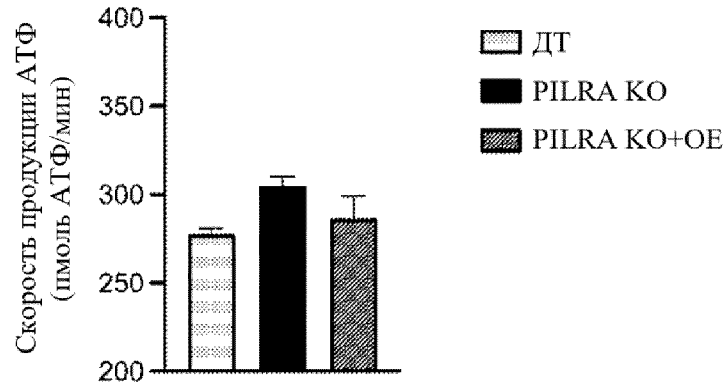


ФИГ. 7H
Немитохондриальное потребление кислорода

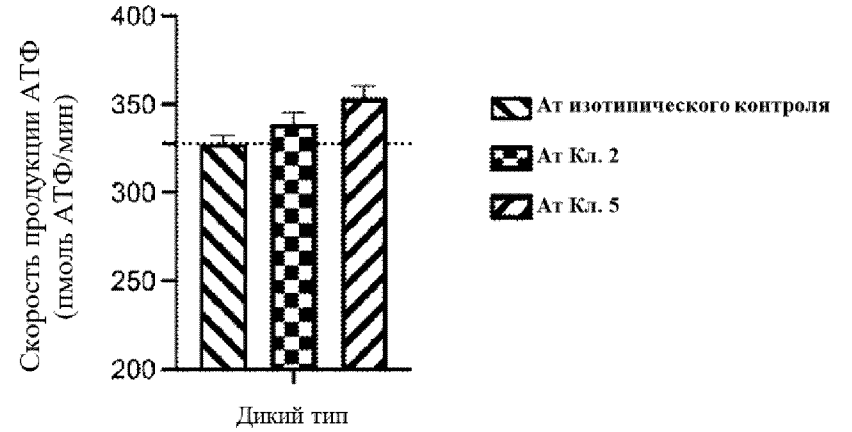


ФИГ. 7I

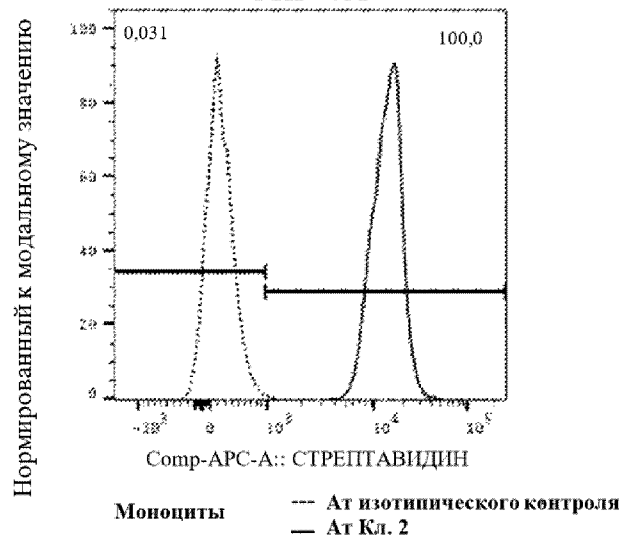
Потеря функции PILRA увеличила скорость продукции митохондриальной АТФ



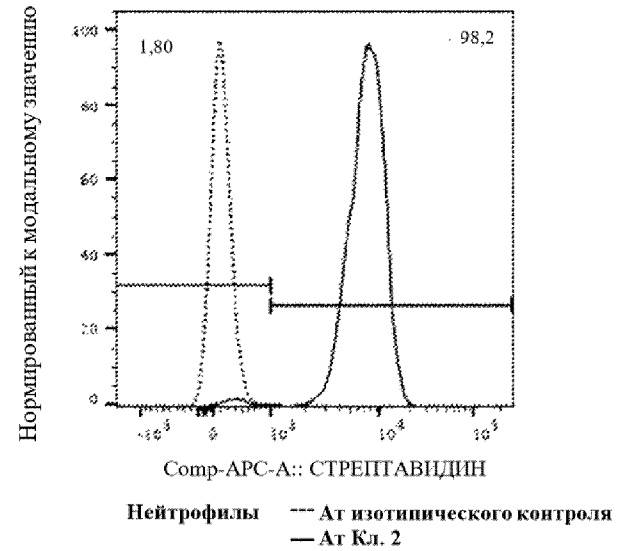
ФИГ. 7J

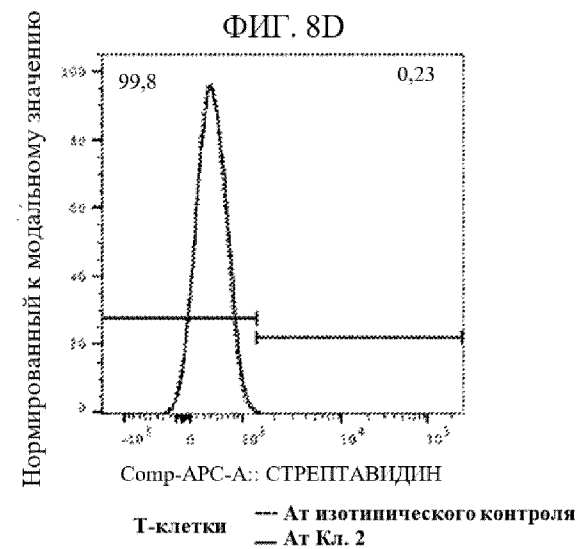
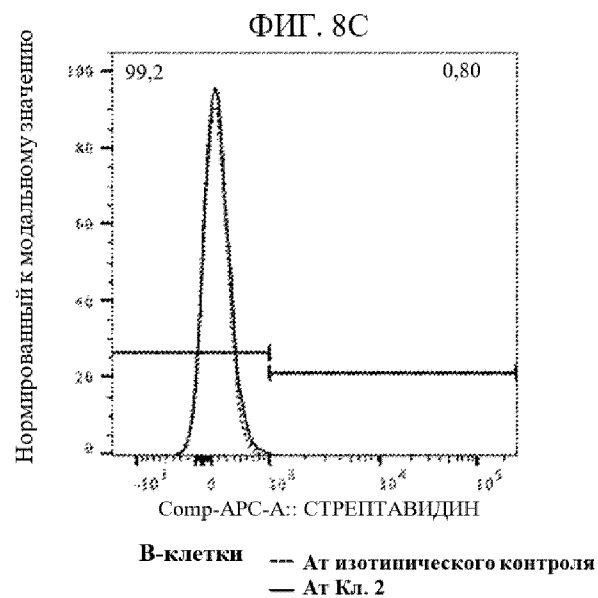


ФИГ. 8A

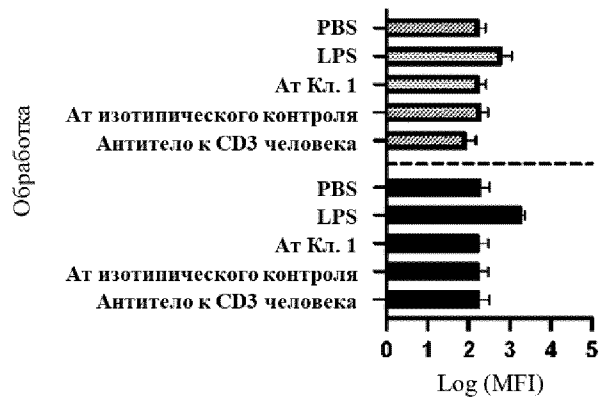


ФИГ. 8B

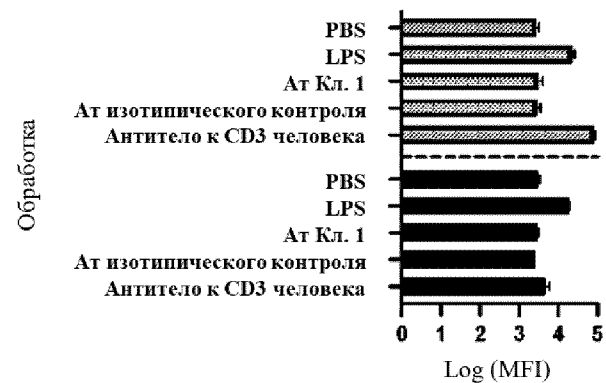




ФИГ. 8Е
Экспрессия CD25 моноцитами человека

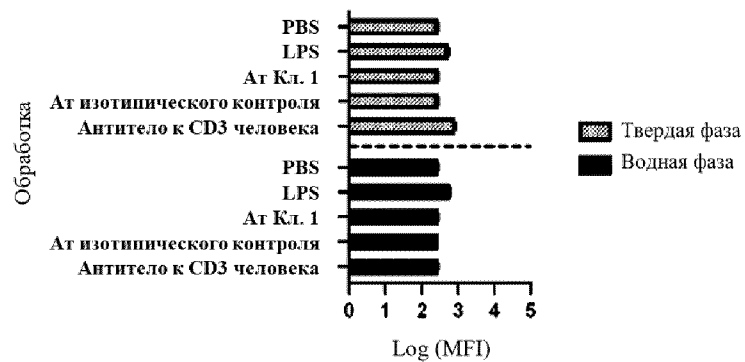


ФИГ. 8F
Экспрессия HLA-DR моноцитами человека



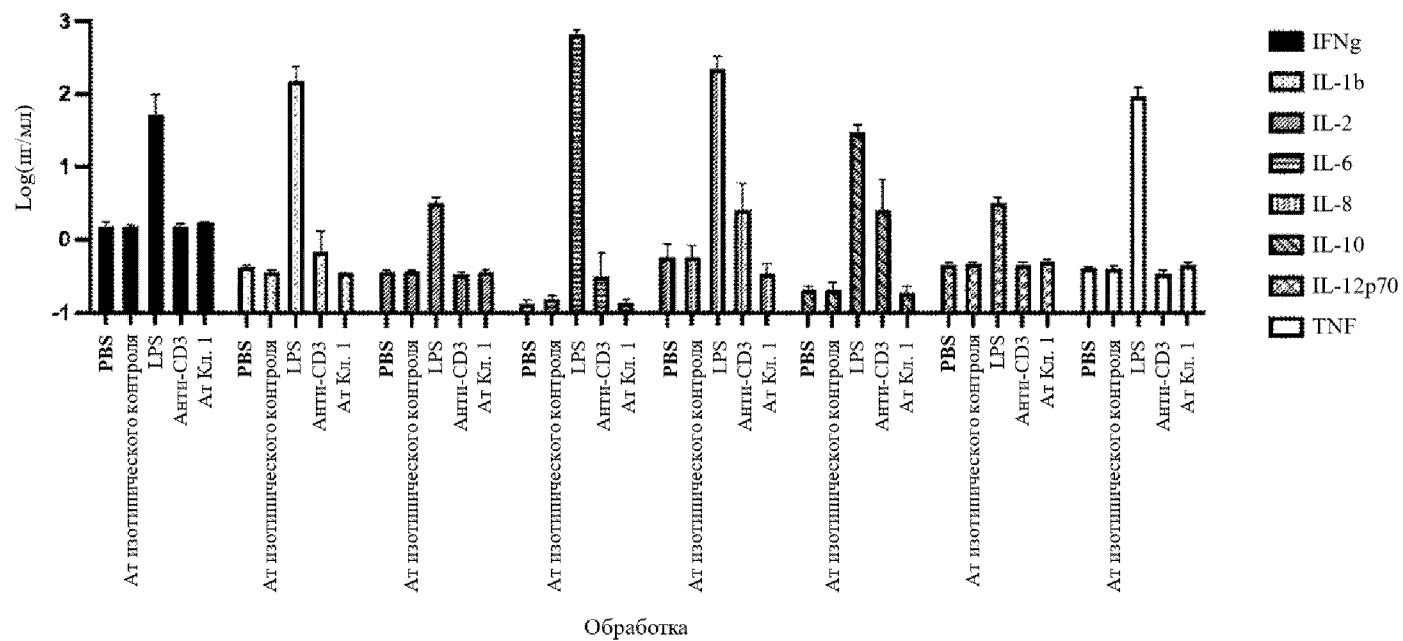
ФИГ. 8G

Экспрессия HLA-DR нейтрофилами человека



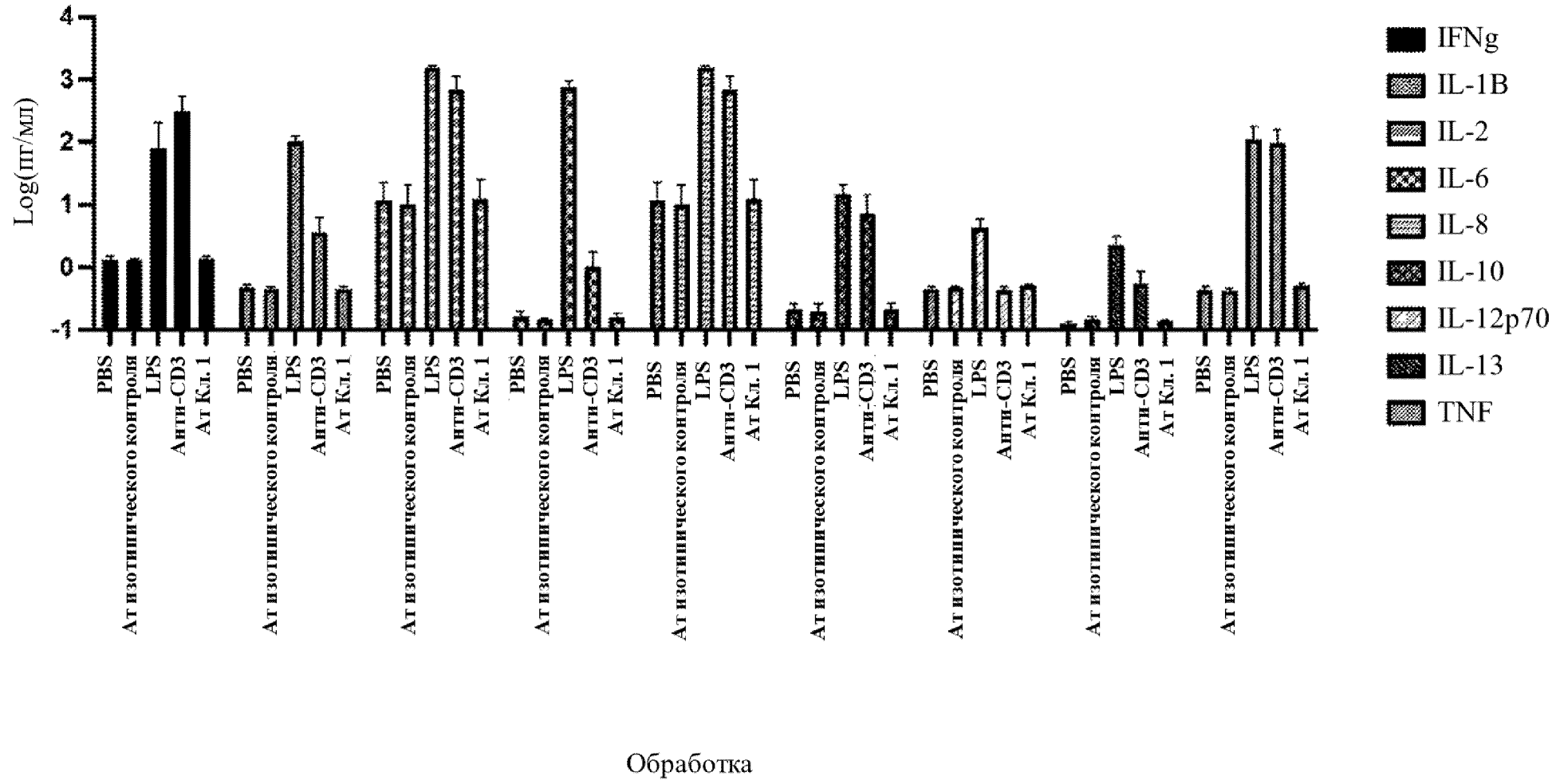
ФИГ. 8H

Анализ высвобождения цитокинов в водной фазе на лейкоцитах человека ex vivo

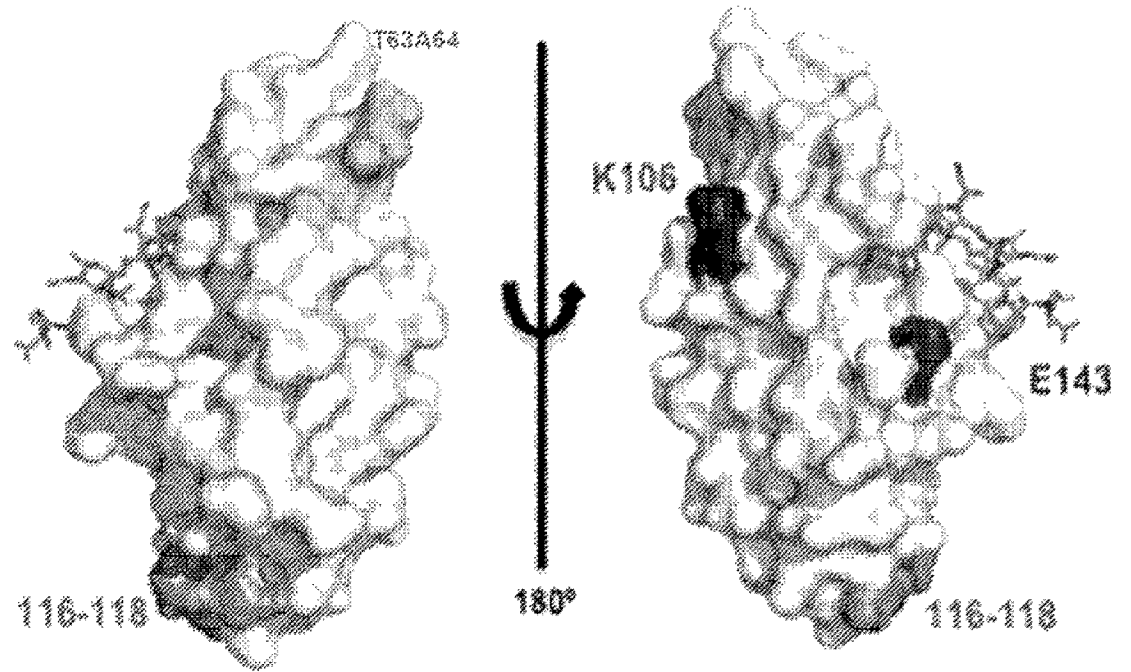


ФИГ. 8I

Твердофазный анализ высвобождения цитокинов на лейкоцитах человека *ex vivo*



ФИГ. 9А



ФИГ. 9В

| | Ат Кл. 2 | Ат Кл. 4 | Ат Кл. 9 | Ат Кл. 10 | Ат Кл. 5 | Ат Кл. 6 | Ат Кл. 7 | Ат Кл. 11 | Ат Кл. №1 | Ат Кл. №2 | Ат Кл. №3 | Ат Кл. №4 | Эпитонная группа |
|----------------|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------|
| Ат Кл. 2 | X | X | ○ | ○ | X | X | X | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | #1 |
| Ат Кл. 4 | X | X | ○ | ○ | X | X | X | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | #1 |
| Ат Кл. 9 | ○ | ○ | X | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | #2 |
| Ат Кл. 10 | ○ | ○ | ○ | X | ○ | ○ | ○ | ○ | X | X | X | X | #3 |
| Ат Кл. 5 | X | X | ○ | ○ | X | X | X | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | #1 |
| Ат Кл. 6 | X | X | ○ | ○ | X | X | X | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | #1 |
| Ат Кл. 7 | X | X | ○ | ○ | X | X | X | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | #1 |
| Ат Кл. 11 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | X | ○ | ○ | ○ | ○ | #4 |
| Эталон. Ат. №1 | ○ | ○ | ○ | X | ○ | ○ | ○ | ○ | X | X | X | X | #3 |
| Эталон. Ат. №2 | ○ | ○ | ○ | X | ○ | ○ | ○ | ○ | X | X | X | X | #3 |
| Эталон. Ат. №3 | ○ | ○ | ○ | X | ○ | ○ | ○ | ○ | X | X | X | X | #3 |
| Эталон. Ат. №4 | ○ | ○ | ○ | X | ○ | ○ | ○ | ○ | X | X | X | X | #3 |

ФИГ. 10

ВКД PILRA

| | | | |
|------------------------|--|----------|-----|
| | | 783. A64 | G78 |
| PILRA_яванского_макака | QPGGSAGSCPSGPGYGVTVQRKHL SAPMGGSVEIPFSFYHPWELAAAPNMKISWRRGNFHE | | |
| PILRA_человека | QPSGSTGSGPSYLYGVTVQPKHLSASMGGSV EIPFSFYYPWELATA PDVRI SWRRGHFHGQ | | |
| PILRB_человека | QPGGSTGSGPSYLYGVTVQPKHLSASMGGSV EIPFSFYYPWELALV PNVRI SWRRGHFHGQ | | |

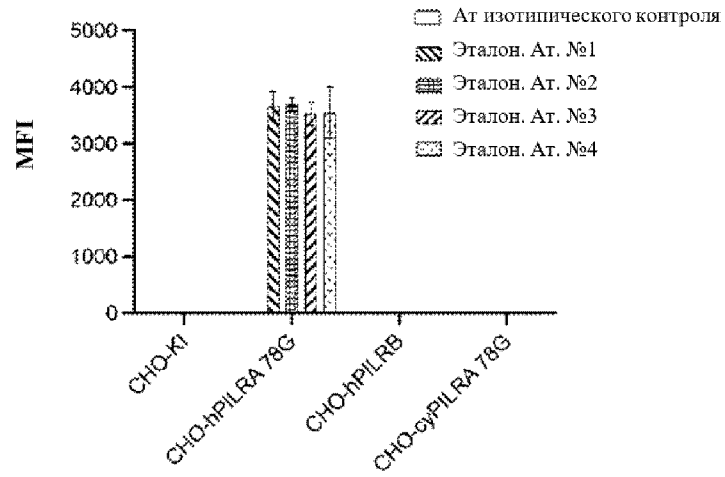
ВКД PILRA

| | | |
|------------------------|---|------------------|
| | K106 | G116, K117, Q118 |
| PILRA_яванского_макака | FFYRTRPAFIHEDYSNRLLLNWTEGQDRGLLR IWNLRKE DQSVYFCRVELDTRRSGRQRW | |
| PILRA_человека | SFYSTRPPSIHKDYVNRLFNLNWTEGQKSGFLR ISNLRKQDQSVYFCRVELDTRSSGRQOW | |
| PILRB_человека | SFYSTRPPSIHKDYVNRLFNLNWTEGQKSGFLR ISNLRKE DQSVYFCRVELDTRRSGRQOL | |

Стеблевая область

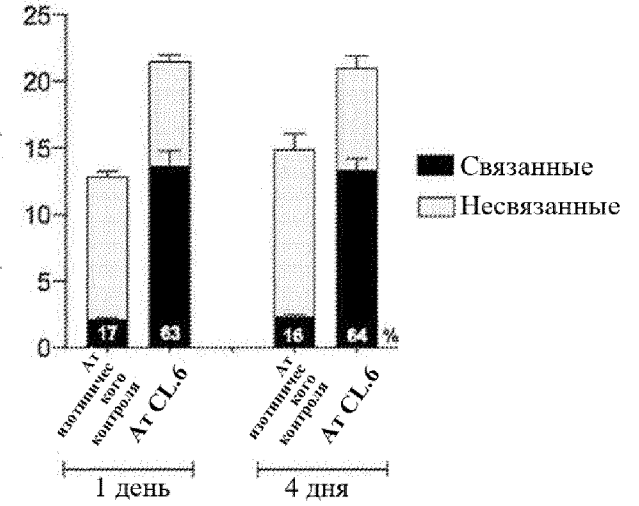
| | | | |
|------------------------|---|-----------|-------------------------|
| | E143 | Стебель 1 | Стебель 2(182-188) |
| PILRA_яванского_макака | QSIEGTKLITQAVTTTTRPSSMTTTRRPSSATTTAGLRVTQGKRHS DSWHLSLKT | | (AK 24-200 SEQ ID NO:2) |
| PILRA_человека | QSIEGTKLSITQAVTTTTRPSSMTTTRWRLSSTTTTGLRVTQGKRHS DSWHISLET | | (AK 20-196 SEQ ID NO:1) |
| PILRB_человека | QSIEGTKLITQAVTT-----TTTRPSSTTT IAGLRVTE SKGHS DSWHLSLDT | | (AK 20-188 SEQ ID NO:3) |

ФИГ. 11

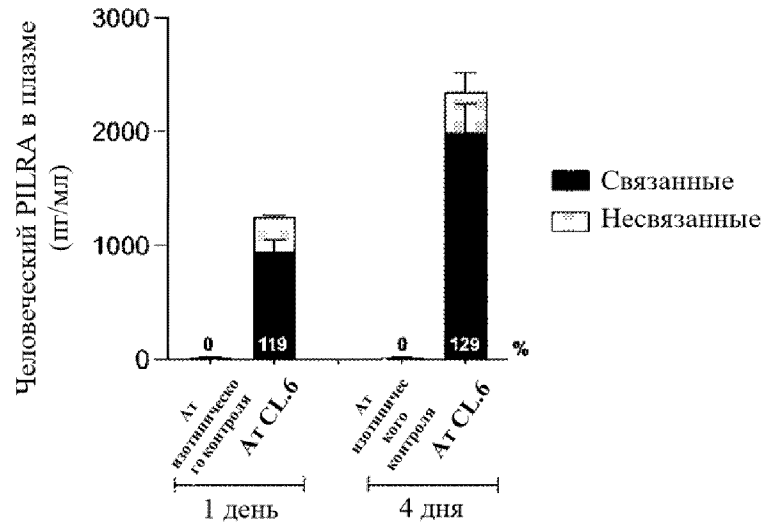


Человеческий P1LRA в головном мозге (пг/мг белка)

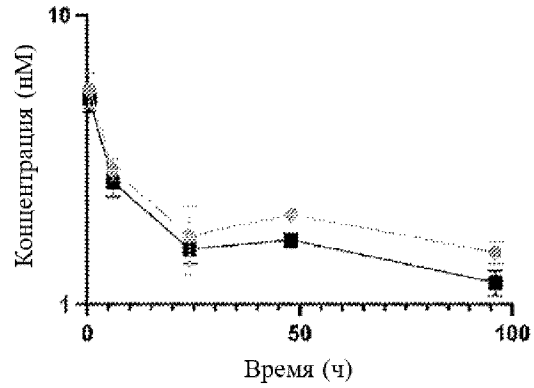
ФИГ. 12А



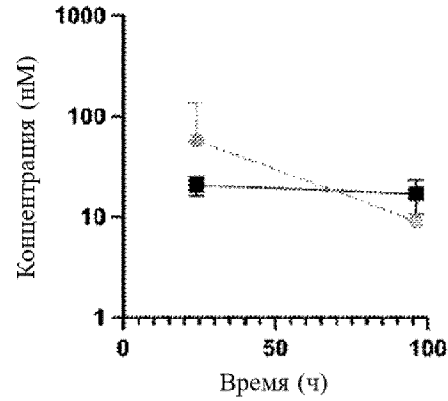
ФИГ. 12В



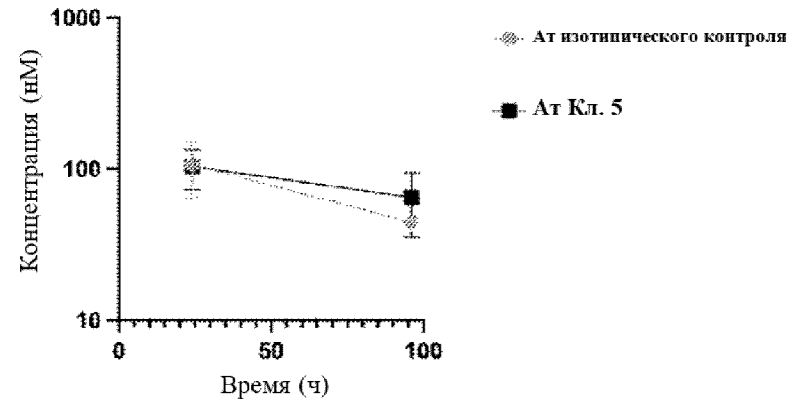
ФИГ. 12С
Концентрация IgG в плазме



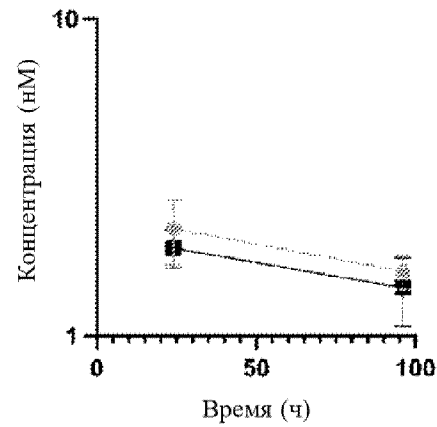
ФИГ. 12D
Концентрация IgG в печени



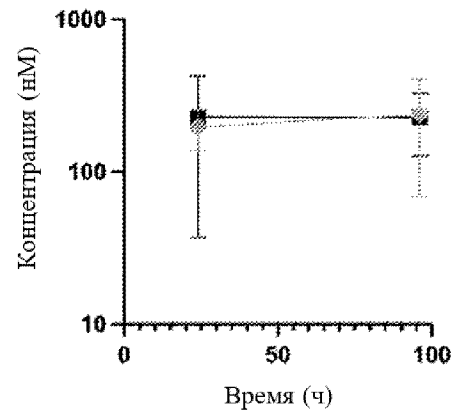
ФИГ. 12Е
Концентрация IgG в селезенке



ФИГ. 12F
Концентрация IgG в головном мозге



ФИГ. 12G
Концентрация IgG в легких



ФИГ. 12H
Концентрация IgG в костном мозге

