

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202091458 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.10.23

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/18* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.12.11

(54) АНТИ-TREM2 АНТИТЕЛА И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ СПОСОБЫ

(31) 62/597,827; 62/648,089

(72) Изобретатель:

(32) 2017.12.12; 2018.03.26

Штройли Михель, Срирам  
Венкатараман, Пал Аритра, Преста  
Леонард Г. (US)

(33) US

(86) PCT/US2018/065026

(87) WO 2019/118513 2019.06.20

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

ПАЙОНИР  
ИММУНОТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.  
(US)

Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,  
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О.,  
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,  
Льву Т.Н., Строкова О.В. (RU)

(57) В данном изобретении предлагаются антитела анти-TREM2 и связанные способы получения и применения антител анти-TREM2. Также предлагаются способы и композиции для усиления иммунного ответа и/или для лечения иммуноопосредованного патологического состояния у индивидуума, например рака, включающие уничтожение, деактивацию или деплетирование нестимулирующих миелоидных клеток с применением анти-TREM2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.



A1

202091458

202091458

A1

## АНТИ-TREM2 АНТИТЕЛА И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ СПОСОБЫ

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

5 Данная заявка заявляет приоритет по предварительным заявкам на патент США 62/597827, поданной 12 декабря 2017 года, и 62/648089, поданной 26 марта 2018 года, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме и для всех целей.

### Перечень последовательностей

10 Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен с помощью EFS-Web, и включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 17 января 2019 года, называется 41951WO\_CRF\_sequencelisting.txt, и ее размер составляет 53100 байт.

### Уровень техники

15 Иммунитет играет роль в предотвращении роста опухоли. Внутри поражения может развиваться сложная микросреда, и, несмотря на вовлечение Т-клеток, часто отсутствует эффективный контроль за развивающейся массой. Понимание баланса между элиминацией опухоли и уходом опухоли от иммунного ответа может основываться на понимании различных функций, которые характерны для миелоидных клеток в микроокружении опухоли.

20 Миелоидные популяции микроокружения опухоли в значительной степени включают моноциты и нейтрофилы (иногда условно выделяемые в группу миелоидных клеток-супрессоров), макрофаги и дендритные клетки. Несмотря на то, что внутриопухолевые миелоидные популяции в целом долгое время считались нестимулирующими или супрессивными, недавно стало понятно, что не все инфильтрирующие опухоль миелоидные клетки являются одинаковыми.

25 В нормальных тканях многие из этих миелоидных клеток необходимы для правильного функционирования как врожденного, так и приобретенного иммунитета и особенно для заживления ран. Однако при раке обычно описывается значительный избыток макрофагов и дисфункциональных или искаженных популяций этих и других типов клеток. При рассмотрении в качестве совокупной популяции, определяемой отдельными маркерами, такими как CD68 или CD163, «макрофагальная» инфильтрация коррелирует с худшими исходами у субъектов при  
30 многих типах опухолей ((de Visser, Cancer Immunol Immunother, 2008;57:1531–9); (Hanada et al., Int J Urol 2000;7:263–9); (Yao et al. Clin Cancer Res, 520, 2001;7:4021–6); (Ruffell et al., PNAS, 523 2012;109:2796–801)). Но группирование макрофагов из микроокружения опухоли в фенотипическое и функциональное подмножество осложняется сходством макрофагов и дендритных клеток и является проблематичным в биологии опухоли. Для разрешения этой проблемы часто применялся морфологический критерий; один из подходов, направленный на  
35 дифференцирование дендритных клеток от макрофагов, был основан на более шиповидной или

разветвлённой морфологии дендритных клеток и более сглаженной или выпуклой морфологии макрофагов (Bell et al., J Exp Med 555, 1999; 190: 1417–26), Другие подходы пытаются дифференцировать эти клетки на основе генетических и клеточных маркеров.

5 Существует разнообразие в антиген-презентирующем компартменте в опухолях, при этом Т-клетки могут дифференцировать признаки антигенпрезентирующих клеток (АРС). Поскольку Т-клетки являются основной движущей силой опухолевого иммунитета, понимание точных особенностей их родственных АРС будет иметь важное значение. Миелоидные клетки занимают видное место среди клеток, способных представлять антигены, происходящие из опухоли, Т-клеткам, и тем самым поддерживать последние в активированном состоянии. Презентация  
10 антигена происходит внутри самой опухоли и, вероятно, влияет на функции опухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL). Активация Т-клеток антигенпрезентирующими клетками (АРС) является важным компонентом антигенспецифических иммунных ответов и уничтожения опухолевых клеток. Поскольку эти миелоидные популяции представляют собой основных партнеров, взаимодействующих с Т-клетками, и антиген-презентирующие клетки для  
15 входящих опухолерепреактивных цитотоксических Т-лимфоцитов, понимание различий между ними может способствовать выбору лечебной тактики.

Родственные заявки на патент включают: РСТ/US2015/052682, поданную 28 сентября 2015 года; и РСТ/US2016/054104, поданную 28 сентября 2016 года.; каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме и для всех целей.

20 Все патенты, заявки на патенты, документы и статьи, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

В данном документе описано выделенное антитело, которое связывается с TREM2 человека (SEQ ID NO: 15) и конкурирует за связывание с TREM2 мыши (SEQ ID NO: 17) с антителом  
25 37017 ( SEQ ID NO: 31 и 32).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело содержит CDR-Н1, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 9, CDR-Н2, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 10, CDR-Н3, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 11, CDR-L1, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID  
30 NO: 12, CDR-L2, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 13, и CDR-L3, содержащую последовательность, описанную в SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело является афукозилированным и содержит последовательность VH, продемонстрированную в SEQ ID NO: 1; последовательность VL, продемонстрированную в SEQ ID NO: 2; и активную Fc-область IgG1  
35 человека.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антителио содержит все 3 CDR тяжелой цепи последовательности, продемонстрированной в SEQ ID NO: 7, и все 3 CDR легкой цепи последовательности, продемонстрированной в SEQ ID NO: 8.

5 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антителио содержит замену с А на Т в положении 97 последовательности, продемонстрированной в SEQ ID NO: 7; и замену с К на R в положении 98 последовательности, продемонстрированной в SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антителио содержит последовательность VH, продемонстрированную в SEQ ID NO: 1, 3 или 5.

10 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антителио содержит последовательность VH, продемонстрированную в SEQ ID NO: 1, 3 или 5, и последовательность VL, продемонстрированную в SEQ ID NO: 2, 4 или 6.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антителио содержит последовательность VH, продемонстрированную в SEQ ID NO: 1

15 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антителио содержит последовательность VH, продемонстрированную в SEQ ID NO: 1, и последовательность VL, продемонстрированную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антителио представляет собой антителио 37012.

20 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антителио содержит последовательность тяжелой цепи, продемонстрированную в SEQ ID NO: 25, и последовательность легкой цепи, продемонстрированную в SEQ ID NO: 26.

В другом аспекте данного документа описано выделенное антителио, которое связывается с TREM2 человека (SEQ ID NO: 15), при этом указанное антителио конкурирует за связывание с TREM2 мыши (SEQ ID NO: 17) с антителиом 37017 (SEQ ID NO: 31 и 32); и содержит активную  
25 Fc-область человека.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антителио является человеческим, гуманизированным или химерным антителиом.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антителио является гуманизированным.

30 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антителио связывается с TREM2 человека с  $K_D$ , меньшим или равным около 1, 2, 3, 4 или  $5 \times 10^{-9}$ , что измерено с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антителио способно специфически уничтожать, деплетировать или деактивировать TREM2+ миелоидные клетки;  
35 необязательно нестимулирующие миелоидные клетки.

- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело обладает антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксической (ADCC) активностью. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело обладает активностью индуцирования антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело обладает комплементзависимой цитотоксической активностью (CDC).
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело уничтожает, деактивирует или деплетирует миелоидные клетки посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), антитело-опосредованного клеточного фагоцитоза (ADCP) или комплементзависимой цитотоксичности (CDC).
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело представляет собой по меньшей мере одно из следующего: моноклональное антитело, нейтральное антитело, антагонистическое антитело, агонистическое антитело, поликлональное антитело, антитело IgG1, антитело IgG3, афукозилированное антитело, биспецифическое антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, полноразмерное антитело и его антигенсвязывающий фрагмент.
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело представляет собой моноклональное антитело.
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело является мультиспецифическим.
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело является афукозилированным.
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело представляет собой его антигенсвязывающий фрагмент, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, (scFv)<sub>2</sub>, молекулу одноцепочечного антитела, антитело с двойным переменным доменом, антитело с одним переменным доменом, линейное антитело или антитело с V-доменом.
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело содержит каркас, необязательно при этом указанный каркас представляет собой Fc, необязательно Fc человека.
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи класса, выбранного из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи класса IgG и подкласса, выбранного из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG1.

- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная Fc-область включает одну или большее количество модификаций, при этом одна или большее количество модификаций приводят к увеличению периода полужизни, повышенной ADCC-активности, повышенной ADCP-активности или повышенной CDC-активности по сравнению с Fc без одной или большего количества модификаций.
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная Fc-область связывает рецептор Fc $\gamma$ , выбранный из группы, состоящей из: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIIc, Fc $\gamma$ RIIIa и Fc $\gamma$ RIIIb.
- В другом аспекте данного документа описано выделенное антитело для применения при лечении рака, при этом рак выбирают из твердой опухоли и гематологической опухоли.
- В другом аспекте данного документа описано выделенное антитело, которое конкурирует за связывание с TREM2 человека с антителом, описанным в данном документе.
- В другом аспекте данного документа описано выделенное антитело, которое связывает эпитоп TREM2 человека, связанный антителом, описанным в данном документе.
- В другом аспекте данного документа описан выделенный полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующих антитело, описанное в данном документе, его V<sub>H</sub>, его V<sub>L</sub>, его легкую цепь, его тяжелую цепь или его антигенсвязывающую часть; необязательно кДНК.
- В другом аспекте данного документа описан вектор или набор векторов, включающих полинуклеотид или набор полинуклеотидов, описанных в данном документе.
- В другом аспекте данного документа описана выделенная клетка, содержащая полинуклеотид или набор полинуклеотидов, описанных в данном документе, или вектор, или набор векторов, описанных в данном документе.
- В другом аспекте данного документа описан способ получения антитела, включающий экспрессию указанного антитела с клеткой-хозяином, описанной в данном документе, и выделение экспрессированного антитела.
- В другом аспекте данного документа описана фармацевтическая композиция, содержащая антитело, описанное в данном документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.
- В другом аспекте данного документа описан способ лечения или профилактики заболевания или патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, описанных в данном документе.
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное заболевание или патологическое состояние представляет собой рак.
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело связывается с внеклеточным доменом TREM2 на TREM2+ миелоидных клетках, необязательно при этом

- миелоидные клетки являются внутриопухолевыми. В одном варианте осуществления данного изобретения указанное антитело связывается с внеклеточным доменом TREM2 на миелоидных клетках, при этом миелоидные клетки являются нестимулирующими миелоидными клетками, которые представляют собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup> и BDCA3<sup>-</sup>, при этом указанное
- 5 антитело уничтожает, деактивирует или деплетирует нестимулирующие миелоидные клетки посредством ADCC, CDC и/или ADCP до уровня, который является ниже уровня нестимулирующих миелоидных клеток, присутствующих в тканях рака до контакта нестимулирующих миелоидных клеток с указанным антителом, при этом нестимулирующие миелоидные клетки присутствуют в популяции иммунных клеток, включающей стимулирующие
- 10 миелоидные клетки, которые представляют собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>, BDCA1<sup>-</sup> и BDCA3<sup>+</sup> и нестимулирующие миелоидные клетки, и при этом посредством уничтожения, деактивации или деплетирования нестимулирующих миелоидных клеток лечат рак.
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело уничтожает, деактивирует или деплетирует миелоидные клетки посредством антителозависимой клеточно-
- 15 опосредованной цитотоксичности (ADCC), антитело-опосредованного клеточного фагоцитоза (ADCP) или комплементзависимой цитотоксичности (CDC). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело обладает активностью блокирования взаимодействия рецептор-лиганд, агонистической или антагонистической активностью.
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный субъект является
- 20 человеком. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный рак представляет собой твердую раковую опухоль. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах данного изобретения указанный рак выбирают из группы, состоящей из меланомы, карциномы почек, гепатобилиарной карциномы, плоскоклеточной карциномы области головы и шеи (HNSC), рака
- 25 поджелудочной железы, рака толстого кишечника, рака мочевого пузыря, глиобластомы, рака предстательной железы, рака легкого, рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, рака почек, рака мочевого пузыря, рака пищевода, почечного рака, меланомы и мезотелиомы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный рак представляет собой рак молочной железы.
- 30 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения приведение в контакт усиливает иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения усиленный иммунный ответ представляет собой приобретенный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.
- 35 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный субъект ранее получал, одновременно получает или впоследствии получит иммунотерапию. В некоторых вариантах

осуществления данного изобретения указанная иммунотерапия представляет собой по меньшей мере одно из следующих: ингибитор контрольной точки; ингибитор контрольной точки Т-клеток; антитело анти-PD1; антитело анти-PDL1; антитело анти-CTLA4; адоптивная Т-клеточная терапия; клеточная терапия CAR-T; вакцина из дендритных клеток; моноцитарная вакцина; 5 антигенсвязывающий белок, который связывает как Т-клетку, так и антигенпрезентирующую клетку; двойной антигенсвязывающий белок ViTE; лиганд Toll-подобного рецептора; цитокин; цитотоксическая терапия; химиотерапия; лучевая терапия; низкомолекулярный ингибитор; низкомолекулярный агонист; иммуномодулятор; и эпигенетический модулятор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная иммунотерапия представляет собой 10 антитело анти-PD1.

В другом аспекте данного документа описаны способы уничтожения, деактивации или деплетирования TREM2<sup>+</sup> миелоидных клеток субъекта, страдающего раком, включающие 15 приведение в контакт указанных миелоидных клеток с антителом анти-TREM2, описанным в данном документе, или фармацевтической композицией, описанной в данном документе, необязательно при этом указанные миелоидные клетки являются внутриопухолевыми.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело связывается с 20 внеклеточным доменом TREM2, при этом TREM2<sup>+</sup> миелоидные клетки являются нестимулирующими миелоидными клетками, которые представляют собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup> и BDCA3<sup>-</sup>, при этом указанное антитело уничтожает, деактивирует или деплетировывает нестимулирующие миелоидные клетки посредством ADCC, CDC и/или ADCP до 25 уровня, который является ниже уровня нестимулирующих миелоидных клеток, присутствующих в тканях рака до контакта нестимулирующих миелоидных клеток с указанным антителом, при этом нестимулирующие миелоидные клетки присутствуют в популяции иммунных клеток, включающей стимулирующие миелоидные клетки, которые представляют собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>, BDCA1<sup>+</sup> и BDCA3<sup>+</sup> и нестимулирующие миелоидные клетки, и при этом 30 приведение в контакт по существу не уничтожает, не деактивирует или не деплетировывает миелоидные клетки, присутствующие вне ткани рака, и/или стимулирующие миелоидные клетки, присутствующие в ткани рака, и при этом посредством уничтожения, деактивации или деплетирования нестимулирующих миелоидных клеток лечат рак путем усиления противоракового иммунного ответа.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело уничтожает миелоидные клетки по меньшей мере посредством одного из следующих механизмов: ADCC, CDC и ADCP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело 35 деактивирует миелоидные клетки по меньшей мере посредством одного из следующих механизмов: ADCC, CDC и ADCP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело деплетировывает миелоидные клетки по меньшей мере посредством одного из

следующих механизмов: ADCC, CDC и ADCP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело обладает антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксической (ADCC) активностью. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело обладает комплементзависимой цитотоксической активностью (CDC). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело обладает антителоопосредованной фагоцитарной активностью (ADCP). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело обладает активностью блокирования взаимодействия рецептор-лиганд, агонистической или антагонистической активностью.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные миелоидные клетки являются стимулирующими миелоидными клетками. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные миелоидные клетки являются нестимулирующими миелоидными клетками. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные миелоидные клетки включают по меньшей мере один из следующих типов клеток: дендритные клетки, ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM), нейтрофилы или моноциты. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные миелоидные клетки представляют собой нейтрофилы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные миелоидные клетки представляют собой макрофаги, ассоциированные с опухолью. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные миелоидные клетки являются внутриопухолевыми. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, включающей стимулирующие миелоидные клетки и нестимулирующие миелоидные клетки.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный рак представляет собой твердую раковую опухоль. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах данного изобретения указанный рак выбирают из группы, состоящей из меланомы, карциномы почек, гепатобилиарной карциномы, плоскоклеточной карциномы области головы и шеи (HNSC), рака поджелудочной железы, рака толстого кишечника, рака мочевого пузыря, глиобластомы, рака предстательной железы, рака легкого, рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, рака почек, рака мочевого пузыря, рака пищевода, почечного рака, меланомы и мезотелиомы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный рак представляет собой рак молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения приведение в контакт усиливает иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения усиленный иммунный ответ представляет собой приобретенный иммунный ответ. В некоторых

вариантах осуществления данного изобретения усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный субъект ранее получал, одновременно получает или впоследствии получит иммунотерапию. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная иммунотерапия представляет собой по меньшей мере одно из следующих: ингибитор контрольной точки; ингибитор контрольной точки Т-клеток; антитело анти-PD1; антитело анти-PDL1; антитело анти-CTLA4; адоптивная Т-клеточная терапия; клеточная терапия CAR-T; вакцина из дендритных клеток; моноцитарная вакцина; антигенсвязывающий белок, который связывает как Т-клетку, так и антигенпрезентирующую клетку; двойной антигенсвязывающий белок ViTE; лиганд Toll-подобного рецептора; цитокин; цитотоксическая терапия; химиотерапия; лучевая терапия; низкомолекулярный ингибитор; низкомолекулярный агонист; иммуномодулятор; и эпигенетический модулятор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная иммунотерапия представляет собой антитело анти-PD1.

В другом аспекте данного документа описан способ обнаружения TREM2 у субъекта, имеющего или подозреваемого на наличие заболевания или патологического состояния, при этом указанный способ включает: (а) получение образца от субъекта; и (b) обнаружение присутствия или уровня TF в образце путем приведения в контакт образца с антителом, описанным в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное заболевание или патологическое состояние представляет собой рак.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения способ, описанный в данном документе, включает введение ингибитора контрольной точки, необязательно при этом ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор оси PD1:PDL1, необязательно при этом ингибитор представляет собой антитело, и необязательно при этом антитело представляет собой антитело анти-PD1 или антитело анти-PDL1.

В другом аспекте данного документа описан набор, содержащий антитело или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, и инструкции по применению.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**Фиг. 1А-С.** Анти-TREM2 PI-7012-опосредованная противоопухолевая активность в комбинации с анти-PD-1 в модели сингенной опухоли СТ-26 мыши. **(А)** Афукозилирование PI-7012 усиливает противоопухолевую активность в комбинации с анти-PD-1. Продемонстрированы средние объемы опухолей (10 мышей на группу). **(В)** Продемонстрированы объемы отдельных опухолей для PI-7012 и **(С)** афукозилированного-PI-7012 (afuc-PI-7012).

**Фиг. 2** Значительного снижения веса тела при комбинированном лечении не наблюдается. Десятью мышам в каждой группе вводили указанные антитела, при этом с частыми интервалами

регистрировали вес тела. Средний вес тела для каждой группы наносили на график в зависимости от дней исследования.

**Фиг. 3.** В дополнение к окрашиванию H&E, ткани также окрашивали с применением анти-CD68 на предмет обнаружения макрофагов. Внутриклеточный маркер CD68 широко описан в литературе как надежный цитохимический маркер для иммуноокрашивания моноцитов/макрофагов в воспаленных тканях и опухолях. В легком (панель E), а также в других проанализированных тканях не было обнаружено заметного изменения числа CD68+ макрофагов ни в одной из групп лечения по сравнению с контролем, что указывает на то, что анти-TREM2-опосредованное деплетирование происходило именно в TME.

**Фиг. 4A-B.** (A) Анти-CD68 окрашивание образцов ткани легких FFPE из указанных групп лечения. (B) Восемь-девять полей каждого среза использовали для количественной оценки с помощью световой микроскопии.

**Фиг. 5.** Экспрессия TREM2 отсутствовала или характеризовалась очень низким уровнем на клетках в выбранных тканях. Затусованные гистограммы - от TREM2KO и незатусованные гистограммы - от мышей дикого типа. Антитело, применяемое для анти-TREM2 окрашивания, представляло собой клон 237920 от R&D Systems.

**Фиг. 6.** Уровень экспрессии TREM2 на клеточной поверхности (незатусованная гистограмма) отмечался значительно выше на TAM по сравнению с гранулоцитарными или моноцитарными MDSC в опухолях как MC38, так и CT26. Лимфоциты не экспрессировали TREM2. Окрашивание изотипическим контролем показано серой гистограммой.

**Фиг. 7.** Уровень экспрессии TREM2 на клеточной поверхности (незатусованная гистограмма) отмечался значительно выше на CD14-производных макрофагах по сравнению с любым подмножеством МКПК. МКПК или макрофаги человека окрашивали либо для выявления TREM2 на клеточной поверхности (незатусованная гистограмма), либо для изотипического контроля (серая гистограмма). Подмножества МКПК были идентифицированы как нейтрофилы, моноциты или Т-клетки с помощью предварительно валидированной многоцветной панели FACS.

**Фиг. 8.** Уровень экспрессии TREM2 на клеточной поверхности (незатусованная гистограмма) отмечался значительно выше на TAM по сравнению с другими инфильтратами или не-CD45-положительными клетками. МКПК или макрофаги человека окрашивали либо для выявления TREM2 на клеточной поверхности (незатусованная гистограмма), либо для изотипического контроля (серая гистограмма). Иммунные и неиммунные подмножества были идентифицированы с помощью предварительно валидированной многоцветной панели FACS.

**Фиг. 9A-F.** Анти-TREM2 mAb afuc-PI7012 в комбинации анти-PD-1 mAb приводило к значительной противоопухолевой активности в модели опухоли поджелудочной железы Panc-02. (A) Объемы опухолей отслеживали в динамике у самок мышей C57BL/6J, которым

имплантировали опухолевые клетки Рапс-02 и которым вводили указанные mAb. Ось Y представляет среднее +/- стандартное отклонение средних объемов опухолей 10 мышей в каждой группе. (B) Объемы опухолей от отдельных животных, которые получали mAb изотипического контроля. (C) Объемы опухолей от отдельных животных, которые получали анти-TREM2 mAb afuc-PI7012. (D) Объемы опухолей от отдельных животных, которые получали анти-PD-1. (E) Объемы опухолей от отдельных животных, которые получали анти-TREM2 mAb afuc-PI7012 и анти-PD-1. (F) Статистический анализ средне группового объема опухоли в День 32 после имплантации для каждой группы лечения.

**Фиг. 10.** Мышам BALB/c без опухоли после введения анти-TREM2 mAb плюс анти-PD-1 mAb повторно имплантировали через три месяца опухолевые клетки CT26 (квадратные символы). Соответствующим по возрасту мышам, не получавшим лечения (круглые символы), вводили эквивалентное количество клеток CT26 и отслеживали рост опухоли в течение периода исследования. В течение периода исследования мыши не получали какого-либо дополнительного лечения.

## 15 **Подробное описание сущности изобретения**

### **Определения**

Для целей пояснения в этом описании, будут применяться следующие определения и там, где это уместно, термины, применяемые в единственном числе будут также включать в себя множественное число и наоборот. В том случае, когда любое определение, представленное ниже, вступает в конфликт с любым документом, вводимым в данное описание путем ссылки, представленное ниже определение является главным.

Следует понимать, что аспекты и варианты осуществления изобретения, описанные в данном документе, включают "содержащие", "состоящие" и "состоящие по существу из" аспекты и варианты осуществления.

Для всех композиций, описанных в данном документе, и для всех способов, в которых применяется композиция, описанная в данном документе, указанные композиции могут либо содержать перечисленные компоненты или этапы, либо могут "состоять по существу из" перечисленных компонентов или этапов. Когда композиция описывается как "состоящая по существу из" перечисленных компонентов, она содержит перечисленные компоненты и может содержать другие компоненты, которые не оказывают существенного влияния на патологическое состояние, подлежащее лечению, но не содержать никаких других компонентов, которые существенно влияют на патологическое состояние, подлежащее лечению, кроме тех, которые явным образом перечислены; или, если указанная композиция содержит дополнительные компоненты, отличные от перечисленных, которые существенно влияют на патологическое состояние, подлежащее лечению, указанная композиция не содержит

достаточную концентрацию или количество дополнительных компонентов, чтобы существенно влиять на патологическое состояние, подлежащее лечению. Когда способ описывается как "состоящий по существу из" перечисленных этапов, он содержит перечисленные этапы и может содержать другие этапы, которые не оказывают существенного влияния на патологическое состояние, подлежащее лечению, но указанный способ не включает никаких других этапов, которые существенно влияют на патологическое состояние, подлежащее лечению, кроме тех, которые явным образом перечислены. В качестве неограничивающего конкретного примера, когда композиция описывается как "состоящая по существу из" компонента, указанная композиция может дополнительно содержать любое количество фармацевтически приемлемых носителей, несущих сред или разбавителей и других таких компонентов, которые существенно не влияют на патологическое состояние, подлежащее лечению.

Термин "необязательно" означает, когда он применяется последовательно, включение от одной до всех перечисленных комбинаций и предусматривает все подкомбинации.

"Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" в контексте данного описания относится к количеству терапевтического соединения, такого как антигенсвязывающий агент анти-TREM2 или антитело анти-TREM2, которое вводят индивидууму либо в виде одной дозы, либо в виде части серии доз, которые являются эффективными для получения или содействия получению желаемого терапевтического эффекта при применении либо отдельно, либо в комбинации с другим лечебным воздействием.

Примерами желаемого терапевтического эффекта являются усиление иммунного ответа, замедление или задержка развития опухоли; стабилизация заболевания; ослабление одного или большего количества симптомов. Эффективное количество может быть введено в одной или большем количестве доз.

В данном контексте термин "лечение" относится к замедлению или регрессированию развития патологического состояния, такого как рак. В данном контексте термин "лечение" относится к акту лечения патологического состояния, такого как рак.

В данном контексте термин "индивидуум" или "субъект" относится к любому животному, классифицированному как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных зоопарка, спортивных или домашних животных, таких как собаки, лошади, кролики, крупный рогатый скот, свиньи, хомяки, песчанки, мыши, хорьки, крысы, кошки и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения индивидуум представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения индивидуум представляет собой мышь.

Термины "модулировать" и "модуляция" относятся к уменьшению или ингибированию или, в альтернативном варианте, активации или увеличению указанной переменной.

Термины "увеличивать" и "активировать" относятся к увеличению указанной переменной на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 50 раз, в 100 раз или более.

5 Термины "уменьшать" и "ингибировать" относятся к снижению указанной переменной на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 50 раз, в 100 раз или более.

Термин "агонизировать" относится к активации сигналинга рецептора для индукции биологического ответа, ассоциированного с активацией рецептора. "Агонист" представляет собой вещество, которое связывается и агонизирует рецептор.

10 Термин "антагонизировать" относится к ингибированию сигналинга рецептора для ингибирования биологического ответа, ассоциированного с активацией рецептора. "Антагонист" представляет собой вещество, которое связывается и антагонизирует рецептор.

В данном контексте термин "около" относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известному специалисту в данной области техники.

15 Типовой диапазон ошибок составляет плюс или минус 5%. Ссылка на "около" значения или параметра включает в себя (и описывает) варианты осуществления изобретения по данному документу, которые направлены на это значение или параметр как таковой.

Следует отметить, что, при применении в данном описании и приложенной формуле изобретения единственное число включает ссылку на множественное число, если из контекста

20 очевидно не следует иное.

Для любой из структурных и функциональных характеристик, описанных в данном документе, способы определения этих характеристик известны в данной области техники.

## **Антитела**

### **Структура**

25 В данной заявке предлагаются антитела и композиции, содержащие антитело, которое связывает белок TREM2, включая антитела, которые деактивируют нестимулирующие миелоидные клетки.

В данном контексте термин "антитело" применяется в самом широком смысле и включает определенные типы молекул иммуноглобулина, включающие один или большее количество антигенсвязывающих доменов, которые специфически связываются с антигеном или эпитопом.

30 Антитело, в частности, включает интактные антитела (например, интактные иммуноглобулины), фрагменты антител и мультиспецифические антитела.

Все распознаваемые гены иммуноглобулинов включают каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эpsilon и мю константные области генов, а также множество генов варибельной области иммуноглобулина. Легкие цепи классифицируют как каппа или лямбда. "Класс" антитела или

35 иммуноглобулина относится к типу константного домена или константной области,

содержащихся в его тяжелой цепи. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них дополнительно делятся на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ , соответственно.

- 5 Структурная единица типового иммуноглобулина (антитела) состоит из двух пар полипептидных цепей, при этом каждая пара имеет одну "лёгкую" (около 25 кДа) и одну "тяжёлую" цепь (около 50-70 кДа). N-концевой домен каждой цепи определяет переменную область, состоящую из около 100-110 или большего количества аминокислот главным образом отвечающих за распознавание антигена. Термины переменная область легкой цепи (VL) и
- 10 переменная область тяжелой цепи (VH) относятся к этим доменам легкой и тяжелой цепей, соответственно. Тяжёлая цепь IgG1 состоит из доменов VH, CH1, CH2 и CH3, соответственно, от N- к C-концу. Лёгкая цепь состоит из доменов VL и CL от N- к C-концу. Тяжёлая цепь IgG1 содержит шарнир между доменами CH1 и CH2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения конструкции иммуноглобулина содержат по меньшей мере один домен
- 15 иммуноглобулина из IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, связанный с терапевтическим полипептидом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения домен иммуноглобулина, содержащийся в антителе, представленном в данном документе, происходит от конструкции на основе иммуноглобулина, такой как диатело, или нанотело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения конструкции иммуноглобулина, описанные в данном
- 20 документе, содержат по меньшей мере один домен иммуноглобулина из тяжелой цепи антитела, такого как верблюжье антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения конструкции иммуноглобулина, представленные в данном документе, содержат по меньшей мере один домен иммуноглобулина из антитела млекопитающего, такого как бычье антитело, антитело человека, верблюжье антитело, антитело мыши или любое химерное антитело.
- 25 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела, представленные в данном документе, содержат тяжелую цепь. В одном варианте осуществления данного изобретения тяжелая цепь представляет собой IgA. В одном варианте осуществления данного изобретения тяжелая цепь представляет собой IgD. В одном варианте осуществления данного изобретения тяжелая цепь представляет собой IgE. В одном варианте осуществления данного изобретения
- 30 тяжелая цепь представляет собой IgG. В одном варианте осуществления данного изобретения тяжелая цепь представляет собой IgM. В одном варианте осуществления данного изобретения тяжелая цепь представляет собой IgG1. В одном варианте осуществления данного изобретения тяжелая цепь представляет собой IgG2. В одном варианте осуществления данного изобретения тяжелая цепь представляет собой IgG3. В одном варианте осуществления данного изобретения
- 35 тяжелая цепь представляет собой IgG4. В одном варианте осуществления данного изобретения

тяжелая цепь представляет собой IgA1. В одном варианте осуществления данного изобретения тяжелая цепь представляет собой IgA2.

В данном контексте термин "гипервариабельная область" или "HVR" относится к каждой из областей переменного домена антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности и/или образуют структурно определенные петли ("гипервариабельные петли"). Как правило, антитела содержат шесть HVR: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). HVR, как правило, содержат аминокислотные остатки из гипервариабельных петель и/или из областей, определяющих комплементарность (CDR), при этом последние характеризуются самой высокой вариабельностью последовательностей и/или вовлечены в распознавание антигена. За исключением CDR1 в VH, CDR, как правило, содержат аминокислотные остатки, которые формируют гипервариабельные петли. Гипервариабельные области (HVR) также называются "областями, определяющими комплементарность" (CDR), и эти термины применяются в данном документе взаимозаменяемо в отношении участков вариабельной области, которые формируют антигенсвязывающие области. Эта конкретная область была описана в публикациях Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) и Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987), где определения включают перекрывающиеся или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Несмотря на это, предполагается, что определение термина, применяемого в данном документе для обозначения CDR антитела или его вариантов, охватывает применение любого из этих определений. Точное число остатков, которые входят в состав конкретной CDR, будет зависеть от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники могут стандартным способом определить какие остатки содержатся в конкретной CDR, если известна вариабельная область аминокислотной последовательности антитела.

Границы аминокислотной последовательности CDR могут быть определены специалистом в данной области техники с помощью любой из ряда известных схем нумерации, в том числе описанных Kabat et al., *выше* (схема нумерации "Кабата"); Al-Lazikani et al., 1997, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948 (схема нумерации "Чотиа"); MacCallum et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (схема нумерации "Контакт"); Lefranc et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 2003, 27: 55-77 (схема нумерации "IMGT"); а также Honegge and Plückthun, *J. Mol. Biol.*, 2001, 309: 657-70 (схема нумерации "АНо"); каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В таблице А приведены положения CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, которые определены согласно схем Кабата и Чотиа. Для CDR-H1, нумерация остатков осуществляется с применением схем нумерации Кабата и Чотиа.

CDR могут быть заданы, например, с помощью программного обеспечения для нумерации антител, такого как Abnum, доступного по адресу [www.bioinf.org.uk/abs/abnum/](http://www.bioinf.org.uk/abs/abnum/) и описанного в

публикации Abhinandan and Martin, *Immunology*, 2008, 45: 3832-3839, включенной в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

**Таблица А. Остатки в CDR согласно схемам нумерации Кабата и Чотиа.**

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

\* С-конец CDR-H1 при нумерации согласно соглашению о нумерации по Кабату варьируется от H32 до H34, в зависимости от длины CDR.

Как правило, когда речь идет об остатке в константной области тяжелой цепи антитела (например, как описано в публикации Kabat et al., *выше*), применяется "система нумерации EU". Если не указано иное, схема нумерации EU используется для обозначения остатков в константных областях тяжелой цепи антитела, описанных в данном документе.

В данном контексте термин "одноцепочечный" относится к молекуле, содержащей аминокислотные мономеры, линейно связанные пептидными связями. В конкретном таком варианте осуществления данного изобретения С-конец легкой цепи Fab связан с N-концом тяжелой цепи Fab в одноцепочечной молекуле Fab. Как описано более подробно в данном документе, scFv имеет переменный домен легкой цепи (VL), связанный своим С-концом с N-концом переменного домена тяжелой цепи (VH) с помощью полипептидной цепи. В альтернативном варианте scFv включает полипептидную цепь, при этом С-конец VH соединен с N-концом VL с помощью полипептидной цепи.

“Fab-фрагмент” (также называемый антигенсвязывающим фрагментом) содержит константный домен (CL) легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи наряду с переменными доменами VL и VH, находящимися в легкой и тяжелой цепях, соответственно. Переменные домены содержат петли, определяющие комплементарность (CDR, также называемая гиперпеременной областью), которые вовлечены в процесс связывания антигена. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов по дополнительным нескольким остаткам на карбоксильном конце домена CH1 тяжелой цепи, включая один или большее количество цистеинов из шарнирной области антитела.

"F(ab')<sub>2</sub>"-фрагменты содержат два Fab'-фрагмента, соединенных вблизи шарнирной области с помощью дисульфидных связей. F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты могут быть получены, например, с помощью рекомбинантных методов или расщепления интактного антитела пепсином. F(ab')-фрагменты могут быть диссоциированы, например, с помощью обработки β-меркаптоэтанолом.

5 "Fv" -фрагменты содержат нековалентно связанный димер одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи.

"Одноцепочечный Fv" или "scFv" включает домены VH и VL антитела, при этом эти домены содержатся в одной полипептидной цепи. В одном варианте осуществления данного изобретения полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL,  
10 который позволяет scFv образовывать желательную структуру для связывания антигена. Для обзора scFv, см. публикацию Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Фрагменты scFv антитела анти-HER2 описаны в WO 93/16185; в Патенте США № 5571894; и в Патенте США № 5587458.

15 Фрагменты "scFv-Fc" содержат scFv, присоединенный к домену Fc. Например, домен Fc может быть присоединен к С-концу scFv. Домен Fc может следовать за VH или VL, в зависимости от ориентации переменных доменов в scFv (то есть VH-VL или VL-VH). Можно применять любой пригодный домен Fc, известный в данной области техники или описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения домен Fc содержит домен IgG4 Fc.

20 Термин "однодоменное антитело" или "sdAb" относится к молекуле, в которой один переменный домен антитела специфически связывается с антигеном без наличия другого переменного домена. Однодоменные антитела и их фрагменты описаны в публикациях Arabi Ghahroudi et al., *FEBS Letters*, 1998, 414: 521-526 и Muyldermans et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 2001, 26:230-245, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном  
25 объеме. Однодоменные антитела также известны как sdAb или нанотела. Sdab являются довольно стабильными и без труда экспрессируются как партнеры по слиянию с Fc-цепью антитела (Harmsen MM, De Haard HJ (2007). "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments". *Appl. Microbiol Biotechnol.* 77(1): 13-22).

В данном контексте термины "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "целое  
30 антитело" применяются взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, по существу сходную со структурой встречающегося в природе антитела, и имеющего тяжелые цепи, которые содержат Fc-область. Например, при применении для обозначения молекулы IgG, "полноразмерное антитело" представляет собой антитело, которое содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи.

35 Термин "эпитоп" относится к части антигена, с которой специфически связывается антитело. Эпитопы часто состоят из поверхностно доступных аминокислотных остатков и/или боковых

цепей сахара и могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различают по факту отсутствия связывания с конформационными, но не с неконформационными эпитопами, в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать

5 аминокислотные остатки, которые непосредственно участвуют в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании. Эпитоп, с которым связывается антитело, может быть определен с помощью известных методик определения эпитопа, таких как, например, тестирование на связывание антитела с вариантами

10 TREM2 с различными точечными мутациями или с химерными вариантами TREM2.

"Мультиспецифическое антитело" представляет собой антитело, которое содержит два или большее количество разных антигенсвязывающих доменов, которые совместно специфически связывают два или большее количество разных эпитопов. Два или большее количество разных эпитопов могут быть эпитопами на одном и том же антигене (например, на одной молекуле

15 TREM2, экспрессируемой клеткой) или на разных антигенах (например, на разных молекулах TREM2, экспрессируемых одной и той же клеткой, или на молекуле TREM2 и на молекуле не-TREM2). В некоторых аспектах мультиспецифическое антитело связывает два разных эпитопа (то есть является "биспецифическим антителом"). В некоторых аспектах мультиспецифическое антитело связывает три разных эпитопа (то есть является "триспецифическим антителом").

"Моноспецифическое антитело" представляет собой антитело, которое содержит один или

20 большее количество сайтов связывания, которые специфически связываются с одним эпитопом. Примером моноспецифического антитела является встречающаяся в природе молекула IgG, которая, будучи двухвалентной (то есть имеющей два антигенсвязывающих домена), распознает один и тот же эпитоп в каждом из двух антигенсвязывающих доменов. Специфичность связывания может присутствовать в любой пригодной валентности.

25 Термин "моноклональное антитело" представляет собой антитело, полученное из популяции по существу гомогенных антител. Популяция по существу гомогенных антител включает антитела, которые по существу являются сходными и которые связывают один и тот же эпитоп(ы), за исключением вариантов, которые обычно могут возникать во время продуцирования моноклонального антитела. Такие варианты обычно присутствуют в незначительных

30 количествах. Моноклональное антитело обычно получают способом, который включает отбор одного антитела из множества антител. Например, процесс отбора может представлять собой отбор уникального клона из множества клонов, например, пула гибридных клонов, фаговых клонов, дрожжевых клонов, бактериальных клонов или других клонов рекомбинантных ДНК. Выбранное антитело можно дополнительно изменить, например, для улучшения аффинности к

35 мишени ("созревание аффинности"), гуманизации антитела, повышения его продукции в культуре клеток и/или снижения его иммуногенности у субъекта.

"Эффекторные функции" относятся к тем биологическим активностям, которые опосредуются Fc-областью антитела, причем эти активности могут варьироваться в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают связывание C1q для активации комплементзависимой цитотоксичности (CDC), связывание с рецептором Fc для активации антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), блокирования лигандов рецептора, агонизма или антагонизма.

Антитела анти-TREM2 могут включать антитела, описанные в данном документе, такие как клоны, представленные в таблицах. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело содержит альтернативный каркас. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело состоит из альтернативного каркаса. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело состоит по существу из альтернативного каркаса. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело содержит фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело состоит из фрагмента антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело состоит по существу из фрагмента антитела. "Антитело к TREM2", "антитело анти-TREM2" или "специфичное к TREM2 антитело" представляет собой антитело, описанное в данном документе, которое специфически связывается с антигеном TREM2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело связывается с внеклеточным доменом TREM2. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело к TREM2, описанное в данном документе, связывается с эпитопом TREM2, который является консервативным между или среди белков TREM2 из разных видов.

Термин "химерное" антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из определенного источника или вида, тогда как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из другого источника или вида.

"Гуманизированные" формы нечеловеческих антител (например, грызуна) представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. Гуманизированное антитело, как правило, представляет собой антитело человека (реципиентное антитело), в котором остатки от одной или большего количества CDR заменены остатками от одной или большего количества CDR нечеловеческого антитела (донорное антитело). Донорное антитело может представлять собой любое пригодное нечеловеческое антитело, такое как антитело мыши, крысы, кролика, цыпленка или примата, не являющегося человеком, обладающее желаемой специфичностью, аффинностью или биологическим эффектом. Гуманизированное антитело с меньшей вероятностью индуцирует иммунный ответ и/или индуцирует менее сильный иммунный ответ по сравнению с антителом нечеловеческого происхождения, когда его вводят человеку. В некоторых случаях выбранные

остатки каркасной области реципиентного антитела заменяются соответствующими остатками каркасной области донорного антитела. Гуманизированные антитела могут также содержать остатки, отсутствующие в реципиентном антителе или в донорном антителе. Такие модификации могут быть осуществлены для дополнительного улучшения функции антител. Примеры того, как сделать гуманизированные антитела, можно найти в патентах США №№ 6054297, 5886152 и 5877293, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Дополнительную информацию см., например, в публикациях Jones et al., *Nature*, 1986, 321:522-525; Riechmann et al., *Nature*, 1988, 332:323-329; и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, 2:593-596, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

10 В другом варианте осуществления данного изобретения константный домен(ы) из антитела человека сливаются с переменным доменом(ами) нечеловеческого происхождения. В другом варианте осуществления данного изобретения один или большее количество аминокислотных остатков в одной или большем количестве последовательностей CDR нечеловеческого антитела, изменяют для снижения вероятной иммуногенности нечеловеческого антитела, когда его вводят

15 человеку, при этом измененные аминокислотные остатки либо не являются критическими для иммуноспецифического связывания указанного антитела с его антигеном, либо внесенные изменения в аминокислотную последовательность являются консервативными изменениями, так что связывание гуманизированного антитела с антигеном не является значительно слабее, чем связывание нечеловеческого антитела с антигеном.

20 "Антитело человека" представляет собой антитело, которое обладает аминокислотной последовательностью, соответствующей последовательности антитела, продуцируемого человеком или клеткой человека, или полученного из нечеловеческого источника, который использует репертуар антител человека или последовательности, кодирующие антитело человека (например, полученные из человеческих источников) или разработано *de novo*).

25 Антитела человека специфически исключают гуманизированные антитела. В одном варианте осуществления данного изобретения все переменные и константные домены получены из последовательностей иммуноглобулина человека (полностью человеческое антитело). Эти антитела могут быть получены различными способами, в том числе путем иммунизации антигеном мыши, представляющим интерес, который генетически модифицирован для

30 экспрессии антител, полученных из генов человека, кодирующих тяжелые и/или легкие цепи. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложенные в данном описании антитела содержат фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложенные в данном описании антитела состоят из фрагмента антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложенные в данном описании антитела состоят по существу из фрагмента антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный фрагмент антитела представляет собой Fv- фрагмент. В

35

некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный фрагмент антитела представляет собой Fab-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный фрагмент антитела представляет собой  $F(ab')_2$  - фрагмент. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный фрагмент антитела представляет собой Fab' - фрагмент. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный фрагмент антитела представляет собой scFv (sFv)-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный фрагмент антитела представляет собой scFv-Fc-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный фрагмент антитела представляет собой фрагмент однодоменного антитела.

## 10                    **Последовательности антител к TREM2**

### **Домены            $V_H$**

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит последовательность  $V_H$ , выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит последовательность  $V_H$  из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит последовательность  $V_H$  из SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит последовательность  $V_H$  из SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит последовательность  $V_H$  из SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит последовательность  $V_H$ , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичности с иллюстративной последовательностью  $V_H$ , представленной в SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит последовательность  $V_H$ , представленную в SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела, описанные в этом параграфе, упоминаются в данном документе как "варианты". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты получены из последовательности, описанной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любым другим способом, известным в данной области техники или описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты не являются производными от последовательности, представленной

в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* в соответствии со способами, описанными в данном документе для получения антител.

### Домены $V_L$

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит последовательность  $V_L$ , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичности с иллюстративной последовательностью  $V_L$ , представленной в SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит последовательность  $V_L$ , представленную в SEQ ID NO: 2, 4, 6, и 8, с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела, описанные в этом параграфе, упоминаются в данном документе как "варианты". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты получены из последовательности, описанной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любым другим способом, известным в данной области техники или описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* в соответствии со способами, описанными в данном документе для получения антител.

### 30 Комбинации $V_H$ - $V_L$

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит последовательность  $V_H$ , выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7; и последовательность  $V_L$ , выбранную из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит последовательность  $V_H$  из SEQ ID NO: 1 и последовательность  $V_L$  SEQ ID

NO: 2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит последовательность  $V_H$  из SEQ ID NO: 3 и последовательность  $V_L$  из SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит последовательность  $V_H$  из SEQ ID NO: 5 и последовательность  $V_L$  из SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит последовательность  $V_H$  из SEQ ID NO: 7 и последовательность  $V_L$  из SEQ ID NO: 8. В определенных аспектах любую из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7 можно комбинировать с любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. Например, SEQ ID NO: 1 можно комбинировать с любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6 или 8. В качестве другого примера, SEQ ID NO: 2 можно комбинировать с любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 7.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит последовательность  $V_H$ , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичности с иллюстративной последовательностью  $V_H$ , представленной в SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7; и последовательность  $V_L$ , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичности с иллюстративной последовательностью  $V_L$ , представленной в SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит последовательность  $V_H$ , представленную в SEQ ID NO: 1, 3, 5, и 7, с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25, и последовательность  $V_L$ , представленную в SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8, с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела, описанные в этом параграфе, упоминаются в данном документе как "варианты". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты получены из последовательности, описанной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любым другим способом, известным в данной области техники или описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* в соответствии со способами, описанными в данном документе для получения антител.

### CDR

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит от одной до трех CDR домена  $V_H$  выбранного из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7. В

- некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит от двух до трех CDR домена V<sub>H</sub>, выбранного из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит три CDR домена V<sub>H</sub>, выбранного из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7. В некоторых
- 5 аспектах указанные CDR являются типовыми CDR. В некоторых аспектах указанные CDR представляют собой CDR по Кабату. В некоторых аспектах указанные CDR представляют собой CDR по Чотиа. В некоторых аспектах указанные CDR представляют собой AbM CDR. В некоторых аспектах указанные CDR представляют собой Contact CDR. В некоторых аспектах указанные CDR представляют собой IMGT CDR.
- 10 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные CDR представляют собой CDR, имеющие по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3 из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7. В некоторых вариантах данного изобретения указанная CDR-H1 представляет собой CDR-H1 домена V<sub>H</sub>, выбранного из SEQ ID
- 15 NO: 1, 3, 5 и 7, с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная CDR-H2 представляет собой CDR-H2 домена V<sub>H</sub>, выбранного из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная CDR-H3 представляет собой CDR-H3 домена V<sub>H</sub>, выбранного из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых аспектах
- 20 аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела, описанные в этом параграфе, упоминаются в данном документе как "варианты". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты получены из последовательности, описанной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного
- 25 мутагенеза, случайного мутагенеза или любым другим способом, известным в данной области техники или описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены de novo в соответствии со способами, описанными в данном документе для получения антител.
- 30 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит от одной до трех CDR домена V<sub>L</sub>, выбранного из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит от двух до трех CDR домена V<sub>L</sub>, выбранного из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном
- 35 документе, содержит три CDR домена V<sub>L</sub>, выбранного из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых аспектах указанные CDR являются типовыми CDR. В некоторых аспектах указанные CDR

представляют собой CDR по Кабату. В некоторых аспектах указанные CDR представляют собой CDR по Чотиа. В некоторых аспектах указанные CDR представляют собой AbM CDR. В некоторых аспектах указанные CDR представляют собой Contact CDR. В некоторых аспектах указанные CDR представляют собой IMGT CDR.

- 5 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные CDR представляют собой CDR, имеющие по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3 из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых вариантах данного изобретения указанная CDR-L1 представляет собой CDR-L1 домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8, с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых
- 10 вариантах осуществления данного изобретения указанная CDR-L2 представляет собой CDR-L2 домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8, с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная CDR-L3 представляет собой CDR-L3 домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8, с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых аспектах
- 15 аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела, описанные в этом параграфе, упоминаются в данном документе как "варианты". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты получены из последовательности, описанной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного
- 20 мутагенеза, случайного мутагенеза или любым другим способом, известным в данной области техники или описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены de novo в соответствии со способами, описанными в данном документе для получения антител.
- 25 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит от одной до трех CDR домена VH, выбранного из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, и от одной до трех CDR домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит от двух до трех CDR домена VH, выбранного из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, и от от двух до трех CDR домена
- 30 VL, выбранного из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит три CDR домена VH, выбранного из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, и три CDR домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8. В некоторых аспектах указанные CDR являются типовыми CDR. В некоторых аспектах указанные CDR представляют собой CDR по Кабату. В некоторых аспектах указанные CDR
- 35 представляют собой CDR по Чотиа. В некоторых аспектах указанные CDR представляют собой

AbM CDR. В некоторых аспектах указанные CDR представляют собой Contact CDR. В некоторых аспектах указанные CDR представляют собой IMGT CDR.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит CDR-H3, выбранную из SEQ ID NO: 11. В некоторых аспектах CDR-H3  
5 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 из SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная CDR-H3 представляет собой CDR-H3, выбранную из SEQ ID NO: 11, с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах  
10 осуществления данного изобретения антитела, описанные в этом параграфе, упоминаются в данном документе как "варианты". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты получены из последовательности, описанной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любым другим способом, известным в данной области техники или описанным в данном  
15 документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* в соответствии со способами, описанными в данном документе для получения антител.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит CDR-H2 из SEQ ID NO: 10. В некоторых аспектах CDR-H2 имеет по  
20 меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 из SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная CDR-H2 представляет собой CDR-H2 из SEQ ID NO: 10, с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные  
25 аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела, описанные в этом параграфе, упоминаются в данном документе как "варианты". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты получены из последовательности, описанной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любым другим способом, известным  
30 в данной области техники или описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* в соответствии со способами, описанными в данном документе для получения антител.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит CDR-H1 из SEQ ID NO: 9. В некоторых аспектах CDR-H1 имеет по  
35 меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичность с CDR-H1 из SEQ ID NO:

9. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная CDR-H1 представляет собой CDR-H1 из SEQ ID NO: 9 с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела, описанные в этом параграфе, упоминаются в данном документе как "варианты". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты получены из последовательности, описанной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любым другим способом, известным в данной области техники или описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* в соответствии со способами, описанными в данном документе для получения антител.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит CDR-H3 из SEQ ID NO: 11 и CDR-H2 из SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит CDR-H3 из SEQ ID NO: 11, CDR-H2 из SEQ ID NO: 10 и CDR-H1 из SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления указанная CDR- H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 из SEQ ID NO: 11, указанная CDR-H2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 из SEQ ID NO: 10, и указанная CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 из SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная CDR-H3 представляет собой CDR-H3 из SEQ ID NO: 11 с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8; указанная CDR-H2 представляет собой CDR-H2 из SEQ ID NO: 10 с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8; и указанная CDR-H1 представляет собой CDR-H1 из SEQ ID NO: 9 с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела, описанные в этом параграфе, упоминаются в данном документе как "варианты". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты получены из последовательности, описанной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любым другим способом, известным в данной области техники или описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* в соответствии со способами, описанными в данном документе для получения антител.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит CDR-L3 из SEQ ID NO: 14. В некоторых аспектах указанная CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 из SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная CDR-L3 представляет собой CDR-L3 из SEQ ID NO: 14, с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела, описанные в этом параграфе, упоминаются в данном документе как "варианты". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты получены из последовательности, описанной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любым другим способом, известным в данной области техники или описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* в соответствии со способами, описанными в данном документе для получения антител.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит CDR-L2 из SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах указанная CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 из SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная CDR-L2 представляет собой CDR-L2 из SEQ ID NO: 13, с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела, описанные в этом параграфе, упоминаются в данном документе как "варианты". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты получены из последовательности, описанной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любым другим способом, известным в данной области техники или описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* в соответствии со способами, описанными в данном документе для получения антител.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит CDR-L1 из SEQ ID NO: 12. В некоторых аспектах указанная CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 из SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная CDR-L1

представляет собой CDR-L1 из SEQ ID NO: 12, с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела, описанные в этом параграфе, упоминаются в данном документе как "варианты". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты получены из последовательности, описанной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любым другим способом, известным в данной области техники или описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* в соответствии со способами, описанными в данном документе для получения антител.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит CDR-L3 из SEQ ID NO: 14 и CDR-L2 из SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит CDR-L3 из SEQ ID NO: 14, CDR-L2 из SEQ ID NO: 13 и CDR-L1 из SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 из SEQ ID NO: 14, указанная CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 из SEQ ID NO: 13, и указанная CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 из SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная CDR-L3 представляет собой CDR-L3 из SEQ ID NO: 14 с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4 или 5; указанная CDR-L2 представляет собой CDR-L2 из SEQ ID NO: 13 с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3 или 4; и указанная CDR-L1 представляет собой CDR-L1 из SEQ ID NO: 12 с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела, описанные в этом параграфе, упоминаются в данном документе как "варианты". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты получены из последовательности, описанной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любым другим способом, известным в данной области техники или описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* в соответствии со способами, описанными в данном документе для получения антител.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит CDR-H3 из SEQ ID NO: 11, CDR-H2 из SEQ ID NO: 10, CDR-H1 из SEQ ID NO: 9, CDR-L3 из SEQ ID NO: 14, CDR-L2 из SEQ ID NO: 13 и CDR-L1 из SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 из SEQ ID NO: 11, указанная CDR-H2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 из SEQ ID NO: 10, указанная CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 из SEQ ID NO: 9, указанная CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 из SEQ ID NO: 14, указанная CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 из SEQ ID NO: 13, и указанная CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 из SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная CDR-H3 представляет собой CDR-H3 из SEQ ID NO: 11 с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8; указанная CDR-H2 представляет собой CDR-H2 из SEQ ID NO: 10 с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8; указанная CDR-H1 представляет собой CDR-H1 из SEQ ID NO: 9 с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4 или 5; указанная CDR-L3 представляет собой CDR-L3 из SEQ ID NO: 14 с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4 или 5; указанная CDR-L2 представляет собой CDR-L2 из SEQ ID NO: 13 с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3 или 4; и указанная CDR-L1 представляет собой CDR-L1 из SEQ ID NO: 12 с количеством аминокислотных замен вплоть до 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела, описанные в этом параграфе, упоминаются в данном документе как "варианты". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты получены из последовательности, описанной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любым другим способом, известным в данной области техники или описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* в соответствии со способами, описанными в данном документе для получения антител.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит CDR-H1 из SEQ ID NO: 9, CDR-H2 из SEQ ID NO: 10, CDR-H3 из SEQ ID NO: 11, CDR-L1 из SEQ ID NO: 12, CDR-L2 из SEQ ID NO: 13 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 14.

### Fc-область

В данном контексте термин "Fc-домен" или "Fc-область" применяется для обозначения С-концевой области тяжёлой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Указанный термин включает Fc-области с нативными последовательностями и вариантные Fc-области. Если не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует системе нумерации EU, также называемой индексом EU, как описано в публикации Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. В данном контексте термин "Fc-полипептид" димерного Fc-домена относится к одному из двух полипептидов, формирующих димерный Fc-домен, то есть к полипептиду, содержащему С-концевые константные области тяжёлой цепи иммуноглобулина, способные к стабильной самоассоциации. Например, Fc-полипептид димерного IgG Fc содержит последовательность константного домена IgG CH2 и IgG CH3. Fc может относиться к классу IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут дополнительно делиться на подклассы (изотипы), например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub>.

В данном контексте термин "Fc-рецептор" или "FcR" описывает рецептор, который связывается с Fc-областью антитела. Например, FcR может быть нативной последовательностью FcR человека. Как правило, FcR представляет собой рецептор, который связывается с антителом IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII, и FcγRIII, включая аллельные варианты и формы этих рецепторов, образованные в результате альтернативного сплайсинга. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA ("активирующий рецептор") и FcγRIIB ("ингибирующий рецептор"), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, отличающиеся главным образом по их цитоплазматическим доменам. Иммуноглобулины других изотипов также могут быть связаны определенными FcR (см., например, публикацию Janeway et al., *Immuno Biology: the immune system in health and disease*, (Elsevier Science Ltd., NY) (4th ed., 1999)). Активирующий рецептор FcγRIIA содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (обзор содержится в публикации Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcR рассматриваются в публикациях Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Другие FcR, включая те, которые будут определены в дальнейшем, в данном документе охватываются термином "FcR". Указанный термин также включает неонатальный рецептор FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG к плоду (Guyer et al. *J. Immunol.* 117:587, 1976; и Kim et al. *J. Immunol.* 24:249, 1994).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело представляет собой антитело IgG1.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело представляет собой антитело IgG3.

5 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело представляет собой антитело IgG2.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело представляет собой антитело IgG4.

10 Модификации в домене CH2 могут влиять на связывание FcR с Fc. В данной области техники известен ряд модификаций аминокислот в Fc-области для селективного изменения аффинности Fc к различным рецепторам Fc-гамма (Fc $\gamma$ ). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Fc содержит одну или большее количество модификаций для содействия избирательному связыванию рецепторов Fc-гамма.

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

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

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

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

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

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

S239D/D265S/S298A/I332E, S239E/S298A/K326A/A327H, G237F/S298A/A330L/I332E, S239D/I332E/S298A, S239D/K326E/A330L/I332E/S298A, G236A/S239D/D270L/I332E, S239E/S267E/H268D, L234F/S267E/N325L, G237F/V266L/S267D и другие мутации, перечисленные в

30 WO2011/120134 и WO2011/120135 и включены в данный документ посредством ссылки. В публикации *Therapeutic Antibody Engineering* (William R. Strohl и d Lila M. Strohl, Woodhead Publishing series in Biomedicine No 11, ISBN 1 907568 37 9, Oct 2012) перечислены мутации на странице 283.

35 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, включает модификации, улучшающие его способность опосредовать эффекторную функцию. Такие модификации известны в данной области техники и включают в себя

афукозилирование или инженерии аффинности Fc к активирующему рецептору, главным образом к FCGR3a для ADCC и к C1q для CDC. В приведенной ниже таблице В обобщены различные конструкции, описанные в литературе для инженерии эффекторной функции.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит Fc-область с одной или большим количеством аминокислотных замен, которые улучшают ADCC, такими как замена в одном или большем количестве положений 298, 333 и 334 Fc-области. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит Fc-область с одной или большим количеством аминокислотных замен в положениях 239, 332 и 330, как описано в публикации Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103: 4005-4010, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит одно или большее количество изменений, которые улучшают или уменьшают связывание C1q и/или CDC. См. патент США № 6194551; WO 99/51642; и публикацию Idusogie et al., *J. Immunol.* 2000, 164: 4178-4184; каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Таким образом, в одном варианте осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, может содержать димерный Fc, который содержит одну или большее количество аминокислотных модификаций, как указано в Таблице В, придающих улучшенную эффекторную функцию. В других вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело может быть афукозилировано с целью улучшения эффекторной функции.

**Таблица В: Домены CH2 и инженерия эффекторных функций**

Таблица В		
Ссылка	Мутации	Эффект
Lu, 2011, Ferrara 2011, Mizushima 2011	Афукозилированный	Повышение ADCC
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A	Повышение ADCC
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A/K326A	Повышение ADCC
Stavnhagen, 2007	F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L	Повышение ADCC
Nordstrom, 2011	F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L	Повышение ADCC

Stewart, 2011	F243L	Повышение ADCC
Shields, 2001	S298A/E333A/K334A	Повышение ADCC
Lazar, 2006	S239D/I332E/A330L	Повышение ADCC
Lazar, 2006	S239D/I332E	Повышение ADCC
Bowles, 2006	AME-D, не определенные мутации	Повышение ADCC
Heider, 2011	37,1, мутации не описаны	Повышение ADCC
Moore, 2010	S267E/H268F/S324T	Повышение CDC

- Модификации Fc, снижающие связывание FcγR и/или комплемента и/или эффекторную функцию, известны в данной области техники. В последних публикациях описаны стратегии, которые применялись для конструирования антител со сниженной или подавленной эффекторной активностью (см. публикации Strohl, WR (2009), *Curr Opin Biotech* 20:685-691, и Strohl, WR and Strohl LM, “Antibody Fc engineering for optimal antibody performance” в *Therapeutic Antibody Engineering*, Cambridge: Woodhead Publishing (2012), pp 225-249). Эти стратегии включают снижение эффекторных функций посредством модификации гликозилирования, применения пептидных остовов IgG2/IgG4 или введения мутаций в шарнирную или CH2-область Fc. Например, в публикации патента США № 2011/0212087 (Strohl), в международной публикации патента № WO 2006/105338 (Xencor), в публикации патента США № 2012/0225058 (Xencor), в публикации патента США № 2012/0251531 (Genentech.) и Strop et al. ((2012) *J. Mol. Biol.* 420: 204-219) описывают конкретные модификации для уменьшения связывания FcγR или комплемента с Fc.
- Конкретные, неограничивающие примеры известных аминокислотных модификаций, снижающих уровень связывания FcγR или комплемента с Fc, включают модификации, указанные в следующей таблице С:

Таблица С: Модификации, снижающие уровень связывания FcγR или комплемента с Fc

Компания	Мутации
GSK	N297A
Ortho Biotech	L234A/L235A
Protein Design labs	IGG2 V234A/G237A
Wellcome Labs	IGG4 L235A/G237A/E318A
GSK	IGG4 S228P/L236E
Alexion	IGG2/IGG4combo
Merck	IGG2 H268Q/V309L/A330S/A331S
Bristol-Myers	C220S/C226S/C229S/P238S
Seattle Genetics	C226S/C229S/E3233P/L235V/L235A
Amgen	Продуцирование E.coli, негликозилированный
Medimune	L234F/L235E/P331S
Trubion	Мутантный белок шарнирной области, возможно C226S/P230S

Способы получения антител с небольшим количеством фукозы или ее отсутствием в сайте гликозилирования Fc (Asn 297 по нумерации EU) без изменения аминокислотной последовательности хорошо известны в данной области техники. Технология GlymaxX® (ProBioGen AG) основана на введении гена фермента, который отклоняет клеточный путь биосинтеза фукозы в клетках, применяемых для продукции антител. Это предотвращает добавление сахарной "фукозы" к углеводной части N-связанных антител антителопродуцирующими клетками (von Horsten et al. (2010) *Glycobiology*. 2010 Dec; 20 (12): 1607-18.). Примеры клеточных линий, способных продуцировать дефукозилированное антитело, включают клетки CHO-DG44 со стабильной сверхэкспрессией бактериальной оксидоредуктазы GDP-6-дезоксид- D-лихсо-4-гексилоредуктазы (RMD) (см. публикацию Henning von Horsten et al., *Glycobiol* 2010, 20:1607-1618) или клетки Lec13 CHO, которые являются дефицитными по фукозилированию белка (см. публикацию Ripka et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, 249: 533-545; публикацию патента США. № 2003/0157108; WO 2004/056312; каждая из которых включена в

данный документ посредством ссылки в полном объеме), и нокаутные клеточные линии, такие как клетки CHO с нокаутом гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы или FUT8 (см. публикацию Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.*, 2004, 87: 614-622; Kanda et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 94: 680-688; и WO 2003/085107; каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме). С другим подходом к получению антител с пониженными уровнями фукозилирования можно ознакомиться в патенте США 8409572, в котором описан выбор клеточных линий для продуцирования антител по их способности давать более низкие уровни фукозилирования на антителах.

Антитела могут быть полностью афукозилированными (то есть они не содержат детектируемой фукозы) или могут быть частично афукозилированными, что означает, что выделенное антитело содержит менее 95%, менее 85%, менее 75%, менее 65%, менее 55%, менее 45%, менее 35%, менее 25%, менее 15% или менее 5% от количества фукозы, обычно определяемого для аналогичного антитела, продуцируемого системой экспрессии млекопитающих.

В некоторых аспектах антитело, описанное в данном документе, содержит домен IgG1 с пониженным содержанием фукозы в положении Asn 297 по сравнению со встречающимся в природе доменом IgG1. Известно, что такие Fc-домены имеют улучшенную ADCC. См. публикацию Shields et al., *J. Biol. Chem.*, 2002, 277: 26733-26740, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых аспектах такие антитела не содержат никакой фукозы в положении Asn 297. Количество фукозы может быть определено с помощью любого подходящего способа, например, как описано в публикации WO 2008/077546, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит разделённый пополам олигосахарид, такой как двухантенарный олигосахарид, присоединенный к Fc-области антитела, которое разделено пополам посредством GlcNAc. Такие варианты антител могут характеризоваться сниженным фукозилированием и/или улучшенной ADCC-функцией. Примеры таких вариантов антител описаны, например, в WO 2003/011878; Патент США № 6602684; и в публикации патента США № 2005/0123546; каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, содержит Fc-область с по меньшей мере одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-области. Такие варианты антител могут обладать улучшенной CDC-функцией. Примеры таких вариантов антител описаны, например, в публикации WO 1997/30087; 5 WO 1998/58964; и WO 1999/22764; каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Примеры клеточных линий, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают клетки CHO-DG44 со стабильной сверхэкспрессией бактериальной оксидоредуктазы GDP-6-дезоксид- D-лихсо-4-гексизоредуктазы (RMD) (см. публикацию Henning von Horsten et al., *Glycobiol* 2010, 20:1607-1618) или клетки Lec13 CHO, которые являются дефицитными по фукозилированию белка (см. публикацию Ripka et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, 249: 533-545; публикацию патента США. № 2003/0157108; WO 2004/056312; каждая из которых включена в 10 данный документ посредством ссылки в полном объеме), и нокаутные клеточные линии, такие как клетки CHO с нокаутом гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы или FUT8 (см. публикацию Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.*, 2004, 87: 614-622; Kanda et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 94: 680-688; и WO 2003/085107; каждая из которых включена в данный документ посредством 15 ссылки в полном объеме).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело обладает антителозависимой клеточно-опосредованной фагоцитарной активностью (ADCP). ADCP может 20 возникать, когда антитела связываются с антигенами на поверхности патогенных или онкогенных клеток-мишеней. Фагоцитарные клетки, несущие рецепторы Fc на своей клеточной поверхности, включая моноциты и макрофаги, распознают и связывают Fc-область антител, связанных с клетками-мишенями. После связывания рецептора Fc с клеткой-мишенью, связанной антителом, может быть инициирован фагоцитоз клетки-мишени. ADCP можно 25 считать одной из форм ADCC.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные антитела способны образовывать иммунный комплекс. Например, иммунный комплекс может представлять собой опухолевую клетку, покрытую антителами.

В некоторых аспектах антитело анти-TREM2 по существу не связывает миелоидные клетки, присутствующие вне раковой ткани. В некоторых аспектах антитело анти-TREM2 по существу 30 не связывает стимулирующие миелоидные клетки, присутствующие в раковой ткани.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные антитела представляют собой моноклональные антитела.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные антитела представляют 35 собой поликлональные антитела.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные антитела продуцируются гибридомами. В других вариантах осуществления данного изобретения указанные антитела продуцируются рекомбинантными клетками, сконструированными для экспрессии желаемых переменных и константных доменов.

- 5 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные антитела могут представлять собой одноцепочечные антитела или другие производные антител, сохраняющие антигенную специфичность, а также нижнюю шарнирную область или их вариант.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные антитела могут представлять собой полифункциональные антитела, рекомбинантные антитела, антитела человека, гуманизированные антитела, их фрагменты или варианты. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения указанный фрагмент антитела или его производное выбирают из фрагмента Fab, фрагмента Fab'2, CDR и ScFv.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела являются специфичными для поверхностных антигенов, таких как белок TREM2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения терапевтические антитела являются специфичными для опухолевых антигенов (например, молекул, специфически экспрессируемых опухолевыми клетками). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения указанные терапевтические антитела могут иметь Fc-части IgG1 или IgG3 человека или нечеловекообразного примата.

### Связывание

20 Применительно к связыванию антитела с молекулой-мишенью, то термины "связывает", "специфическое связывание", "специфически связывается с", "специфический для", "избирательно связывается" и "селективный в отношении" для конкретного антигена (например, целевой полипептид) или эпитопа на конкретном антигене означает связывание, которое измеримо отличается от неспецифического или неселективного взаимодействия (например, с нецелевой молекулой). Специфическое связывание может быть измерено, например, путем измерения связывания с молекулой-мишенью и сравнения его со связыванием с нецелевой молекулой. Специфическое связывание также можно определить путем конкуренции с контрольной молекулой, которая имитирует эпитоп, распознаваемый на молекуле-мишени. В этом случае специфическое связывание присутствует, если связывание антитела с молекулой-мишенью конкурентно ингибируется контрольной молекулой.

30 Термин "аффинность" относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одиночным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнера по связыванию (например, антигена или эпитопа). Если не указано иное, в данном документе термин "аффинность связывания" относится к присущей молекуле аффинности связывания, отражающей взаимодействие между представителями пары связывающихся компонентов

(например, антителом и антигеном или эпитопом) при их соотношении 1:1. Аффинность молекулы X к ее партнеру Y можно представить в виде равновесной константы диссоциации ( $K_D$ ). Кинетические компоненты, которые вносят вклад в равновесную константу диссоциации, более подробно описаны ниже. Аффинность можно измерить с помощью общепринятых

5 способов, известных в данной области техники, в том числе описанных в данном документе, таких как технология поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, BIACORE®) или биослойная интерферометрия (например, FORTEBIO®).

В данном контексте термин " $k_d$ " ( $s^{-1}$ ), относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Указанное значение также упоминается как значение  $k_{off}$ .

10 В данном контексте термин " $k_a$ " ( $M^{-1} \times s^{-1}$ ) относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Указанное значение также упоминается как значение  $k_{on}$ .

В данном контексте термин " $K_D$ " (M), относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.  $K_D = k_d/k_a$ . В некоторых вариантах

15 осуществления данного изобретения аффинность антитела описывается в терминах  $K_D$  для взаимодействия между таким антителом и его антигеном. Для внесения ясности, как известно в данной области техники, меньшее значение  $K_D$  указывает на взаимодействие с более высокой аффинностью, тогда как большее значение  $K_D$  указывает на взаимодействие с более низкой аффинностью.

20 В данном контексте термин " $K_A$ " ( $M^{-1}$ ) относится к равновесной константе ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.  $K_A = k_a/k_d$ .

При применении в данном документе в контексте двух или большего количества антител термин "конкурирует с" или "перекрестно конкурирует с"» указывает на то, что два или большее количество антител конкурируют за связывание с антигеном (например, TREM2). В одном

25 типовом анализе, TREM2 наносят на поверхность и приводят в контакт с первым антителом TREM2, после чего добавляют второе антитело TREM2. В другом типовом анализе, первое антитело TREM2 наносят на поверхность и приводят в контакт с TREM2, а затем добавляют второе антитело TREM2. Если присутствие первого антитела TREM2 уменьшает связывание второго антитела TREM2 в любом из анализов, тогда антитела конкурируют друг с другом.

30 Термин "конкурирует с"» также включает комбинации антител, где одно антитело уменьшает связывание другого антитела, но где не наблюдается конкуренции, когда антитела добавляю в обратном порядке. Однако в некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое и второе антитела ингибируют связывание друг друга независимо от порядка их добавления. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения одно антитело уменьшает связывание

35 другого антитела с его антигеном по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по

меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 95%. Специалист в данной области техники может выбрать концентрации антител, применяемые в конкурентных анализах, на основе аффинности антител к TREM2 и валентности антител. Анализы, описанные в этом определении, являются иллюстративными, и квалифицированный специалист может применить любой пригодный анализ, чтобы определить, конкурируют ли антитела друг с другом. Пригодные анализы описаны, например, в публикации Cox et al., "Immunoassay Methods," в *Assay Guidance Manual [Internet]*, обновлено 24 декабря 2014 года ([www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/); по состоянию на 29 сентября 2015 года); Silman et al., *Cytometry*, 2001, 44:30-37; и Finco et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, 54:351-358; каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, связывается с TREM2 человека с  $K_D$ , меньшим или равным около 0,001, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 1,95, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или  $10 \times 10^{-9}$  М, по данным анализа Вiasoge. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения  $K_D$  антитела, описанного в данном документе, находится в пределах около 0,001 - 0,01, 0,01 - 0,1, 0,01 - 0,05, 0,05 - 0,1, 0,1 - 0,5, 0,5 - 1, 0,25 - 0,75, 0,25 - 0,5, 0,5 - 0,75, 0,75 - 1, 0,75 - 2, 1,1 - 1,2, 1,2 - 1,3, 1,3 - 1,4, 1,4 - 1,5, 1,5 - 1,6, 1,6 - 1,7, 1,7 - 1,8, 1,8 - 1,9, 1,9 - 2, 1 - 2, 1 - 5, 2 - 7, 3 - 8, 3 - 5, 4 - 6, 5 - 7, 6 - 8, 7 - 9, 7 - 10 или  $5 - 10 \times 10^{-9}$  М, по данным анализа Вiasoge.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, связывается с TREM2 человека с  $K_D$ , меньшим или равным около 2, 1,98, 1,95, 1,9, 1,85, 1,8, 1,75, 1,7, 1,65, 1,6, 1,55, 1,50, 1,45 или  $1,4 \times 10^{-9}$  М или менее, по данным анализа Вiasoge.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, связывается с TREM2 человека с  $K_D$  в пределах 1,9 - 1,8, 1,8 - 1,7, 1,7 - 1,6, 1,6 - 1,5 или  $1,9 - 1,5 \times 10^{-9}$  М, по данным анализа Вiasoge. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, связывается с TREM2 человека с  $K_d$

меньшим или равным около 10, 9,56, 9,5, 9,0, 8,88, 8,84, 8,5, 8, 7,5, 7,32, 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5 или  $1 \times 10^{-4}$  (1/c) или менее, по данным анализа Вiasoge. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, связывается с

TREM2 человека с  $K_d$  в пределах 7 - 10, 7 - 8, 8 - 9, 9 - 10, 7 - 7,5, 7,5 - 8, 8 - 8,5, 8,5 - 9, 9 - 9,5 или  $9,5 - 10 \times 10^{-4}$  М (1/c), по данным анализа Вiasoge. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, связывается с TREM2 человека с  $K_a$

большим или равным около 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 4,5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 7, 8, 9 или  $10 \times 10^5$  (1/Мс) или более, по данным анализа Вiasoge. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе,

вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе,

связывается с TREM2 человека с  $K_a$  в пределах 4 - 7, 4 - 4.5, 4.5 - 5, 5 - 5.5, 5.5 - 6, 6 - 6.5 или 6.5 - 7, 7 - 8, 8 - 9 или 9 - 10 x 10<sup>5</sup> (1/Мс), по данным анализа Biacore.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, связывается с TREM2 человека с EC50, меньшим или равным 2, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ, что измеряется методом проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело связывает TREM2 человека с EC50 в пределах 0,6 - 1,4 нМ, что измеряется методом проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело связывает TREM2 человека с EC50 около 0,5, 0,6, 0,9, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 или 1,5 нМ, что измеряется методом проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, связывается с TREM2 человека с EC50, меньшим или равным 2, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ, что измеряется методом проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело связывает TREM2 мыши с EC50 в пределах 0,6 - 1,4 нМ, что измеряется методом проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления указанного антитела связывается с TREM2 мыши с EC50 около 0,5, 0,6, 0,9, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 или 1,5 нМ, что измеряется методом проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, не связывается с TREM2 человека с EC50, большим или равным 20 нМ и более, что измеряется методом проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, не связывается с TREM2 мыши с EC50, большим или равным 3 нМ и более, что измеряется методом проточной цитометрии.

Для скрининга антител, которые связываются с эпитопом на целевом антигене, связанном с антителом, представляющим интерес (например, TREM2), можно выполнять обычный анализ перекрестной блокировки, такой как описанный в публикации *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). В альтернативном или дополнительном варианте, картирование эпитопа может быть выполнено с помощью способов, известных в данной области техники.

Конкуренцию между антителами можно определить с помощью анализа, в котором тестируемое антитело ингибирует или блокирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном (см., например, публикацию Junghans et al., *Cancer Res.* 50: 1495, 1990; Fendly et al. *Cancer Research* 50: 1550-1558; US 6949245). Считается, что тестируемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если взятое в избытке тестируемое антитело (например, по меньшей мере 2x, 5x, 10x, 20x или 100x) ингибирует или блокирует связывание эталонного антитела, например, по меньшей мере на 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % или 99 % по

результатам анализа конкурентного связывания. Антитела, идентифицированные с помощью конкурентного анализа (конкурирующее антитело), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся с соседним эпитопом, достаточно проксимальным к эпитопу, связанному с эталонным антителом для возникновения стерического препятствия. Например, может быть идентифицировано второе конкурирующее антитело, которое конкурирует за связывание с TREM2 с первым антителом, описанным в данном документе. В некоторых случаях второе антитело может блокировать или ингибировать связывание первого антитела, например, по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, что измеряется в конкурентном анализе связывания. В некоторых случаях второе антитело может вытеснять первое антитело более чем на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%.

### Функция

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело обладает активностью антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). ADCC может возникать, когда антитела связываются с антигенами на поверхности патогенных или онкогенных клеток-мишеней. Эффекторные клетки, несущие Fc-гамма-рецепторы (Fc $\gamma$ R или FCGR) на своей клеточной поверхности, включая цитотоксические Т-клетки, природные клетки-киллеры (NK), макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, дендритные клетки или моноциты, распознают и связывают Fc-область антител, связанных к клеткам-мишеням. Такое связывание может инициировать активацию внутриклеточных сигнальных путей, приводящих к гибели клеток. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения подтипы (изотипы) Fc-области иммуноглобулина антитела включают IgG1 и IgG3 человека. В данном контексте ADCC относится к клеточноопосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (*например*, природные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и тем самым вызывают лизис клетки-мишени. Основные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только Fc $\gamma$ RIII, тогда как моноциты экспрессируют Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII и Fc $\gamma$ RIII. Краткая информация об экспрессии FcR на гемопоэтических клетках приведена в Таблице 3 на странице 464 публикации Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Для оценки ADCC-активности молекулы, представляющей интерес, можно провести анализ ADCC *in vitro*, такой как описанный в патенте США № 5500362 или 5821337. В качестве эффекторных клеток в таких анализах можно применять мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и природные клетки-киллеры (NK). В альтернативном или дополнительном варианте, ADCC-активность молекулы, представляющей интерес, можно оценить в условиях *in vivo*, *например*, в

модели на животных, такой как та, которая описаны в публикации Clynes *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело обладает комплементзависимой цитотоксической активностью (CDC). CDC, индуцированная антителами, опосредуется через белки классического каскада комплемента и запускается связыванием белка C1q комплемента с антителом. Связывание Fc-области антитела с C1q может индуцировать активацию каскада комплемента. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения подтипы (изоотипы) Fc-области иммуноглобулина антитела включают IgG1 и IgG3 человека. В данном контексте термин "CDC" относится к способности молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (*например*, полипептидом (*например*, антителом)) в комплексе с родственным антигеном. Для определения активации комплемента, можно выполнить анализ CDC, *например*, как описано в публикации Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело представляет собой агонистическое антитело. Агонистическое антитело может индуцировать (*например*, увеличивать) одну или большее количество активностей или функций NSM после того, как указанное антитело связывается с белком TREM2, экспрессируемым на клетке. Указанное агонистическое антитело может связываться и активировать NSM, вызывая изменения в пролиферации клетки или модифицируя возможности презентации антигена. Указанное агонистическое антитело может связывать и активировать NSM, запуская внутриклеточные сигнальные пути, которые приводят к модифицированному росту клеток или апоптозу.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело представляет собой антагонистическое антитело. Антагонистическое антитело может блокировать (*например*, уменьшать) одну или большее количество активностей или функций NSM после того, как указанное антитело связывается с белком TREM2, экспрессируемым на клетке. *Например*, указанное антагонистическое антитело может связываться и блокировать связывание лиганда с одним или большим количеством белков NSM, предотвращая дифференцировку и пролиферацию клетки или модифицируя возможности презентации антигена. Указанное антагонистическое антитело может связываться и предотвращать активацию белка TREM2 его лигандом, модифицируя внутриклеточные сигнальные пути, которые способствуют росту и выживанию клеток.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело представляет собой деплетирующее антитело. Деплетирующее антитело представляет собой антитело, которое уничтожает нестимулирующую миелоидную клетку при контакте через взаимодействие антитела с другими иммунными клетками молекул. *Например*, антитела, будучи связанными с

клетками, несущими белки TREM2, могут связываться с белками комплемента и вызывать зависимый от комплемента лизис клеток. Антитела, будучи связанными с клетками, несущими белки TREM2, могут также запускать активность соседних клеток, несущих рецепторы Fc, направленную на уничтожение их путем антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

5 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело является нейтрализующим антителом, при этом указанное антитело нейтрализует одну или большее количество биологических активностей NSM. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белок TREM2 экспрессируется на поверхности нестимулирующих миелоидных

10 клеток, и указанное антитело распознает внеклеточный домен белка TREM2.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело является селективным в отношении NSM (предпочтительно связывается с TREM2). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, которое селективно связывается с NSM, имеет константу диссоциации (Kd) в диапазоне от 0,0001 нМ до 1 мкМ. В определенных вариантах

15 осуществления данного изобретения антитело специфически связывается с эпитопом на белке TREM2, который является консервативным среди белка разных видов. В других вариантах осуществления данного изобретения селективное связывание включает, но не требует, исключительное связывание.

В одном варианте осуществления данного изобретения антитело анти-TREM2, связанное со

20 своей мишенью, отвечает за деплетирование *in vivo* нестимулирующих миелоидных клеток, с которыми оно связано. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные белки, индуцированные кластерными антителами, могут вызывать различные реакции, включая высвобождение воспалительных цитокинов, регуляцию продукции антигена, эндоцитоз или уничтожение клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения

25 указанное антитело способно вовлекать и активировать комплемент или опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) *in vivo* или опосредовать фагоцитоз путем связывания Fc-рецепторов *in vivo*. Указанное антитело может также деплетировать нестимулирующие миелоидные клетки путем индукции апоптоза или некроза нестимулирующей миелоидной клетки при связывании.

30 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения деактивация нестимулирующих миелоидных клеток происходит *in vitro* и достигается: а) уничтожением нестимулирующих миелоидных клеток; б) деплетированием магнитными гранулами нестимулирующих миелоидных клеток; или с) сортировкой клеток с активированной флуоресценцией (FACS) нестимулирующих миелоидных клеток.

35 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело связано с эффекторной молекулой или конъюгировано с ней. В конкретных вариантах осуществления данного

изобретения антитело конъюгировано по меньшей мере с одним терапевтическим агентом, выбранным из группы, состоящей из радионуклида, цитотоксина, химиотерапевтического агента, лекарственного средства, пролекарства, токсина, фермента, иммуномодулятора, анти-ангиогенного агента, проапоптотического агента, цитокина, гормона, олигонуклеотида, антисмысловой молекулы, миРНК, второго антитела и фрагмента второго антитела.

В определённых вариантах осуществления данного изобретения антитело конъюгировано с лекарственным средством, например, токсином, химиотерапевтическим агентом, иммуномодулятором или радиоизотопом. Несколько способов получения ADC (конъюгат антитела с лекарственным средством или конъюгат антигенсвязывающей полипептидной конструкции с лекарственным средством) известны в данной области техники и описаны, например, в патентах США 8624003 (способ реакции, проводящейся в одном реакционном сосуде без выделения промежуточных соединений), 8163888 (одноэтапный способ) и 5208020 (двухэтапный способ), например. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы по меньшей мере с одним терапевтическим агентом, выбранным из группы, состоящей из радионуклида, цитотоксина, химиотерапевтического агента, лекарственного средства, пролекарства, токсина, фермента, иммуномодулятора, анти-ангиогенного агента, проапоптотического агента, цитокина, гормона, олигонуклеотида, антисмысловой молекулы, миРНК, второго антитела и фрагмента второго антитела, который связывается с антигеном.

#### **Нестимулирующие миелоидные клетки (NSM)**

В данном документе предлагаются способы и композиции для деактивации и/или обнаружения нестимулирующих миелоидных клеток (NSM), включающие применение антитела анти-TREM2. В данном документе также предлагаются способы и композиции для нацеливания и/или обнаружения нестимулирующих миелоидных клеток, экспрессирующих белок NSM.

В данном документе также предлагаются способы и композиции для деактивации и/или обнаружения нестимулирующих миелоидных клеток, включающие применение антитела, направленного на гомолог белка NSM нечеловеческого происхождения, у индивидуума, не являющегося человеком.

В данном контексте "нестимулирующие миелоидные клетки" представляют собой миелоидные клетки, которые являются недостаточно эффективными для стимуляции иммунного ответа (например, не настолько эффективны для стимуляции противоопухолевого ответа в микроокружении опухоли по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки не так эффективны при презентации антигена (например, опухолевого антигена) Т-клеткам или не так эффективны при стимулировании опухолеспецифических ответов Т-клеток по сравнению со стимулирующей миелоидной клеткой. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки могут

проявлять пониженную способность поглощать, обрабатывать и/или презентировать ассоциированные с опухолью антигены Т-клетке по сравнению со стимулирующей миелоидной клеткой. Нестимулирующие миелоидные клетки могут обладать пониженной способностью или отсутствием способности повторно инициировать цитотоксические Т-лимфоциты или в некоторых случаях не могут стимулировать эффективное уничтожение опухолевых клеток. Нестимулирующие миелоидные клетки могут демонстрировать более низкую экспрессию маркеров гена и клеточной поверхности, вовлеченных в процессинг антигена, презентацию антигена и/или костимуляцию антигена, включая, без ограничения, CD80, CD86, МНСI и МНСII по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками.

10 Нестимулирующие миелоидные клетки по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками могут демонстрировать более низкий уровень экспрессии генов, ассоциированных с перекрестной презентацией, костимуляцией и/или стимулирующими цитокинами, включая, без ограничения, любой один или большее количество из следующих: TAP1, TAP2, PSMB8, PSMB9, TAPBP, PSME2, CD24a, CD274, BTLA, CD40, CD244, ICOSL, ICAM1, TIM3, PDL2, RANK, FLT3,

15 CSF2RB, CSF2RB2, CSF2RA, IL12b, XCR1, CCR7, CCR2, CCL22, CXCL9 и CCL5, а также могут демонстрировать повышенную экспрессию противовоспалительного цитокина IL-10. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки зависят от фактора транскрипции IRF4 и цитокинов GM-CSF или CSF-1 для дифференцировки и выживания. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения нестимулирующие миелоидные клетки могут способствовать опухолевому ангиогенезу путем

20 секреции фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и синтазы оксида азота (NOS) и поддерживать рост опухоли путем секреции эпидермального фактора роста (EGF). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM),

25 нейтрофилы, моноциты или дендритные клетки (DC). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки не являются дендритными клетками (DC). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой нейтрофилы.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой макрофаги, ассоциированные с опухолью (TAM). TAM представляют собой макрофаги, присутствующие вблизи или внутри раковых опухолей, и являются производными циркулирующих моноцитов или резидентных тканевых макрофагов.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки различаются на основе маркеров,

30 которые они экспрессируют, или маркеров, которые они селективно экспрессируют. Экспрессия маркеров клеточной поверхности может быть описана как "+" или "положительная". Отсутствие

35

экспрессии маркеров клеточной поверхности может быть описано как "-" или "отрицательная". Экспрессия маркера клеточной поверхности может быть дополнительно описана как "высокая" (клетки, экспрессирующие высокие уровни маркеров) или "низкая" (клетки, экспрессирующие низкие уровни маркеров), что указывает на относительную экспрессию каждого маркера на поверхности клетки. Уровень маркеров может быть определен с помощью различных способов, известных в данной области техники, например, с помощью иммуноокрашивания и анализа FACS, или гель-электрофореза и вестерн-блоттинга.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой дендритные клетки (DC). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные дендритные клетки могут различаться по шиповидной или дендритной морфологии. В одном варианте осуществления данного изобретения указанная нестимулирующая дендритная клетка представляет собой по меньшей мере CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup> и BDCA1<sup>+</sup> (также называемые клетками DC1). В одном варианте осуществления данного изобретения указанная нестимулирующая дендритная клетка не является CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup> и BDCA3<sup>+</sup> (также называемые клетками DC2). В одном варианте осуществления данного изобретения указанная дендритная клетка, которая представляет собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup> и BDCA3<sup>+</sup>, является стимулирующей миелоидной клеткой.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой макрофаги, ассоциированные с опухолью. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, например у людей, указанными нестимулирующими макрофагами, ассоциированными с опухолью, являются по меньшей мере CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанными нестимулирующими макрофагами, ассоциированными с опухолью, являются по меньшей мере CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанными нестимулирующими макрофагами, ассоциированными с опухолью, являются по меньшей мере CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанными нестимулирующими макрофагами, ассоциированными с опухолью, являются по меньшей мере CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, BDCA3<sup>-</sup>.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанными нестимулирующими макрофагами, ассоциированными с опухолью, являются по меньшей мере CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, BDCA3<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанными нестимулирующими макрофагами, ассоциированными с опухолью, являются по меньшей мере CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, BDCA3<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанными нестимулирующими макрофагами, ассоциированными с опухолью, являются по меньшей мере CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> и

CD11c<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанными нестимулирующими макрофагами, ассоциированными с опухолью, являются по меньшей мере CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, BDCA3<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup> и CD11c<sup>+</sup>.

5 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные способы и композиции по данному изобретению являются пригодными для нацеливания на TAM и DC у других млекопитающих, например, у мышей. В таких вариантах осуществления данного изобретения TAM и DC мышей вступают в контакт с антителом TREM2. В одном варианте осуществления данного изобретения, например, у мышей, указанный макрофаг, ассоциированный с опухолью, имеет по меньшей мере CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD11b<sup>выс</sup> и CD11c<sup>низк</sup> (также называемый TAM1). В одном варианте осуществления данного изобретения, например, у мышей, указанные макрофаги, ассоциированные с опухолью, имеют по меньшей мере CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD11b<sup>низк</sup> и CD11c<sup>выс</sup> (также называемый TAM2). В данном контексте термин "CD11b<sup>выс</sup> макрофаги" относится к макрофагам, экспрессирующим высокие уровни CD11b. В данном контексте термин "CD11b<sup>низк</sup> макрофаги" относится к макрофагам, которые экспрессируют на своей поверхности уровень CD11b, который существенно ниже, чем у CD11b<sup>выс</sup> макрофагов. В данном контексте термин "CD11c<sup>выс</sup> макрофаги" относится к макрофагам, экспрессирующим высокие уровни CD11c. В данном контексте термин "CD11c<sup>низк</sup> макрофаги" относится к макрофагам, которые экспрессируют на своей поверхности уровень CD11c, который существенно ниже, чем у CD11c<sup>выс</sup> макрофагов.

20 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки по данному изобретению включают один или большее количество типов клеток, выбранных из TAM и DC1.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, например, у мышей, указанные нестимулирующие миелоидные клетки по данному изобретению включают один или большее количество типов клеток, выбранных из TAM1, TAM2 и DC1. В таких вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки по данному изобретению вступают в контакт с антителом TREM2.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки являются внутриопухолевыми миелоидными клетками.

30 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки локализованы в границах опухолевых поражений или в трансформированных опухолевых протоках, где они вступают в контакт с родственными Т-клетками. В одном варианте осуществления данного изобретения локализация нестимулирующей миелоидной клетки модифицирована так, что клетки больше не локализуются на границе опухоли или больше не вступают в контакт с Т-клетками.

- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, включающей стимулирующие миелоидные клетки и нестимулирующие миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки
- 5 находятся в популяции иммунных клеток, включающей только нестимулирующие миелоидные клетки. Популяции иммунных клеток по данному изобретению могут быть чистыми, гомогенными, гетерогенными, полученными из различных источников (например, полпраженной ткани, опухолевой ткани, здоровой ткани, банков клеток), содержащимися в первичных клеточных культурах, содержащимися в иммортализованных культурах и/или содержащимися в
- 10 культурах *ex vivo*.
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой макрофаги, ассоциированные с опухолью.
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой дендритные клетки.
- 15 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup> и BDCA1<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки включают клетки, которые представляют собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup> и BDCA1<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки состоят из клеток, которые представляют собой CD45<sup>+</sup>,
- 20 HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup> и BDCA1<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки состоят по существу из клеток, которые представляют собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup> и BDCA1<sup>+</sup>.
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, BDCA3<sup>-</sup>. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки включают клетки, которые представляют собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, BDCA3<sup>-</sup>. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки состоят из клеток, которые представляют собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>,
- 25 BDCA3<sup>-</sup>. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки состоят по существу из клеток, которые представляют собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, BDCA3<sup>-</sup>.
- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки включают клетки, которые представляют собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>. В
- 35





данного изобретения, например, у мышей, указанные нестимулирующие миелоидные клетки состоят из клеток, которые представляют собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD11b<sup>низк</sup> и CD11c<sup>выс</sup>. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, например, у мышей, указанные нестимулирующие миелоидные клетки состоят по существу из клеток, которые представляют собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD11b<sup>низк</sup> и CD11c<sup>выс</sup>. В таких вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки мыши вступают в контакт с антителом TREM2.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки находятся в раковой ткани.

10 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная популяция иммунных клеток находится в раковой ткани.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие клетки и стимулирующие миелоидные клетки находятся в раковой ткани.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биологический образец включает популяцию иммунных клеток, включающую нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки.

15 Клетки NSM могут в совокупности относиться к клеткам DC1, TAM1 и TAM2, присутствующим в опухолевых тканях, и которые могут отличаться от других типов клеток по их экспрессии маркеров клеток NSM. Например, гены и ассоциированные белки, которые экспрессируются или транслируются в большем количестве в клетках NSM, чем SDC, могут действовать как маркеры NSM. Типовым маркером NSM является CD11b. Дополнительные типовые маркеры NSM перечислены в Таблице А. Клетки NSM могут экспрессировать TREM2, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK и TMEM119 на своей клеточной поверхности. В некоторых аспектах клетки NSM не экспрессируют по меньшей мере один из следующих элементов: KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, CLEC9A, BDCA3 и XCR1.

В одном варианте осуществления данного изобретения клетки NSM экспрессируют один или большее количество маркерных генов NSM, перечисленных в Таблице А. В другом варианте осуществления данного изобретения клетки NSM экспрессируют 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или большее количество маркеров NSM, перечисленных в Таблице D. В другом варианте осуществления данного изобретения клетки NSM экспрессируют большинство или все маркеры NSM, перечисленные в Таблице D. В другом варианте осуществления данного изобретения клетки NSM идентифицированы как экспрессирующие MRC1, MS4A7, C1QC, APOE, C1QB, C1QA и C5AR1.

Таблица D

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

#### Стимулирующие миелоидные клетки

В данном контексте "стимулирующие миелоидные клетки" (также называемые SDC в определенных аспектах) представляют собой миелоидные клетки, которые являются эффективными для стимуляции иммунного ответа (например, являются более эффективными для стимуляции противоопухолевого ответа в микроокружении опухоли по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные стимулирующие миелоидные клетки являются эффективными при презентации антигена (например, опухолевого антигена) Т-клеткам или являются эффективными при стимулировании опухолеспецифических ответов Т-клеток по сравнению с нестимулирующей миелоидной клеткой. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные стимулирующие миелоидные клетки могут проявлять повышенную способность поглощать, обрабатывать и/или презентировать ассоциированные с опухолью антигены Т-клетке по сравнению с нестимулирующей миелоидной клеткой. Стимулирующие миелоидные клетки могут обладать повышенной способностью повторно инициировать

цитотоксические Т-лимфоциты или в некоторых случаях могут стимулировать эффективное уничтожение опухолевых клеток по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками. Стимулирующие миелоидные клетки могут демонстрировать более высокую экспрессию маркеров гена и клеточной поверхности, вовлеченных в процессинг антигена, презентацию антигена и/или костимуляцию антигена, включая, без ограничения, CD80, CD86, МНСI и МНСII по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками.

Типовые маркеры стимулирующих миелоидных клеток перечислены в Таблице А. Например, в SDC человека экспрессия Xcr1, Clec9a и BDCA3 (CD141) является маркером идентичности SDC. Следует отметить, что у мышей CD103 также можно применять в качестве сильного маркера идентичности SDC, хотя он не экспрессируется в SDC человека.

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

Стимулирующие миелоидные клетки могут представлять собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup> и BDCA3<sup>+</sup>. Стимулирующие миелоидные клетки могут представлять собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> и BDCA3<sup>+</sup>. Стимулирующие миелоидные могут представлять собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup> и BDCA3<sup>+</sup>. Стимулирующие миелоидные клетки могут представлять собой CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> и BDCA3<sup>+</sup>.

### Белки, нуклеотиды и гомологи

В данном документе предлагаются способы и композиции для деактивации и/или обнаружения нестимулирующих миелоидных клеток человека, которые экспрессируют белки NSM. В некоторых вариантах своего осуществления данное изобретение направлено на деактивацию и/или обнаружение нестимулирующих миелоидных клеток в клетках млекопитающих, отличных от человека, которые экспрессируют гомолог белка NSM. Например, белки NSM у мыши могут экспрессировать ограниченный профиль экспрессии, сопоставимый с человеческим гомологом. Таким образом, в одном варианте осуществления данного изобретения предлагаются способы и композиции для деактивации и/или обнаружения нестимулирующих миелоидных клеток мыши, которые экспрессируют белок NSM. В настоящем документе также предлагаются аналогичные способы и композиции для деактивации и/или обнаружения нестимулирующих клеток у любого индивидуума, который экспрессирует гомолог белка NSM, с аналогичным профилем экспрессии, при этом клетки демонстрируют сопоставимый профиль экспрессии с таковым белка NSM.

Белки или нуклеотиды NSM могут включать по меньшей мере один или большее количество из следующих элементов: C5AR1, LYVE1, ABCC3, MRC1, SIGLEC1, STAB1, C1QB, C1QA, TMEM37, MERTK, C1QC, TMEM119, MS4A7, APOE, CYP4F18, TREM2, TLR7 и LILRB4, а также их гомологи. Белки или нуклеотиды SDC могут включать по меньшей мере один или большее количество из следующих элементов: KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, CLEC9A, BDCA3 и XCR1, а также их гомологи. Белки NSM клеточной поверхности могут включать по меньшей мере один или большее количество из следующих элементов: TREM2, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK и TMEM119. На белки NSM клеточной поверхности может быть нацелено одно или большее количество антител анти-TREM2, по отдельности или в комбинации. Обычно NSM являются положительными для белков или нуклеотидов NSM и отрицательными для белков или нуклеотидов SDC; наоборот, SDC, как правило, являются положительными для белков или нуклеотидов SDC и отрицательными для белков или нуклеотидов NSM.

Антитела, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере один полипептид, хотя они обычно содержат димер HC/LC, то есть четыре полипептида. Также описаны полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, описанные в данном документе. Указанные антитела обычно выделяют.

В данном контексте термин "выделенный" означает агент (например, полипептид или полинуклеотид), который был распознан и отделен и/или выделен из компонента его природной среды культивирования клеток. Загрязняющими компонентами его природной среды являются материалы, которые будут препятствовать диагностическому или терапевтическому применению антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые

растворенные вещества. Термин "выделенный" также относится к агенту, который был получен синтетическим путем, например, с помощью вмешательства человека.

5 Термины "полипептид", "пептид" и "белок" применяются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимерных аминокислотных остатков. То есть, описание, направленное на полипептид, в равной степени относится к описанию пептида и описанию белка, и наоборот. Эти термины относятся как к встречающимся в природе аминокислотным полимерам, так и к аминокислотным полимерам, в которых один или большее количество аминокислотных остатков представляют собой не встречающуюся в природе аминокислоту. Применяемые в данном документе термины охватывают аминокислотные цепи любой длины, включая 10 полноразмерные белки, отличающиеся тем, что аминокислотные остатки соединены ковалентной пептидной связью.

Термин "аминокислота" относится к встречающимся в природе и не встречающимся в природе аминокислотам, а также аминокислотным аналогам и аминокислотным миметикам, которые функционируют подобно встречающимся в природе аминокислотам. Природными 15 аминокислотами являются 20 общепринятых аминокислот (аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутамин, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин), а также пирролидин и селеноцистеин. Аминокислотные аналоги относятся к соединениям, которые имеют такую же основную химическую структуру, что и аминокислота, встречающаяся в 20 природе, то есть, углерод, который связан с водородом, карбоксильную группу, амино группу и R группу, например, гомосерин, норлейцин, метионилсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги могут иметь модифицированные R группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют такую же основную химическую структуру, что и аминокислота, встречающаяся в природе. Ссылка на аминокислоту включает, 25 например, встречающиеся в природе протеогенные L-аминокислоты; D-аминокислоты, химически модифицированные аминокислоты, такие как варианты и производные аминокислот; встречающиеся в природе непротеогенные аминокислоты, такие как  $\beta$ -аланин, орнитин и т.д.; и химически синтезированные соединения, обладающие свойствами, известными в данной области техники как характерные для аминокислот. Примеры не встречающихся в природе 30 аминокислот включают, но не ограничиваются ими,  $\alpha$ -метиламинокислоты (например,  $\alpha$ -метилаланин), D-аминокислоты, гистидиноподобные аминокислоты (например, 2-аминогистидин,  $\beta$ -гидрокси-гистидин, гомогистидин), аминокислоты, имеющие дополнительный метилен в боковой цепи ("гомо" аминокислоты), и аминокислоты, в которых функциональная группа карбоновой кислоты в боковой цепи заменена группой сульфоновой кислоты (например, цистеиновая кислота). Может быть эффективно смешивание различными путями неприродных 35 аминокислот, включая синтетические ненативные аминокислоты, замещенные аминокислоты,

или одну или большее количество D-аминокислот в белках по данному изобретению. Пептиды, содержащие D-аминокислоты, демонстрируют повышенную стабильность *in vitro* или *in vivo* по сравнению с аналогами, содержащими L-аминокислоты. Таким образом, конструирование пептидов и т. д., включение D-аминокислот может быть особенно полезным, в случае если более высокая внутриклеточная стабильность является желаемой или требуемой. Более конкретно, D-пептиды и т. д., являются резистентными к эндогенным пептидазам и протеазам, в связи с этим обеспечивается улучшенная биодоступность молекулы и увеличенное время жизни *in vivo*, в случае если такие свойства являются желаемыми. Дополнительно, D-пептиды и т. д., не могут эффективно подвергаться рестриктированному представлению по главному комплексу гистосовместимости класса II клеткам Т-хелперам, и являются, таким образом, менее пригодными для индуцирования гуморального иммунного ответа в целом организме.

Аминокислоты могут обозначаться в данном документе либо с помощью общеизвестных трехбуквенных символов, либо с помощью однобуквенных символов, рекомендованных Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Нуклеотиды, аналогичным образом, могут называться общепринятым однобуквенным кодом.

Также в данное изобретение включены полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антител. Термин "полинуклеотид" или "нуклеотидная последовательность" подразумевает обозначение последовательного отрезка из двух или большего количества нуклеотидных молекул. Указанная нуклеотидная последовательность может представлять собой геном, кДНК, РНК, полусинтетического или синтетического происхождения или любую их комбинацию.

Термин "нуклеиновая кислота" относится к дезоксирибонуклеотидам, дезоксирибонуклеозидам, рибонуклеозидам или рибонуклеотидам и их полимерам в либо одно-, либо двухцепочечной форме. Не считая специальные ограничения, термин, охватывающий нуклеиновые кислоты, содержит известные аналоги из природных нуклеотидов, которые имеют сходные связующие способности с эталонной нуклеиновой кислотой, и которые метаболизируются в некоторой степени сходным образом со встречающимися в природе нуклеотидами. Не считая другие специальные ограничения, этот термин также относится к аналогам олигонуклеотидов, включая РНК (пептидонуклеиновые кислоты), аналоги ДНК, применяемые в антисмысловой технологии (фосфотиоатах, фосфоамидатах, и тому подобное). Если не указано иное, конкретные последовательности нуклеиновой кислоты также косвенно охватывают их варианты с консервативными модификациями (включая, но не ограничиваясь этим, замещение вырожденного кодона) и комплементарные последовательности, также как явно обозначенную последовательность. В частности, замещения вырожденного кодона могут быть достигнуты путем генерации последовательностей, в которых третье положение одного или большего количества выбранных (или всех) кодонов замещено остатками смешанного основания и/или

дезоксидеозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

Термин "консервативно модифицированные варианты" применяют как к последовательностям аминокислот, так и нуклеиновых кислот. Что касается специфических последовательностей нуклеиновых кислот, то консервативно модифицированные варианты относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или, в случае если нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, к по существу идентичным последовательностям. Из-за вырожденности генетического кода любой заданный белок кодируется значительным количеством функционально идентичных нуклеиновых кислот. Например, все кодоны GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором аланин определяется кодоном, этот кодон может быть изменен на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения этого кодированного полипептида. Такие варианты нуклеиновых кислот являются "молчащими вариантами", которые представляют собой один вид модифицированных вариантов. В данном документе каждая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, также описывает любой возможный молчащий вариант нуклеиновой кислоты. Обычному специалисту в данной области техники будет понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно представляет собой единственный кодон для метионина, и TGG, который обычно представляет собой единственный кодон для триптофана), может быть модифицирован с получением функционально идентичной молекулы. Таким образом, в каждой описанной последовательности подразумевают каждый молчащий вариант нуклеиновой кислоты, который кодирует полипептид.

Что касается аминокислотных последовательностей, специалисту в данной области техники будет понятно, что отдельные замены, делеции или вставки в последовательность нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, которые приводят к изменению, вставке или делеции одной аминокислоты или небольшого количества в процентах аминокислот в кодируемой последовательности, относятся к "варианту с консервативными модификациями", при этом указанное изменение приводит к делеции аминокислоты, вставке аминокислоты или замене аминокислоты на аминокислоту с подобными химическими свойствами. Таблицы консервативных замен, содержащие функционально сходные аминокислоты, известны специалистам в данной области техники. Такие варианты с консервативными модификациями являются дополнением и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели, описанные в данном документе.

Таблицы консервативных замен, содержащие функционально сходные аминокислоты, известны специалистам в данной области техники. Каждая из следующих восьми групп содержит

аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга: 1) аланин (A), глицин (G); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонин (T); и 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, публикацию Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993))

Термины "идентичный" или "процент идентичности" в контексте двух или большего количества последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей, относятся к двум или большему количеству последовательностей, или подпоследовательностей, которые являются одинаковыми. Последовательности являются "по существу идентичными", если они содержат определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (то есть идентичными на около 60 %, около 65 %, около 70 %, около 75 %, около 80 %, около 85 %, около 90 % или около 95 % в пределах конкретной области) при сравнении и выравнивании на предмет максимального соответствия по окну сравнения или обозначенной области при оценке с помощью алгоритмов сравнения последовательности (или других алгоритмов, доступных специалистам в данной области техники) или путем выравнивания вручную и визуального наблюдения. Выравнивание для целей определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществить различными способами, известными специалистам в данной области техники, например, с помощью общедоступного компьютерного программного обеспечения, например, программного обеспечения BLAST, BLAST-2, ALIGN, MEGALIGN (DNASTAR), CLUSTALW, CLUSTAL OMEGA или MUSCLE. Это определение также относится к последовательности, комплементарной исследуемой последовательности. Идентичность может распространяться на область, длина которой составляет по меньшей мере около 50 аминокислот или нуклеотидов, или на область, длина которой составляет 75-100 аминокислот или нуклеотидов, или, если не указано иное, на всю последовательность полинуклеотида или полипептида. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по данному изобретению, включая гомологи, принадлежащие другим видам, отличным от человека, может быть получен способом, включающем этапы скрининга библиотеки в жестких условиях гибридизации с применением зонда, содержащего полинуклеотидную последовательность, описанную в данном документе, или ее фрагмент, и выделения полноразмерной кДНК и геномных клонов, содержащих указанную полинуклеотидную последовательность. Такие технологии гибридизации хорошо известны специалисту в данной области техники.

Для сравнения последовательностей, обычно одну последовательность рассматривают как эталонную, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При применении алгоритма для сравнения последовательностей, тестируемую и исходную последовательность вводят в

компьютер, при необходимости обозначают координаты подпоследовательностей и устанавливают параметры алгоритма для сравнения последовательностей. Можно применять параметры программы по умолчанию или можно устанавливать альтернативные параметры. С помощью алгоритма для сравнения последовательностей затем рассчитывает процент

5 идентичности для тестируемых последовательностей относительно исходной последовательности на основе параметров программы.

В данном контексте термин "окно сравнения" включает ссылку на сегмент, представляющий собой какое-либо одно из множества смежных положений, выбранных из группы, состоящей из от 20 до 600, обычно от около 50 до около 200, более часто от около 100 до около 150 положений,

10 в которых последовательность можно сравнивать с исходной последовательностью из того же самого числа смежных положений после того, как две последовательности оптимально выровнены. Способы выравнивания последовательностей для сравнения известны специалистам в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальных гомологий Smith и Waterman

15 (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482с, алгоритма выравнивания областей гомологии Needleman и Wunsch(1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, поиска сходства по способу Pearson и Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном пакете Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Мадисон, штат Висконсин) или путем ручного выравнивания и визуальной проверки

20 (см. например, публикацию Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 supplement)).

Одним из примеров алгоритма, который является пригодным для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в публикациях Altschul et al. (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 и Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST находится в открытом доступе в Национальном центре биотехнологической информации (the National Center for Biotechnology Information) (см. веб-сайт [ncbi.nlm.nih.gov/](http://ncbi.nlm.nih.gov/)). Параметры W, T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей)

30 применяются в качестве параметров по умолчанию длина слова (W), равная 11, ожидаемое значение (E), равное 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей в программе BLASTP применяются в качестве параметров по умолчанию длина слова, равная 3, ожидаемое значение (E), равное 10, и матрица подсчета баллов BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915), выравнивание

35 (B), равное 50, ожидаемое значение (E), равное 10, M = 5, N = -4 и сравнение обеих цепей. Алгоритм BLAST, как правило, осуществляется с выключенным фильтром "низкая сложность".

- Алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, публикацию Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). Одним из параметров сходства, получаемым с помощью алгоритма BLAST, является наименьшая сумма вероятности ( $P(N)$ ), которая указывает на вероятность случайности совпадения между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями. Например, нуклеиновую кислоту считают сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая сумма вероятности при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой будет менее чем около 0,2, более предпочтительно менее чем около 0,01 и наиболее предпочтительно менее чем около 0,001.
- 5 Фраза "избирательно (или специфически) гибридизуется с" относится к связыванию, образованию дуплексов или гибридизации молекулы только с определенной нуклеотидной последовательностью в жестких условиях гидридизации, когда эта последовательность содержится в сложной смеси (включая, но не ограничиваясь этим, общую клеточную ДНК или РНК или библиотеку ДНК или РНК).
- 10 Фраза «жесткие условия гибридизации» относится к гибридизации последовательностей ДНК, РНК или других нуклеиновых кислот или их комбинаций в условиях низкой ионной силы и высокой температуры, как известно в данной области техники. Как правило, в жестких условиях зонд гибридизуется со своей целевой последовательностью в сложной смеси нуклеиновой кислоты (включая, но не ограничиваясь этим, общую клеточную ДНК или РНК или библиотеку
- 15 ДНК или РНК), но не гибридизуется с другими последовательностями в сложной смеси. Жесткие условия зависят от последовательности и будут различными в различных обстоятельствах. Специфическая гибридизация более длинных последовательностей происходит при более высоких температурах. Исчерпывающее руководство по гибридизации нуклеиновых кислот представлено в публикации Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-
- 20 -Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993).
- 25 В данном контексте термины "конструировать, сконструированный, конструирование" включают любую манипуляцию с пептидным остовом или посттрансляционные модификации встречающегося в природе или рекомбинантного полипептида или его фрагмента.
- 30 Конструирование включает модификации аминокислотной последовательности, профили гликозилирования или группы боковой цепи отдельной аминокислоты, а также комбинации этих подходов. Экспрессия и получение сконструированных белков осуществляется с помощью стандартных методов молекулярной биологии.
- 35 Под "выделенной молекулой нуклеиновой кислоты или полинуклеотидом" подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которая была выделена из ее природной среды. Например, рекомбинатный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащийся в векторе,

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

15 Термин "полимеразная цепная реакция" или "ПЦР", как правило, относится к способу амплификации требуемой нуклеотидной последовательности *in vitro*, как описано, например, в патент США № 4683195. В общем случае, метод ПЦР заключается в многократном повторении цикла реакций удлинения праймера с помощью олигонуклеотидных праймеров, способных предпочтительно гибридизироваться с матричной нуклеиновой кислотой.

20 Под нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом, который имеет нуклеотидную последовательность, что по меньшей мере, например, на 95 % "идентична" эталонной нуклеотидной последовательности по данному изобретению, подразумевается, что нуклеотидная последовательность полинуклеотида идентична эталонной последовательности, кроме того, что полинуклеотидная последовательность может включать вплоть до пяти точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов эталонной нуклеотидной последовательности. Другими словами, для получения полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95 % идентичную эталонной нуклеотидной последовательности, в эталонной последовательности могут быть удалены или замещены на другой нуклеотид вплоть до 5 % нуклеотидов, или целый ряд нуклеотидов вплоть до 5 % от общего числа нуклеотидов, содержащихся в эталонной последовательности, могут быть включены в эталонную последовательность. Эти изменения эталонной последовательности могут происходить в 5'- или 3'-концевых положениях эталонной нуклеотидной последовательности или в любом участке между этими концевыми положениями, диспергированные либо отдельно между остатками в эталонной последовательности или в составе одной или большего количества непрерывных групп в пределах эталонной последовательности. На практике, для того чтобы определить, идентична ли любая определенная полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на

80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % нуклеотидной последовательности по данному изобретению можно применять стандартные способы, использующие известные компьютерные программы, такие как, например, программы, которые рассматривались выше для полипептидов (например, ALIGN-2).

- 5 Считается, что производное или вариант полипептида характеризуется "гомологичностью" или является "гомологичным" пептиду, если аминокислотные последовательности производного или варианта по меньшей мере на 50 % идентичны аминокислотной последовательности, состоящей из 100 аминокислот, из оригинального пептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное производное или вариант характеризуется сходством по меньшей мере
- 10 на 75 % с пептидом или фрагментом пептида, имеющим такое же число аминокислотных остатков, что и производное. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное производное или вариант характеризуется сходством по меньшей мере на 85 % с пептидом или фрагментом пептида, имеющим такое же число аминокислотных остатков, что и производное. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная
- 15 аминокислотная последовательность производного характеризуется сходством по меньшей мере на 90 % с пептидом или фрагментом пептида, имеющим такое же число аминокислотных остатков, что и производное. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная аминокислотная последовательность производного характеризуется сходством по меньшей мере на 95 % с пептидом или фрагментом пептида, имеющим такое же число
- 20 аминокислотных остатков, что и производное. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное производное или вариант характеризуется сходством по меньшей мере на 99 % с пептидом или фрагментом пептида, имеющим такое же число аминокислотных остатков, что и производное.

В данном контексте термин "модифицированный" относится к любым изменениям, вносимым в

25 тот или иной полипептид, как, например, изменения длины полипептида, аминокислотной последовательности, химической структуры, котрансляционная модификация или посттрансляционная модификация полипептида. Формулировка термина "(модифицированный)" означает, что полипептиды, о которых идет речь, являются необязательно модифицированными, то есть рассматриваемые полипептиды могут быть

30 модифицированными или немодифицированными.

В некоторых аспектах, полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 % идентична соответствующей (например, полипептид и/или антитело) эталонной аминокислотной последовательности или ее

фрагменту, которые изложены в таблице (таблицах) или под номером (номерами) доступа,

35 описанными в данном документе. В некоторых аспектах, выделенное антитело или белок, описанные в данном документе, содержат аминокислотную последовательность, кодируемую

полинуклеотидом, который является по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 % идентичным соответствующей эталонной нуклеотидной последовательности или ее фрагменту, которые изложены в таблице (таблицах) или под номером (номерами) доступа, описанными в данном документе. В некоторых аспектах, нуклеотидная последовательность  
5 содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична нуклеотидной последовательности или ее фрагменту, которые изложены в таблице (таблицах) или под номером (номерами) доступа, описанными в данном документе.

### **Фармацевтические композиции**

10 В данной заявке предлагаются композиции, содержащие антитела, включая фармацевтические композиции, содержащие любое одно или большее количество антител, описанных в данном документе, с одним или большим количеством фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная композиция является стерильной. Указанные фармацевтические композиции обычно содержат эффективное  
15 количество антитела.

Эти композиции могут содержать, в дополнение к одному или большему количеству антител, описанных в данном документе, фармацевтически приемлемый вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны препятствовать  
20 эффективности активного ингредиента. Истинные свойства носителя или другого вещества определяются путем его введения в организм, например, пероральным, внутривенным, подкожным или интраперитонеальным путями.

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

30 Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в очаг поражения активный ингредиент должен иметь форму парентерально приемлемого водного раствора с апирогенными свойствами, подходящим рН, изотоничностью и стабильностью. Специалисты в данной области техники вполне способны приготовить пригодные растворы с применением, например, изотонических носителей, таких как раствор натрия хлорида для инъекций, раствор Рингера для

инъекций, раствор Рингера с лактатом для инъекций. Также при необходимости в состав могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

Будь то полипептид, антитело (например, антитело анти-TREM2), нуклеиновая кислота, низкомолекулярное или другое фармацевтически пригодное соединение, которое должно вводиться индивидууму, введение предпочтительно осуществляется в "терапевтически эффективном количестве" или "профилактически эффективном количестве" (в зависимости от обстоятельств, хотя профилактику можно считать терапией), которое является достаточным, чтобы продемонстрировать пользу для индивидуума. Фактическое вводимое количество, а также скорость и время введения будут зависеть от природы и тяжести заболевания, вызывающего агрегацию белка и подлежащего лечению. Назначение лечения, например, решения относительно дозы и т. п., находятся в пределах компетенции врачей общей практики и врачей другого профиля, при этом обычно учитывается характер заболевания, подлежащего лечению, состояние здоровья конкретного субъекта, место и способ введения, а также другие факторы, известные практикующим врачам. Примеры методов и протоколов, упомянутых выше, можно найти в публикации Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980.

Композицию можно вводить отдельно или в комбинации с другими видами лечения, либо одновременно, либо последовательно, в зависимости от патологического состояния, подлежащего лечению.

## Способы

### Способы приготовления

Антитела, описанные в данном документе, можно получить с помощью рекомбинантных способов и композиций, например, как описано в патенте США № 4816567.

В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, описанное в данном документе. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH указанного антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи указанного антитела), или аминокислотную последовательность, содержащую VHH однодоменного антитела. В дополнительном варианте осуществления данного изобретения предлагаются один или большее количество векторов (например, экспрессионных векторов), содержащих такие нуклеиновые кислоты. В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается нуклеиновая кислота в полицистронном векторе. В дополнительном варианте осуществления данного изобретения предлагаются клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном таком варианте осуществления данного изобретения указанная клетка-хозяин содержит (например, была трансформирована):

- (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную

последовательность, содержащую VL-область антитела и аминокислотную последовательность, содержащую VH-область антигенсвязывающей полипептидной конструкции, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL-область антигенсвязывающей полипептидной конструкции, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VH-область антигенсвязывающей полипептидной конструкции. В одном варианте осуществления данного изобретения указанная клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, например, клетку яичника китайского хомяка (СНО) или эмбриональную клетку почки человека (НЕК) или лимфатическую клетку (например, клетку Y0, NS0, Sp20). В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается способ получения антитела, при этом указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как описано выше, в условиях, пригодных для экспрессии антитела, и, в некоторых случаях, извлечение антитела из клетки-хозяина (или среды, в которой культивируют клетку-хозяина).

Для рекомбинантного получения указанного антитела, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, описанную выше, выделяют и вставляют в один или большее количество векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такую нуклеиновую кислоту легко выделить и сиквенировать с помощью общепринятых методик (например, с применением олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Термин " по существу очищенные" относится к конструкции, описанной в данном документе, или ее вариантам, которые по существу или по сути могут не содержать компонентов, которые обычно сопутствуют или взаимодействуют с белком, который находится в естественном для него окружении, то есть применение нативной клетки или клетки-хозяина в случае получения гетеромультимера методами рекомбинации, который в определенных вариантах осуществления данного изобретения по существу не содержит клеточного материала, обеспечивает получение препаратов белка, содержащих менее, чем около 30 %, менее, чем около 25 %, менее, чем около 20 %, менее, чем около 15 %, менее, чем около 10 %, менее, чем около 5 %, менее, чем около 4 %, менее, чем около 3 %, менее, чем около 2 % или менее, чем около 1 % (от сухого веса) белковых примесей. Когда указанный гетеромультимер или его варианты получают методами рекомбинации с применением клеток-хозяев, в определенных вариантах осуществления данного изобретения содержание белка составляет около 30 %, около 25 %, около 20 %, около 15 %, около 10 %, около 5 %, около 4 %, около 3 %, около 2 % или около 1 % или меньше в пересчете на сухой вес клеток. Когда указанный гетеромультимер или его варианты получают методами рекомбинации с применением клеток-хозяев, в определенных вариантах осуществления данного изобретения содержание белка в культуральной среде составляет около 5 г/л, около 4 г/л, около

3 г/л, около 2 г/л, около 1 г/л, около 750 мг/л, около 500 мг/л, около 250 мг/л, около 100 мг/л, около 50 мг/л, около 10 мг/л или около 1 мг/л или меньше в пересчете на сухой вес клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения "очищенный по существу" гетеромультимер, полученный с помощью способов, описанных в данном документе, имеет

5 уровень чистоты, составляющий по меньшей мере около 30 %, по меньшей мере около 35 %, по меньшей мере около 40 %, по меньшей мере около 45 %, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60 %, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70 %, в частности, имеет уровень чистоты, составляющий по меньшей мере около 75

10 %, 80 %, 85 % и, более конкретно, имеет уровень чистоты, составляющий по меньшей мере около 90%, уровень чистоты, составляющий по меньшей мере около 95 %, уровень чистоты, составляющий по меньшей мере около 99% или более, что определено с помощью соответствующих способов, такими как ДСН-ПААГ-анализ, ОФ-ВЭЖХ, ЭХ и капиллярный электрофорез.

Клетки-хозяева, пригодные для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитело,

15 включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в данном документе.

Термин "рекомбинантная клетка-хозяин" или "клетка-хозяин" относится к клетке, которая включает экзогенный полинуклеотид, независимо от способа, применяемого для вставки, например, прямое поглощение, трансдукция, конъюгация с использованием f-фактора или другие способы, известные в данной области техники, для получения рекомбинантной клетки-

20 хозяина. Экзогенный полинуклеотид может существовать как неинтегрированный вектор, например, плаزمид, или в альтернативном варианте, может интегрироваться в геном хозяина. Клетки-хозяева могут включать CHO, производные CHO, NS0, Sp2O, CV-1, VERO-76, HeLa, НерG2, Per.C6 или ВНК.

В данном контексте термин "эукариот" относится к организмам, принадлежащим к

25 филогенетической группе Eucarya, таким как, например, животным (включая, но не ограничиваясь ими, млекопитающих, насекомых, рептилий, птиц и т.д.), инфузориям, растениям (включая, но не ограничиваясь ими, однодольные растения, двудольные растения, водоросли и т.д.), грибам, дрожжевым грибам, жгутиковым, микроспоридам, простейшим и т.д.

В данном контексте термин "прокариот" относится к прокариотическим организмам. Например,

30 организм, отличный от эукариотического, может принадлежать к филогенетической группе Eubacteria (включая, но не ограничиваясь ими, Escherichia coli, Thermophilus, Bacillusstearothermophilus, Pseudomonasfluorescens, Pseudomonasaeruginosa, Pseudomonasputida и т.д.) или филогенетической группе Archaea (включая, но не ограничиваясь ими, Methanococcus jannaschii, Methanobacterium thermoautotrophicum, Halobacterium, таким как, например, Haloferax

35 volcanii и вид NRC-1 Halobacterium, Archaeoglobus fulgidus, Pyrococcus furiosus, Pyrococcus horikoshii, Acetopyrum pemix и т.д.).

Например, антитело можно продуцировать в бактериях, в особенности, если гликозилирование и эффекторная функция Fc не являются необходимыми. Касательно экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, патенты США №№ 5648237, 5789199 и 5840523. (См. также публикации Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (В.К.С. Lo, ed.,  
5 Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254, в которых описана экспрессия фрагментов антител в *E. coli*.) После экспрессии антитело может быть выделено из пасты бактериальных клеток в растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

В дополнение к прокариотам, пригодными хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитело, являются эукариотические микроорганизмы, например,  
10 мицелиальные грибы или дрожжи, в том числе штаммы грибов и дрожжей с “гуманизированными” путями гликозилирования, которые позволяют получать антитело с частично или полностью человеческой моделью гликозилирования. См. публикации Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) и Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Пригодные для экспрессии гликозилированных антител клетки-хозяева также можно получить  
15 из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, которые можно применять в сочетании с клетками насекомых, особенно для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Кроме того, в качестве хозяев можно применять культуры клеток растений. См., например,  
20 патенты США № 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описывающие технологию PLANTIBODIES™ для продуцирования антител в трансгенных растениях).

Кроме того, в качестве хозяев можно применять клетки позвоночных. Например, можно применять клеточные линии млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии. Другими примерами пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почек обезьян, трансформированная SV40 (COS-7); эмбриональная линия почек человека (клетки 293 или 293, как описано, например, в публикации Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почек детенышей хомяка (ВНК); клетки сертоли мышцы (клетки ТМ4, как описано, например, в публикации Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA);  
30 клетки почки собаки (MDCK; клетки печени буйвола (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мыши (ММТ 060562); клетки TRI, как описано, например, в публикации Mather et al. *Annals NY Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982), клетки MRC 5 и клетки FS4. Другие пригодные линии клеток - хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), в том числе клетки DHFR<sup>-</sup> CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, пригодных для продуцирования антител, см.,  
35

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

В одном варианте осуществления данного изобретения антитела, описанные в данном документе, продуцируют в стабильных клетках млекопитающих с помощью способа, включающего: трансфекцию по меньшей мере одной стабильной клетки млекопитающего нуклеиновой кислотой, кодирующей антитело, в предварительно определенном соотношении; и экспрессию нуклеиновой кислоты по меньшей мере в одной клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное соотношение нуклеиновой кислоты заранее определяют в экспериментах по временной трансфекции для определения относительного соотношения вводимой нуклеиновой кислоты, которое бы приводило к получению наиболее высокого процентного содержания антитела в экспресированном продукте. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения описан способ продуцирования антитела в стабильных клетках млекопитающих, при этом продукт экспрессии по меньшей мере одной стабильной клетки млекопитающего включает больший процент желаемого гликозилированного антитела по сравнению с мономерными полипептидами тяжелой или легкой цепи, или других антител.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения описан способ продуцирования гликозилированного антитела в стабильных клетках млекопитающего, при этом указанный способ включает идентификацию и очистку желаемого гликозилированного антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная идентификация осуществляется с помощью одного или обоих методов: жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии.

При необходимости, указанные антитела могут быть очищены или выделены после экспрессии. Белки могут быть выделены или очищены с помощью различных способов, известных специалистам в данной области техники. Стандартные способы очистки включают хроматографические методы, включая ионообменную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, аффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию или гель-фильтрацию и обращенно-фазовую хроматографию, которые осуществляются при атмосферном давлении или высоком давлении, используя системы, такие как ЖХБР и ВЭЖХ. Способы очистки также включают методы электрофореза, иммунологические методы, преципитацию, диализ и методы хроматофокусирования. Также можно применять методы ультрафильтрации и диафильтрации в сочетании с концентрированием белка. Как хорошо известно в данной области техники, различные природные белки связываются с Fc и антителами, и эти белки могут найти применение в данном изобретении для очистки антител. Например, бактериальные белки A и G связываются с Fc-областью. Аналогичным образом, бактериальный белок L связывается с Fab-областью некоторых антител. Часто очистка может обеспечиваться

определенным партнером по слиянию. Например, антитела могут быть очищены с применением глутатионовой смолы, если для слияния используется GST, аффинной хроматографией с ионами Ni<sup>+2</sup>, если применяется His-зонд, или иммобилизации антител к flag, если применяется flag-зонд. Общее руководство по пригодным методам очистки см., например, в публикации Protein Purification: Principles and Practice, 3<sup>rd</sup> Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994, в полном объеме включенной в данный документ посредством ссылки. Степень очистки обязательно будет зависеть от применения антител. В некоторых случаях проводить очистку нет необходимости. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанные антитела очищают с применением анионообменной хроматографии, включая, но не ограничиваясь этим, хроматографию на колонках с Q-сефарозой, ДЭАЭ-сефарозой, poros HQ, poros DEAF, Toyopearl Q, Toyopearl QAE, Toyopearl DEAE, Resource/Source Q и DEAE, Fractogel Q и DEAE. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения белки, описанные в данном документе, очищают с помощью катионообменной хроматографии, включая, но не ограничиваясь этим, на колонках с SP-сефарозой, CM-сефарозой, poros HS, poros CM, Toyopearl SP, Toyopearl CM, Resource/Source S и CM, Fractogel S и CM и их эквивалентах и аналогах. Кроме того, антитела, описанные в данном документе, могут быть химически синтезированы с помощью методов, известных в данной области техники (например, см. публикации Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N.Y и Hunkapiller et al., Nature, 310:105-111 (1984)). Например, полипептид, соответствующий фрагменту полипептида, может быть синтезирован с помощью синтезатора пептидов. Кроме того, при желании, неклассические аминокислоты или химические аминокислотные аналоги могут быть введены в виде замены или вставки в полипептидную последовательность. Неклассические аминокислоты включают, но не ограничиваются ими, D-изомеры традиционных аминокислот, 2,4-диаминомасляную кислоту, альфа-аминоизомасляную кислоту, 4-аминомасляную кислоту, Abu, 2-аминомасляную кислоту, g-Abu, e-Ahx, 6-аминокапроновую кислоту, Aib, 2-аминоизомасляную кислоту, 3-аминопропионовую кислоту, орнитин, норлейцин, норвалин, гидроксипролин, саркозин, цитруллин, гомоцитруллин, цистеиновую кислоту, t-бутилглицин, t-бутилаланин, фенилглицин, циклогексилаланин, аланин, фторированные аминокислоты, сконструированные аминокислоты, такие как метиловые аминокислоты, C-метиловые аминокислоты, N-метиловые аминокислоты, а также аналоги аминокислот в целом. Кроме того, аминокислота может быть D (правовращающая) или L (левовращающая).

### Способы применения

В одном аспекте данной заявки предлагаются способы приведения в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом анти-TREM2, таким как антитело человека, что приводит к деактивации нестимулирующих миелоидных клеток.

В одном аспекте данной заявки предлагаются способы приведения в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом анти-TREM2 мыши, что приводит к деактивации нестимулирующих миелоидных клеток.

5 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие включают один или большее количество типов клеток, выбранных из клеток DC1 или клеток TAM.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагаются способы деактивации нестимулирующих миелоидных клеток, включающие приведение в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом TREM2, тем самым уничтожая нестимулирующие миелоидные  
10 клетки. Деактивация относится к частичной или полной нефункциональности клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения деактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к индукции задержки роста в указанных клетках. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения деактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к апоптозу в указанных клетках. В некоторых вариантах осуществления  
15 данного изобретения деактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к лизису клеток, например, из-за комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) или антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения деактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к некрозу в указанных клетках. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения деактивация  
20 нестимулирующих миелоидных клеток приводит к индукции задержки роста в указанных клетках. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения деактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к нарушению функции указанных клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения деактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к нейтрализации активности белка TREM2 в указанных клетках. В  
25 некоторых вариантах осуществления данного изобретения деактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к снижению пролиферации указанных клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения деактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к дифференцировке указанных клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения деактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к снижению  
30 способности клеток функционировать в качестве ингибирующих антигенпрезентирующих клеток или приводит к повышению способности клеток функционировать в качестве активирующих антигенпрезентирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения деактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к неправильной локализации указанной клеток в опухолевой ткани или в микроокружении опухоли (TME). В  
35 некоторых вариантах осуществления данного изобретения деактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к измененной пространственной организации клеток в ткани

опухоли или микроокружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения деактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к измененной временной экспрессии клеток в опухолевой ткани или ТМЕ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает удаление

5 нестимулирующих миелоидных клеток.

В любом и во всех аспектах деактивации нестимулирующих миелоидных клеток, как описано в данном документе, любое увеличение или уменьшение или изменение аспекта характеристики (характеристик) или функции (функций) сравнивается с клеткой, не контактирующей с антителом анти-TREM2.

10 В другом аспекте данной заявки предлагаются способы приведения в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом анти-TREM2, что приводит к модуляции функции нестимулирующих миелоидных клеток. Модуляция может представлять собой один или большее количество из следующих процессов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие включают один или большее количество типов

15 клеток, выбранных из клеток DC1, клеток TAM1 или клеток TAM2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения модуляция функции приводит к деактивации нестимулирующих миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения модуляция функции нестимулирующих миелоидных клеток приводит к увеличению способности клеток стимулировать как нативные, так и активированные CD8+ Т-

20 клетки, например, за счет увеличения способности нестимулирующих клеток перекрестно представлять опухолевый антиген на молекулах MHC1 наивным CD8+ Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения модуляция повышает стимулирующую функцию Т-клеток нестимулирующих миелоидных клеток, включая, например, способность клеток запускать сигналинг Т-клеточного рецептора (TCR), пролиферацию Т-клеток или производство цитокинов Т-клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения выживаемость нестимулирующей клетки снижается или пролиферация нестимулирующей клетки уменьшается. В одном варианте осуществления данного изобретения отношение стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам увеличивается.

В любом и во всех аспектах снижения функции нестимулирующих миелоидных клеток, как

30 описано в данном документе, любое увеличение или уменьшение или изменение аспекта характеристики (характеристик) или функции (функций) сравнивается с клеткой, не контактирующей с антителом анти-TREM2.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагаются способы уничтожения (также называемые индукцией гибели клеток) нестимулирующих миелоидных

35 клеток, включающие приведение в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом анти-TREM2, тем самым уничтожая нестимулирующие миелоидные клетки. В некоторых

вариантах осуществления данного изобретения уничтожение повышается по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками, которые не контактировали с антителом анти-TREM2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения приведение в контакт вызывает апоптоз в нестимулирующих миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения приведение в контакт вызывает апоптоз в нестимулирующих миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, включающей нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает удаление нестимулирующих миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения 10% - 80% клеток погибают. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения погибают по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% клеток.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагаются способы увеличения отношения стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам в популяции иммунных клеток, включающей стимулирующие миелоидные клетки и нестимулирующие миелоидные клетки, включающие приведение в контакт популяции иммунных клеток с антителом анти-TREM2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения отношение увеличивается относительно популяции клеток, которые не контактировали с антителом анти-TREM2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения отношение клеток DC2 к клеткам DC1 увеличивается. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения отношение клеток DC2 к клеткам TAM1 увеличивается. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения отношение клеток DC2 к клеткам TAM2 увеличивается. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения отношение клеток DC2 к клеткам TAM1 + TAM2 увеличивается. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения отношение клеток DC2 к клеткам TAM1 + DC1 увеличивается. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения отношение клеток DC2 к клеткам DC1 + TAM2 увеличивается. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения отношение клеток DC2 к клеткам DC1 + TAM1 + TAM2 увеличивается. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения отношение увеличивается по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения отношение стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам до контакта составляет от 0,001 : 1 до 0,1 : 1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения отношение стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам после контактирования составляет от 0,1 : 1 до 100 : 1.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения количество указанных нестимулирующих миелоидных клеток уменьшается. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные стимулирующие миелоидные клетки представляют собой клетки DC2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки уничтожаются, например, путем некроза или апоптоза. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нестимулирующие миелоидные клетки индуцируют для остановки роста. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пролиферация указанных нестимулирующих миелоидных клеток больше не происходит. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пространственная локализация нестимулирующих миелоидных клеток изменяется, и указанное отношение увеличивается в конкретной области ТМЕ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения временная экспрессия нестимулирующих миелоидных клеток изменяется, и отношение увеличивается в течение определенного времени в ходе развития опухоли.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения приведение в контакт происходит *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения приведение в контакт происходит *in vivo*. В некоторых конкретных вариантах осуществления данного изобретения приведение в контакт происходит *in vivo* у людей. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения приведение в контакт осуществляют путем введения антитела анти-TREM2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения индивидуум, получающий указанное антитело (например, человек), имеет рак.

В другом аспекте данного изобретения предлагаются способы лечения иммуноопосредованных патологических состояний (например, рака) у индивидуума, включающие введение указанному индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело анти-TREM2. В другом аспекте данного изобретения предлагаются способы усиления иммунного ответа у индивидуума, включающие введение указанному индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело анти-TREM2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эти способы дополнительно предлагаются в комбинации с другими сопутствующими препаратами, такими как препараты, блокирующие PDL, антитела анти-PD-1, антитела анти-PD-L1, антитела анти-PD-L2, препараты, блокирующие CTLA4, антитела анти-CTLA-4, препараты, генерализованно блокирующие контрольные точки, при этом блокируются ингибирующие молекулы на Т-клетках, адаптивная Т-клеточная терапия, CAR Т-клеточная терапия, препараты дендритных клеток и других клеток, а также обычные химиотерапевтические препараты.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает определение уровня экспрессии белка TREM2 в биологическом образце от индивидуума. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный

биологический образец включает в себя, но не ограничиваясь этим, жидкости организма, образец ткани, образец органа, мочу, кал, кровь, слюну, СМЖ и любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биологический образец получают из опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения уровень экспрессии включает уровень экспрессии мРНК мРНК, кодирующей белок TREM2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения уровень экспрессии белка TREM2 включает уровень экспрессии белка NSM. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения уровень экспрессии белка TREM2 определяют в образце с помощью способа выбранного из группы, состоящей из FACS, вестерн-блоттинга, ИФА, иммунопреципитации, иммуногистохимии, иммунофлуоресценции, радиоиммуноанализа, дот-блоттинга, способов иммунодетекции, ВЭЖХ, поверхностного плазмонного резонанса, оптической спектроскопии, масс-спектрометрии, ВЭЖХ, колПЦР, RT-колПЦР, мультиплексной колПЦР или RT-колПЦР, РНК-seq, микроматричного анализа, SAGE, методики MassARRAY, а также FISH и их комбинаций.

В другом аспекте данного изобретения предлагаются способы для определения наличия или отсутствия нестимулирующих миелоидных клеток в целом или для определения наличия или отсутствия конкретных нестимулирующих миелоидных клеток (например, клеток DC1, клеток TAM1 и/или клеток TAM2), включающие: приведение в контакт популяции клеток, содержащей нестимулирующие миелоидные клетки, с антителом анти-TREM2; и количественное определение уровня нестимулирующих миелоидных клеток. В другом аспекте данного изобретения предлагаются способы для определения наличия или отсутствия нестимулирующих миелоидных клеток, включающие: приведение в контакт популяции иммунных клеток, включающих нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки, с антителом анти-TREM2; обнаружение комплекса или фрагмента, указывающего на связывание антитела с клеткой, и, необязательно, количественное определение уровня нестимулирующих миелоидных клеток в популяции. В другом аспекте предлагаются способы определения относительного отношения нестимулирующих миелоидных клеток к стимулирующим миелоидным клеткам, включающие: приведение в контакт популяции иммунных клеток, включающих нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки, с антителом анти-TREM2; количественное определение уровня стимулирующих миелоидных клеток и нестимулирующих миелоидных клеток; и определение относительного отношения нестимулирующих миелоидных клеток к стимулирующим миелоидным клеткам.

В вариантах осуществления, описанных в данном документе для обнаружения и/или количественного определения, антитело анти-TREM2 связывается с белком TREM2, но не обязательно должно влиять на биологический ответ, такой как ADCC, хотя может оказывать влияние на биологический ответ.

В другом аспекте данного изобретения предлагаются способы идентификации индивидуума, который может отвечать на иммунотерапию (например, антителом анти-TREM2) для лечения иммуноопосредованного патологического состояния (например, рака), включающие:

5 определение уровня экспрессии белка TREM2 в биологическом образце, полученном от указанного индивидуума; и определение на основании уровня экспрессии белка TREM2 того, может ли индивидуум отвечать на иммунотерапию, при этом повышенный уровень белка TREM2 у индивидуума по сравнению с таковым у здорового индивидуума указывает на то, что индивидуум может отвечать на иммунотерапию. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эти способы также можно применять для диагностики иммуноопосредованного

10 патологического состояния (например, рака) у указанного индивидуума, на основе определения уровня экспрессии белка TREM2, при этом повышенный уровень белка TREM2 у индивидуума по сравнению с таковым у здорового индивидуума указывает на то, что индивидуум страдает от рака. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения уровень экспрессии включает уровень экспрессии мРНК мРНК, кодирующей белок TREM2. В других вариантах

15 осуществления данного изобретения уровень экспрессии белка TREM2 включает уровень экспрессии белка TREM2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения уровень экспрессии белка TREM2 определяют в образце с помощью способа выбранного из группы, состоящей из FACS, вестерн-блоттинга, ИФА, иммунопреципитации, иммуногистохимии, иммунофлуоресценции, радиоиммуноанализа, дот-блоттинга, способов иммунодетекции, ВЭЖХ, поверхностного плазмонного резонанса, оптической спектроскопии, масс-

20 спектрометрии, ВЭЖХ, колПЦР, RT-колПЦР, мультиплексной колПЦР или RT-колПЦР, РНК-seq, микроматричного анализа, SAGE, методики MassARRAY, а также FISH и их комбинаций. В этих вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-TREM2 связывается с белком TREM2, но не обязательно должно влиять на биологический ответ, такой как ADCC. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биологический образец получают из опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биологический образец включает, но не ограничиваясь этим, жидкость организма, образец ткани, образец органа, мочу, кал, кровь, слюну, СМЖ и любую их комбинацию.

25 Также в данном документе описан способ усиления иммунного ответа субъекта на опухоли или повышения эффективности иммунотерапевтического лечения. В целом, лечение, которое повышает количество SDC, будет улучшать исход у субъекта, такой как период выживания без рецидивов, и повышать эффективность иммунотерапевтического лечения рака. Лечение может повышать относительное или абсолютное количество клеток SDC в опухоли субъекта. Лечение может понижать относительное или абсолютное количество клеток NSM в опухоли субъекта.

30 Типовые способы общей стратегии лечения включают повышение количества SDC путем системного введения Flt3L. Другим способом является воздействие на аутологичных клеток

- костного мозга или крови субъекта посредством Flt3L с одновременной блокировкой CSF1. Экспрессию, например, с помощью ретровируса, транскрипционных факторов SDC, таких как IRF8, Mycl1 или BATF3 или ZBTB46, в популяциях клеток-предшественников костного мозга или клеток-предшественников гемопоэза также можно применять для стимулирования развития SDC. Другая стратегия лечения включает систематическую элиминацию клеток NSM при избирательном удержании SDC. Это может привести к общему благоприятному изменению в соотношении этих групп популяций. Элиминация клеток NSM может быть осуществлена с помощью любых способов, включая введение (системное или локализованное в опухоль) антител против поверхностных белков TREM2.
- 5
- 10 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения SDC-повышающее лечение применяют в качестве терапевтического лечения, чтобы дать больше возможностей нативной иммунной системе субъекта контролировать или искоренить рак. В другом варианте осуществления данного изобретения SDC-повышающее лечение по данному изобретению, применяется в комбинации с терапевтическим лечением, таким как иммунотерапевтическое
- 15 лечение (такое применение осуществляют до, одновременно или после иммунотерапевтического лечения), при этом SDC-повышающее лечение действует как дополнительное или вспомогательное лечение для повышения эффективности терапевтического лечения.

#### Способы введения

- В некоторых вариантах осуществления данного изобретения способы, представленные в данном документе, являются пригодными для лечения иммуноопределенного патологического
- 20 состояния у индивидуума. В одном варианте осуществления данного изобретения указанный индивидуум представляет собой человека, а антитело представляет собой антитело TREM2. В другом варианте осуществления данного изобретения указанный индивидуум представляет собой мышь, а антитело представляет собой антитело TREM2.
- 25 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения для введения *in vivo* антител анти-TREM2, описанных в данном документе, нормальные количества дозы могут варьировать от около 10 нг/кг до около 100 мг/кг веса тела индивидуума или более в сутки, предпочтительно около 1 мг/кг/сут до 10 мг/кг/сут, в зависимости от пути введения. Для повторных введений в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от тяжести заболевания или нарушения,
- 30 подлежащего лечению, лечение продолжают до тех пор, пока не будет достигнуто желаемое подавление симптомов. Типовая схема введения включает введение начальной дозы антитела анти-TREM2 около 2 мг/кг с последующей еженедельной поддерживающей дозой около 1 мг/кг каждую вторую неделю. Могут быть пригодны и другие схемы введения, в зависимости от характера фармакокинетического распада, которого желает достичь врач. Например, в данном
- 35 изобретении рассматривается введение дозы для индивидуума от одного до двадцати одного раза

в неделю. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения применяемая доза может составлять от около 3 мкг/кг до около 2 мг/кг (например, около 3 мкг/кг, около 10 мкг/кг, около 30 мкг/кг, около 100 мкг/кг, около 300 мкг/кг, около 1 мг/кг и около 2 мг/кг). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения частота введения дозы составляет три раза в день, два раза в день, один раз в день, один раз в два дня, один раз в неделю, один раз каждые четыре недели, один раз каждые пять недель, один раз каждые шесть недель, один раз каждые семь недель, один раз каждые восемь недель, один раз каждые девять недель, один раз каждые десять недель или один раз в месяц, один раз в два месяца, один раз в три месяца или дольше.

5 Эффективность лечения можно контролировать с помощью обычных методик и анализов. Схема введения, включая вводимое антитело анти-TREM2, может изменяться во времени независимо от применяемой дозы.

10

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения способы, описанные в данном документе (такие как способы усиления иммунного ответа или воздействия на деактивацию нестимулирующих миелоидных клеток), являются пригодными для лечения рака, и при этом индивидуум, получающий антитело анти-TREM2 или антитело анти-TREM2 имеет рак.

15

Любой соответствующий рак можно лечить с помощью антител, описанных в данном документе. Рак может быть любой карциномой, аденокарциномой, раком мягких тканей, саркомой, тератомой, меланомой, лейкозом, лимфомой Ходжкина, неходжкинской лимфомой или раком головного мозга, известным в области медицины. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный рак представляет собой твердую раковую опухоль. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный рак представляет собой гемобластоз.

20 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный рак является уклончивым от иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный рак является иммунореактивным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный рак представляет собой меланому, карциному почек, гепатобилиарную карциному, плоскоклеточную карциному области головы и шеи (HNSC), рак поджелудочной железы, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря, глиобластому, рак предстательной железы, рак легкого, рак груди (молочной железы), рак яичника, рак желудка, рак почки, рак мочевого пузыря, рак пищевода, почечный рак, меланому, лейкоз, лимфому или мезотелиому.

25 В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный рак представляет собой рак толстого кишечника, рак поджелудочной железы или рак молочной железы.

30

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммуноопосредованное патологическое состояние представляет собой иммуноопосредованное патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией белка TREM2 на нестимулирующих миелоидных клетках (у людей) или экспрессией гомолога белка TREM2 у не относящихся к человеку видов.

35

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммуноопосредованное

патологическое состояние представляет собой иммуноопосредованное патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией белка TREM2 на нестимулирующих миелоидных клетках по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сверхэкспрессия мРНК TREM2 или белка TREM2 примерно в 2 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 25 раз, в 50 раз или в 100 раз выше по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное лечение усиливает иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения усиленный иммунный ответ представляет собой приобретенный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело предназначено для введения внутривенно, внутримышечно, подкожно, местно, перорально, трансдермально, внутривнутрибрюшинно, внутриорбитально, путем имплантации, путем ингаляции, интратекально, интравентрикулярно или интраназально. Для лечения рака можно вводить эффективное количество антитела анти-TREM2. Пригодная доза антитела анти-TREM2 может быть определена на основе типа рака, подлежащего лечению, типа антитела анти-TREM2, тяжести и течения рака, клинического состояния индивидуума, анамнеза болезни индивидуума и ответа на лечение, а также усмотрения лечащего врача.

## 20 **Виды комбинированной терапии**

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, вводят по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом. Любой пригодный дополнительный терапевтический агент может быть введен с антителом, описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанную иммунотерапию выбирают из ингибитора контрольной точки; ингибитора контрольной точки Т-клеток; антитела анти-PD1; антитела анти-PDL1; антитела анти-CTLA4; адоптивной Т-клеточной терапии; клеточной терапии CAR-T; вакцины из дендритных клеток; моноцитарной вакцины; антигенсвязывающего белка, который связывает как Т-клетку, так и антигенпрезентирующую клетку; двойного антигенсвязывающего белка ViTE; лиганда Toll-подобного рецептора; цитокина; цитотоксической терапии; химиотерапии; цитостатического агента, лучевой терапии; низкомолекулярного ингибитора; низкомолекулярного агониста; иммуномодулятора; эпигенетического модулятора, а также их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления

данного изобретения указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело, которое связывает белок или белки на поверхности опухолевых клеток.

Для лечения рака антитело анти-TREM2 можно комбинировать с одним или большим количеством антител, которые ингибируют белки иммунных контрольных точек. Особый  
5 интерес представляют белки иммунной контрольной точки, отображаемые на поверхности опухолевой клетки. Рецепторы иммунной контрольной точки, которые наиболее активно изучались в контексте клинической иммунотерапии рака, цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 4 (CTLA4 - cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen; также известный как CD152) и белок 1 запрограммированной смерти клетки (PD1 - programmed cell death protein  
10 1; также известный как CD279) - оба представляют собой ингибирующие рецепторы. Клиническая активность антител, которые блокируют любой из этих рецепторов, подразумевает, что противоопухолевый иммунитет может быть усилен на нескольких уровнях и что комбинаторные стратегии могут быть разумно разработаны, руководствуясь механистическими соображениями и доклиническими моделями.

15 Двумя лигандами для PD-1 являются лиганд 1 PD-1 (PD-L1; также известный как B7-H1 и CD274) и PD-L2 (также известный как B7-DC и CD273). PD-L1 экспрессируется на раковых клетках и посредством связывания с его рецептором PD-1 на Т-клетках ингибирует активацию/функцию Т-клеток. Ингибиторы, которые блокируют взаимодействие PD-1 с его родственными лигандами на раковых клетках, PD-L1 и PD-L2, могут приводить как к повышенной активации и  
20 функционированию Т-клеток, так и предотвращать уклонение раковых клеток от иммунной системы.

В некоторых вариантах осуществления белки иммунотерапии представляет собой агент, который препятствует связыванию PD-1 и PD-L1 или PD-L2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная иммунотерапия представляет собой антитело анти-PD1. В  
25 некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело представляет собой антитело анти-PD-L1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело представляет собой антитело анти-PD-L2.

В данной области техники известны различные антитела против PD-1, PD-L1 и PD-L2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой по меньшей мере одно из следующих: атезолизумаб (PD-L1), авелумаб (PD-L1), дурвалумаб (PD-L1), ниволумаб (PD-1), пембролизумаб (PD-1), цемиплимаб (PD-1), ипилимумаб (CTLA-4), тремелиумаб (CTLA-4) или любую их комбинацию.

Дополнительный терапевтический агент можно вводить любым пригодным способом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, описанное в данном документе, и дополнительный терапевтический агент включены в одну и ту же  
35 фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения

антитело, описанное в данном документе, и дополнительный терапевтический агент включены в разные фармацевтические композиции.

В тех вариантах осуществления данного изобретения, в которых антитело, описанное в данном документе, и дополнительный терапевтический агент включены в различные фармацевтические композиции, введение антитела может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения введение антитела, описанного в данном документе, и дополнительного терапевтического агента осуществляют в пределах около одного месяца друг от друга. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения введение антитела, описанного в данном документе, и дополнительного терапевтического агента осуществляют в пределах около одной недели друг от друга. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения введение антитела, описанного в данном документе, и дополнительного терапевтического агента осуществляют в пределах около одного дня друг от друга. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения введение антитела, описанного в данном документе, и дополнительного терапевтического агента осуществляют в пределах около двенадцати часов друг от друга. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения введение антитела, описанного в данном документе, и дополнительного терапевтического агента осуществляют в пределах около одного часа друг от друга.

### **Наборы и изделия**

В данной заявке предлагаются наборы, содержащие любую одну или большее количество композиций антител, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные наборы дополнительно содержат компонент, выбранный из любого из следующих составляющих: вторичных антител, реагентов для иммуногистохимического анализа, фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества и инструкции по применению, а также любой их комбинации. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения указанный набор включает фармацевтическую композицию, содержащую любую одну или большее количество композиций антител, описанных в данном документе, с одним или большим количеством фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

В данной заявке предлагаются изделия, содержащие любую из композиций или любой из наборов антител, описанных в данном документе. Примеры изделия включают флаконы (включая герметичные флаконы).

## ПРИМЕРЫ

Ниже рассматриваются конкретные варианты осуществления данного изобретения. Примеры приводятся исключительно в иллюстративных целях и никоим образом не направлены на ограничение объема данного изобретения. Были предприняты усилия для того, чтобы обеспечить 5 точность в отношении использованных чисел (например, количеств, температур и т. д.), однако, безусловно, необходимо делать поправку на некоторые экспериментальные ошибки и отклонения.

Если не указано иное, при практическом осуществлении данного изобретения применяются традиционные способы химии белков, биохимии, технологии рекомбинантных ДНК и 10 фармакологии, которые соответствуют данной области техники. Такие приемы подробно описаны в литературе. См., например, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical 15 Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry 3<sup>rd</sup> Ed.* (Plenum Press) Vols A and B (1992).

### Пример 1. Гуманизирование антитела анти-TREM2.

Гуманизирование клона # 237920

Моноклональный крысиный IgG<sub>2B</sub> клон # 237920 (R&D Systems Кат. № MAB17291), 20 специфичный для TREM2 мыши и человека, применяли для определения последовательности и гуманизации. Вкратце, дисульфидные связи в антителе восстанавливали дитиотреитолом (DTT), а свободные сульфгидрильные группы алкилировали йодацетамидом. Алкилированное антитело расщепляли эндопротеиназами уровня качества для сиквенирования, очищали с помощью спин-колонок и определяли последовательность с помощью анализа ЖХ-МС/МС. 25 Последовательности приведены ниже.

SEQ ID NO	Название	Последовательность
33	Крысиный IgG <sub>2B</sub> клон # 237920, тяжелая цепь	EVQLVESGGG LVQPGRSLKL SCAASGFTFS NYDMAWVRQA PTKGLEWVAS LTNSGGSTYY RDSVKGRFTL SRDNAKSTLY LQMDSLRSED TATYYCTREW AGSGYFDYWG QGVMVTVSSA QTTAPSVYPL APGCGDTTSS TVTLGCLVKG YFPEPVTVTW NSGALSSDVH TFAVLQSGL YTLTSSVTSS TWPSQTVTCN

		VAHPASSTKV DKKVERRDGG IGHKCPTCPT CHKCPVPELL GGPSVFLFPP KPKDILLLSQ NAKVTCVVVD VSEEEP DVQF SWFVNNVEVH TAQTQPREEQ YNSTFRVVSA LPLQH QDWMS GKEFKCKVNN KALPSPIEKT LSKPKGLVRK PQVYVMGPPT EQLTEQTVSL TCLTSGFLPN DIGVEWTSNG HIEKNYK NTE PVMDS DGSFF MYSKLNVERS RWDSRAPFVC SVVHEGLH NH HVEKSLSRPP G
34	Крысиный IgG2B клон # 237920, легкая цепь	NIVMTQSPKS MSLSVGDRVT MNCKASQNVG NNLAWYQQKP GQSPKLLLYY TSNRFTGVPD RFTGGGYGTD FTLTINSVQA EDAAFYYCQR IYNPWF TFGG GTKLELKRAD AAPTVSIFPP STEQLATGGA SVVCLMNNFY PRDISVKWKI DGTERRDGV L DSVTDQDSKD STYSMSSTLS LTKADYESHN LYTCEVVHKT SSSPVVKSFN RNEC

Последовательности VH и VL сравнивали с библиотеками известных последовательностей зародышевой линии человека на веб-сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>; Ye, J. et al. Nucleic Acids Research 41: W34- W40 (2013)). Применяемые базы данных представляли собой гены VH человека IMGT (F + ORF, 273 последовательности зародышевой линии) и гены VL kappa

человека IMGT (F + ORF, 74 последовательности зародышевой линии).  
Для 237920 VH, в качестве акцепторной последовательности была выбрана зародышевая линия IGHV3-23 человека (аллель 1), а область присоединения тяжелой цепи IGHJ4 (аллель 1) человека (ген J) была выбрана из последовательностей области присоединения человека, собранных в IMGT®, международной информационной системе ImMunoGeneTics ® (IMGT® the international ImMunoGeneTics information system®) [www.imgt.org](http://www.imgt.org) (основатель и директор: Marie-Paule Lefranc, Монпелье, Франция).

Для 237920 VL, в качестве акцепторной последовательности была выбрана зародышевая линия IGKV1-39 человека (аллель 1), а область присоединения легкой цепи IGKJ2 (аллель 1) человека (ген J) была выбрана из последовательностей области присоединения человека, собранных в IMGT®, международной информационной системе ImMunoGeneTics ® (IMGT® the international

ImMunoGeneTics information system®) [www.imgt.org](http://www.imgt.org) (основатель и директор: Marie-Paule Lefranc, Монпелье, Франция).

CDR были определены в соответствии с определением AbM (см. веб-сайт Dr. Andrew C. R. Martin [www.bioinf.org.uk/abs/](http://www.bioinf.org.uk/abs/) для ознакомления с таблицей, в которой сравниваются определения CDR).

- 5 Изменение положения каркаса зародышевой линии человека (то есть не-CDR остатков в VH и VL) на соответствующие родительские мышиные последовательности применяли, например, для оптимизации связывания гуманизированного антитела.

10 **В Таблице 1А** приведены VL, VH, и полноразмерные последовательности тяжелых и легких цепей гуманизированных версий mAb 237920, которые были созданы. 37017 является родительским гуманизированным клоном, из которого были созданы другие гуманизированные версии с помощью дополнительных мутаций. **В Таблице 1В** приведены последовательности CDR.

ТАБЛИЦА 1А		
SEQ ID NO	Название	Последовательность
1	37012_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMAWVRQAPGKG LEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGTLVTVSS
2	37012_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNNLAWYQQKPGKAPK LLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQRIYN SPWTFGQGTKLEIK
3	37013_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMAWVRQAPGKG LEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGTLVTVSS
4	37013_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCKASQNVGNNLAWYQQKPGKAP KLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQRI YNPWTFGQGTKLELK
5	37014_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMAWVRQAPGKG LEWVASLTNSGGSTYYADSVKGRFTLSRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGTLVTVSS
6	37014_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNNLAWYQQKPGKAPK LLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQRIYN SPWTFGQGTKLEIK

7	37017_VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSNYMAWVRQAPGKG LEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKEWAGSGYFDYWGQGLTVTVSS
8	37017_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNLAWYQQKPGKAPK LLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQRIYN SPWTFGQGTKLEIK
25	Полноразме рная 37012_H	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSNYMAWVRQAPGKG LEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
26	Полноразме рная 37012_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNLAWYQQKPGKAPK LLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQRIYN SPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTL SKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
27	Полноразме рная 37013_H	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSNYMAWVRQAPGKG LEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28	Полноразме рная 37013_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCKASQNVGNLAWYQQKPGKAP KLLYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQRI YNPWFQGGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTL S KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

29	Полноразмерная 37014_H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPGKG LEWVASLTNSGGSTYYADSVKGRFTLSRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	Полноразмерная 37014_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNLAWYQQKPKGKAPK LLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQRIYN SPWTFGQGTKLEIKRTVAAPS FIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
31	Полноразмерная 37017_H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPGKG LEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKEWAGSGYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	Полноразмерная 37017_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNLAWYQQKPKGKAPK LLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQRIYN SPWTFGQGTKLEIKRTVAAPS FIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Таблица 1В - CDR гуманизированных антител

ТАБЛИЦА 1В		
CDR	Последовательность	SEQ ID NO
CDR-H1	FSNYYMA	9

CDR-H2	SLTNSGGSTY	10
CDR-H3	EWAGSGY	11
CDR-L1	NVGNNLA	12
CDR-L2	YTSNRFT	13
CDR-L3	RIYNSPW	14

Выравнивание каркаса гуманизированных антител (SEQ ID NO: 7, 3, 5, 21, 6, 23 и 24, соответственно, в порядке перечисления)

## CDR-H1

EVQLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFTFSNYYMAWVRQAPGKGLEWVSSLTNSG  
5 GSTYY 60

## CDR-H2

EVQLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFTFSNYYMAWVRQAPGKGLEWVSSLTNSG  
GSTYY 60

## CDR-H3

10 EVQLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFTFSNYYMAWVRQAPGKGLEWVASLTNSG  
GSTYY 60  
3-23\*01

EVQLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGG  
STYY 60

15

## CDR-H1

ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEWAGSGYFDYWGQGTL  
VTVSS 119

## CDR-H2

20 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGTL  
VTVSS 119

## CDR-H3

ADSVKGRFTLSRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGTL  
VTVSS 119

25 3-23\*01 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK-----WGQGTLVTVSS  
109

## CDR-L1

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASQNVGNNLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSNRFT  
30 GVPS 60

CDR-L2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCKASQNVGNNLAWYQQKPGKAPKLLLYYTSNRF  
 TGVPS 60  
 1-39\*01

5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG  
 VPS 60

CDR-L1 RFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQRIYNPWTFGQGTKLEIK  
 107

10 CDR-L2 RFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQRIYNPWTFGQGTKLELK  
 107

1-39\*01 RFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQSYSTP---PFGQGTKLEIK  
 106

В домене VL, в CDR, Asn28, Asn31, Asn32 и Asn53 имеют низкий потенциал для  
 15 дезамидирования на основании последовательности и конформации. Asn93 обладает низким или  
 средним потенциалом дезамидирования и может демонстрировать низкий уровень этой  
 посттрансляционной модификации. В домене VH, Asn31 имеет низкий потенциал для  
 дезамидирования на основании последовательности и конформации. В CDR-H2, Asn53 имеет  
 20 средний потенциал для дезамидирования; для предотвращения посттрансляционной  
 модификации Asn53 может быть изменен на Gln, Ser или Ala, и при этом сохранение связывания  
 определяется экспериментально. В CDR-H3, Trp100 может подвергаться воздействию  
 растворителей и иметь потенциал для окисления, особенно в стрессовых условиях.

Расщепление эндопротеиназой в растворе

Для анализа сиквенирования mAb проводили расщепление моноклонального антитела (mAb)  
 25 эндопротеиназой в растворе. 50 мкг антитела восстанавливали с помощью DTT, алкилировали с  
 применением йодацетамида, ацетон осаждали и восстанавливали в воде в концентрации 1  
 мкг/мкл. Расщепление образца антитела в растворе осуществляли с помощью 5 отдельных  
 расщеплений ферментами: Asp-N, химотрипсином, эластазой, трипсином и пепсином, следуя  
 30 инструкциям производителя. Образцы затем лиофилизировали, ресуспендировали в 0,1% TFA и  
 очищали, применяя C18 Zip-Tip. Образцы затем высушивали путем вакуумного  
 центрифугирования и хранили замороженными до проведения масс-спектрометрического  
 анализа.

Масс-спектрометрия

Измерение интактной массы

35 Образец mAb денатурировали, восстанавливали и подкисляли. Затем белки анализировали с  
 помощью прибора для ВЭЖХ Agilent 1100, соединенного с масс-спектрометром Waters QToF

Ultima Global (LC-ESI-TOF MS). Соответствующие спектры ЖХ-МС обрабатывали (объединяли, вычитали, сглаживали и деконволютировали) с помощью программного обеспечения Waters MassLynx 4.1.

#### АНАЛИЗ ЖХ-МС/МС

- 5 Очищенные пептиды ресуспендировали в 0,1% муравьиной кислоте и половину каждого из расщеплений анализировали на анализаторе Orbitrap (Q-Exactive, Thermo Fisher Scientific), снабженном источником нано-электрораспыления и системой EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific). Пептиды наносили на колонку EASY-Spray 50 см (внутренний диаметр 75 мкм), заполненную смолой RepMap®RSLC 2 мкм C18 (Thermo Fisher Scientific) при давлении 800 бар.
- 10 Пептиды элюировали со скоростью 250 нл/мин, применяя градиент, установленный как 0-30% ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоте, в течение 60 мин. Пептиды вводили с помощью источника нано-электрораспыления ионов в масс-спектрометр Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific). Инструментальный метод состоял из одного полного сканирования МС (400–1600 м/з) в масс-анализаторе Orbitrap с мишенью автоматической регулировки усиления (AGC) 1E6,
- 15 максимальным временем ввода ионов 120 мс и разрешением 70 000 с последующими 10 зависимыми от данных МС/МС сканированиями с разрешением 17 500, АРУ-мишенью 5E5, максимальным временем ввода ионов 100 мс и одним микросканированием. Пороговое значение интенсивности для запуска сканирования МС/МС было установлено равным коэффициенту недозаполнения 1,0%. Фрагментация происходила в столкновительной ячейке HCD с
- 20 нормированной энергией столкновения, установленной на 30. Динамическое исключение применяли с настройкой 8 секунд.

**В таблице 2** приведены биофизические характеристики гуманизированных клонов. Молекулярная масса и коэффициент экстинкции оцениваются по сумме участвующих белковых цепей в четвертичной структуре. По умолчанию расчет предполагает равный и мономерный вклад от каждой цепи. Коэффициент экстинкции - это прогнозируемое поглощение при 280 нм на молярный белок в единицах  $M^{-1}cm^{-1}$ . Потенциальные посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование, фосфорилирование и протеолиз, не учитываются в оценках молекулярного веса или коэффициента экстинкции.

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

## Пример 2. Продуцирование и характеристика антител анти-TREM2.

### Продуцирование и характеристика антител

Стандартные векторы экспрессии белка трансфицировали в HEK293 с помощью стандартных способов, после чего клетки выращивали в течение 7 дней и собирали. В дополнение к HEK293, антитела также продуцировали в клетках 293, у которых дефицит  $\alpha$ 1,6-фукозилтрансферазы млекопитающих (FUT8) достигали путем редактирования CRISPR/Cas9 (Alexander Weiss, Университет Торонто). pH супернатанта регулировали с помощью 1M HEPES pH 7,4 и добавляли азид натрия для предотвращения роста микроорганизмов. Смола KanCap применяли для захвата белков, и антитела элюировали с применением 50 mM цитрата, pH 3,5, 100 mM NaCl после промывания PBS и PBS, содержащим 1 M хлорид натрия. Сразу после элюирования раствор нейтрализовали с помощью 1M трис (pH 8), содержащим 0,5M аргинина. Биофизическую характеристику проводили на белке, который был заменен буфером на PBS, с помощью стандартных методик. Белок определяли количественно по OD280, количество и концентрацию определяли, используя рассчитанный коэффициент экстинкции. Для определения чистоты и приблизительной молекулярной массы применяли восстановленную и невосстановленную систему SDS-PAGE (критерий Bio-rad Трис/Глицин/SDS, 4-20%) или систему капиллярного электрофореза Perkin Elmer GXII. Статус агрегации определяли с помощью ВЭЖХ с детектированием при 280 нм с применением эксклюзионной колонки Sepax Zenix-C SEC-300, 3 мкм, 300 Å, 4,6 \* 150 мм и рабочего буфера PBS.

Измерение аффинности антител с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

Кинетику связывания определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса с применением Biacore T200 (GE Healthcare, Великобритания) с TREM2 His человека (Sino Biological, Пекин, Китай) или захваченного на чипах серии S CM5 посредством захвата анти-His или TREM2 слитого белка IgG1 Fc человека (собственная SEC, очищенная до чистоты > 95%), непосредственно иммобилизованного на чипах с помощью аминного связывания. Последовательные разведения указанных антител вводили при 30 мкл/мин в течение 2 минут. Затем вводили PBS или системный буфер со скоростью 30 мкл/мин в течение 400 секунд, чтобы наблюдать диссоциацию. Реакции на связывание были скорректированы путем вычитания реакций в холостой проточной ячейке. Для кинетического анализа применяли модель Ленгмюра 1: 1 глобальной аппроксимации значений  $k_{on}$  и  $k_{off}$ . Значения  $K_d$  определяли из соотношений  $k_{on}$  и  $k_{off}$ .

В Таблице 3 продемонстрирована аффинность связывания антитела с TREM2-His человека, измеренная с помощью SPR.

Таблица 3					
Антитело	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$KD$ (М)	$R_{max}$ (RU)	$\chi^2$ (RU <sup>2</sup> )

PI37012	1,70E+06	8,69E-03	5,12E-09	30,2053	1,1785
PI37013	1,14E+06	5,49E-03	4,82E-09	33,8282	1,3772
PI37014	5,11E+05	2,43E-03	4,74E-09	34,5363	1,3754

**В Таблице 4** продемонстрирована аффинность связывания антитела с TREM2-Fc человека, измеренная с помощью SPR.

<b>Таблица 4</b>					
<b>Антитело</b>	<b>ka (1/Mc)</b>	<b>kd (1/c)</b>	<b>KD (M)</b>	<b>Rmax (RU)</b>	<b>Chi<sup>2</sup> (RU<sup>2</sup>)</b>
PI37012	4,96E+05	9,56E-04	1,93E-09	185,50	16,25
Afuc PI37012	4,47E+05	8,84E-04	1,98E-09	174,90	13,83
PI37013	5,17E+05	8,88E-04	1,72E-09	190,63	19,07
PI37014	4,71E+05	7,32E-04	1,55E-09	184,88	17,65
PI37017	3,40E+05	6,14E-03	1,80E-08	35,05	4,58

При низкой плотности лиганда (RL = 500 RU) кинетика связывания PI37017 с TREM2-Fc человека не приводила к надлежащей подгонке. Эти данные указывают на то, что А, присутствующая в положении 97, и К, присутствующая в положении 98 последовательности SEQ ID NO: 31 (клон 37017), вероятно, вызывают существенную потерю связывания TREM2 человека при гуманизации крысиного IgG<sub>2B</sub> клона # 237920. Мутация этих каркасных остатков (A97T и K98R) приводит к усилению связывания TREM2 человека гуманизированными клонами. См., например, клон 37012.

### **Пример 3: Клеточное связывание антител анти-TREM2**

Клеточное связывание (измерение EC50):

От 100000 до 500000 родительских клеток Epx1 293 или клеток Epx1 293 со сверхэкспрессией TREM2 человека или мыши высевали в 96-луночные планшеты, а мертвые клетки окрашивали с помощью Zombie Near Infrared (Biolegend). Титрования указанных неконъюгированных антител инкубировали с этими клетками в диапазоне от 0 мкг/мл до 10 мкг/мл в диапазоне разведений 1:3 в 8-10 точках. В зависимости от их изотипа (hIgG1 или mIgG2a) эти первичные неконъюгированные антитела обнаруживали с помощью конъюгированных с Alexa Fluor 647 вторичных антител против Fc человека или против Fc мыши (Jackson Immunoresearch). Сигнал Alexa Fluor 647 измеряли с помощью проточной цитометрии (BD Fortessa X-14, BD Biosciences). Значения EC 50 рассчитывали по сигналу подбора кривой, генерируемому антителами, связывающимися со сверхэкспрессирующими клетками, по сравнению с фоновой флуоресценцией, генерируемой родительскими клетками HEK293 в Graphpad Prism (Graphpad Software).

Эти данные указывают на то, что А, присутствующая в положении 97, и К, присутствующая в положении 98 последовательности SEQ ID NO: 31 (клон 37017), вероятно, вызывают существенную потерю связывания TREM2 человека при гуманизации крысиного IgG<sub>2B</sub> клона № 237920. Мутация этих каркасных остатков (A97T и K98R) приводит к усилению связывания TREM2 человека гуманизированными клонами. См., например, клон 37012.

**В Таблице 5** продемонстрировано связывание полумаксимального насыщения антител анти-TREM2 с клеточной поверхностью TREM2.

<b>Таблица 5</b>		
<b>Антитело</b>	<b>Линия клеток</b>	<b>EC50 (нМ)</b>
237920	Expri-mTREM2	0,9
237920	Expri-hTREM2	0,6
PI37012	Expri-mTREM2	0,5
PI37012	Expri-hTREM2	1,3
PI37013	Expri-mTREM2	1,2
PI37013	Expri-hTREM2	1,4
PI37013	Expri-mTREM2	1,2
PI37014	Expri-hTREM2	1,4
PI37017	Expri-mTREM2	3,6
PI37017	Expri-hTREM2	23,3

**Пример 4: PI-7012 повышает противоопухолевую активность в комбинации с анти-PD-1**

#### 10 Материалы и способы

Клетки CT26.WT (CRL-2638) были приобретены в Американской коллекции типовых культур (ATCC). Антитела для применения *in vivo* тестировали на эндотоксин и применяли в концентрации белка 0,2 ЕЭ/мг или ниже. Аминокислотную последовательность антитела против мышинового PD-1 из клона RMP1-14 (Absolute Antibody Inc., Cat # Ab00813-7.1) определяли с помощью масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС). Единственная точечная мутация [D265A] была введена в Fc-области версии мышинового IgG1 антитела RMP1-14 для устранения связывания с FcγR, как описано в литературе (Nimmerjahn and Ravetch 2005 Science 310: 1510-1512<sup>1</sup>). Изотипические контроли IgG1 мыши [клон MOPC-21] и IgG2a мыши [клон C1.18.4] были приобретены у BioXCell. PI-7012 и Afuc-PI-7012 (имеющие последовательности CDR PI37012 и муринизированные с применением формата IgG2a мыши) получали в клетках Expri293 (Thermo Fisher Scientific) или в клетках с нокаутом 293/FUT8 (Университет Торонто) соответственно в формате IgG2a мыши и очищали с применением смолы MabSelect Protein A (GE Life Sciences). Антитела элюировали 0,1 М цитратным буфером (pH 3,0) и заменяли буфер перед применением.

Все экспериментальные процедуры с участием живых животных были одобрены Институциональными комитетами по уходу за животными и их использованию в Murigenics. Самок мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель закупили у Taconic и использовали после одной недели акклиматизации в помещении для животных. Клетки CT26 собирали в пределах 3-7 субкультур после оттаивания из запаса жидкого азота и затем применяли для экспериментов *in vivo*. Правую вентрально-латеральную область самок мышей Balb/C брили и готовили для инъекции за день заранее. В день инокуляции опухоли, клетки собирали и использовали в течение 30 минут. Для установления подкожных опухолей,  $1 \times 10^6$  CT26 клетки имплантировали и мышей затем контролировали на предмет роста опухоли. Объемы опухолей рассчитывали полей измерений штангенциркулем размеров опухолей по формуле  $(L \times W^2)/2$ , где  $L$  представляет собой более длинное измерение. Когда опухоли достигли среднего размера 80-100 куб. мм, мышей рандомизировали в группы лечения, как показано в Таблице 6:

Таблица 6		
Группа	Лечение	Доза/Продолжительность
1	IgG2a + мыши	10 мг/кг +
	IgG1 мыши	5 мг/кг вн/бр, 1 р/5 дн x 4
2	IgG2a + мыши	10 мг/кг +
	анти-PD-1	5 мг/кг вн/бр, 1 р/5 дн x 4
3	анти-TREM2 [PI-7012] +	10 мг/кг +
	IgG1 мыши	5 мг/кг вн/бр, 1 р/5 дн x 4
4	анти-TREM2 [PI-7012] +	10 мг/кг +
	анти-PD-1	5 мг/кг вн/бр, 1 р/5 дн x 4
5	анти-TREM2 [PI-7012] +	10 мг/кг +
	IgG1 мыши	5 мг/кг вн/бр, 1 р/5 дн x 4
6	анти-TREM2 [PI-7012] +	10 мг/кг +
	анти-PD-1	5 мг/кг вн/бр, 1 р/5 дн x 4

Объемы опухолей и массу тела контролировали два раза в неделю и наносили на график для групповых сравнительных анализов с помощью однофакторного анализа ANOVA. Мышей умерщвляли, когда объем опухоли достигал около 2000 куб. мм, когда масса тела снижась более чем на 15% в ходе исследования или по другим причинам, связанным со здоровьем.

## Результаты

Мы определили, может ли аффинность связывания mAb с определенным FcγR посредством гликоинженерии (то есть путем генерирования афукозилированных версий mAb анти-TREM2) повышать противоопухолевую активность. PI-7012 и afuc-PI-7012 были протестированы в комбинации с анти-PD-1 на модели опухоли CT26. PI-7012 и afuc-PI-7012 продемонстрировали сходные уровни ингибирования роста опухоли (79% против 88% TGI). Применение afuc-PI-7012 привело к 30% -ному излечению. Как видно на **Фиг. 1А**, afuc-PI-7012 обладал повышенной противоопухолевой активностью в комбинации с анти-PD-1 по сравнению с PI-7012. Влияние афукозилирования PI-7012 на противоопухолевую активность было более отчетливо видно при анализе объемов опухолей у отдельных мышей (**Фиг. 1В** и **1С**). Это демонстрирует, что афукозилирование антитела анти-TREM2 обеспечивает значительное терапевтическое преимущество по сравнению с ядерно-фукозилированным антителом.

В ходе исследования не наблюдалось значительного снижения массы тела (**Фиг. 2**) ни в одной из групп лечения. Потеря массы тела обычно используется как суррогатный показатель токсичности, связанной с лечением. Эти данные указывают на то, что кратковременное или длительное лечение с применением антитела анти-TREM2 в качестве отдельного агента или в комбинации с анти-PD-1 хорошо переносилось и не сопровождалось какой-либо значительной токсичностью.

### **Пример 5: Отсутствие явной токсичности, связанной с терапией антителом анти-TREM2**

#### Материалы и способы

Ткани (легкие, печень, мозг, почки и сердце) у мышей, пролеченных согласно приведенного выше примера, помещали в 10% нейтральный буферный раствор формалина в течение по меньшей мере 24 часов, подвергали обычной обработке для гистологического исследования, нарезами на фрагменты толщиной 5-6 μm, и срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Окрашенные срезы исследовали с помощью световой микроскопии с малым увеличением (40-100x), и получали изображение с помощью HistoWiz. CD68-позитивные клетки детектировали с применением антитела анти-CD68 (AbD Serotec), и 8-9 полей срезов с увеличением 40 x количественно определяли с помощью светового микроскопа.

#### Результаты

Общий морфологический анализ путем окрашивания H&E тканей мыши (легких, печени, сердца, почек и мозга) после лечения не выявил каких-либо морфологических изменений при применении комбинации PI-7012, afuc-PI-7012 и анти-PD-1 у мышей по сравнению с мышами, получавшими изотипический контроль (**Фиг.3** демонстрирует окрашивание легочной ткани).

В дополнение к окрашиванию H&E, ткани также окрашивали с применением анти-CD68 на предмет обнаружения макрофагов. Внутриклеточный маркер CD68 широко описан в литературе как надежный цитохимический маркер для иммуноокрашивания моноцитов/макрофагов в воспаленных тканях и опухолях. В легком **Фиг. 4А**), а также в других проанализированных тканях не было обнаружено заметного изменения числа CD68+ макрофагов (**Фиг. 4В**) ни в одной из групп лечения по сравнению с контролем, что указывает на то, что анти-TREM2-опосредованное деплетирование происходило именно в ТМЕ.

### **Пример 6: Ограниченная экспрессия TREM2 в здоровых тканях мыши**

#### Материалы и способы

10 Все исследования на животных были одобрены Комитетом по изучению животных Murigenics. Мыши C57BL/6J-*Trem2<sup>em2A<sup>diu</sup></sup>*/J (далее называемые TREM2KO) и контрольные мыши C57BL/6J были из Jackson Laboratory. Целые легкие, селезенку и кости собирали и немедленно обрабатывали для проточной цитометрии. Параллельно собирали кровь посредством пункции сердца. Ткани обрабатывали до суспензии отдельных клеток с помощью наборов для диссоциации тканей Miltenyi MACS. Эритроциты лизировали с применением 1x лизисного буферного раствора для эритроцитов (Biolegend). Клетки окрашивали с помощью красителя Fixable Viability (ThermoFisher Scientific) перед обработкой для окрашивания клеточной поверхности. Иммунофенотипирующие антимышинные антитела разводили в буфере FACS (2% FBS, 2 mM ЭДТК, 1 × PBS) вместе с блоком Fc и окрашивали в течение 30 минут на льду. После окрашивания клетки дважды промывали буфером FACS и затем фиксировали в 2% параформальдегиде в PBS в течение 15 минут. Все данные собирали на проточном цитометре LSR Fortessa (BD) или проточном цитометре Attune (Thermo Fisher) и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo. Окрашивание клеток TREM2KO продемонстрировано на затушеванных графиках, окрашивание клеток дикого типа продемонстрировано на незатушеванных графиках.

#### Результаты

TREM2 экспрессируются на активированных макрофагах, незрелых дендритных клетках, остеокластах и микроглии<sup>2,3</sup>. Считается, что клетки, экспрессирующие высокие уровни TREM2, участвуют в иммунном надзоре, межклеточных взаимодействиях, очистке от тканевого дебриса и разрешении скрытых воспалительных реакций<sup>4</sup>. Отсутствие экспрессии TREM2 в этих клетках в результате нокдауна или нокаута гена ухудшает их способность фагоцитозировать клеточный дебрис, а также увеличивает продукцию регуляторных цитокинов<sup>5</sup>. В физиологических условиях наблюдается очень низкая или вообще не обнаруживаемая экспрессия TREM2 в периферической крови, селезенке, печени или легких, как видно на графиках FACS (**Фиг.5**). Однако если

легочные или печеночные макрофаги выделяют и окрашивают на предмет TREM2 в виде чистых клеточных популяций, экспрессия TREM2 становится детектируемой.

### **Пример 7: TREM2 преимущественно экспрессируется на TAM мыши**

Материалы и способы

- 5 Опухолевые ткани обрабатывали для выделения суспензии отдельных клеток с помощью стандартных способов. Вкратце, опухоли тонко измельчали бритвенными лезвиями и расщепляли в среде RPMI-1640, содержащей ферменты из наборов для диссоциации Miltenyi MACS. Опухоли обрабатывали в GentleMAC согласно рекомендациям производителя и инкубировали при 37 °C в течение около 40 минут. Смесь для расщепления гасили PBS,
- 10 содержащим 2 мМ ЭДТК и 2% фетальной бычьей сыворотки. Затем суспензию отдельных клеток пропускали через фильтр размером 70 мкм, после чего клетки промывали буфером FACS. После центрифугирования осадок клеток ресуспендировали в буфере FACS и окрашивали смесью антител для идентификации ассоциированных с опухолью макрофагов и других популяций иммунных клеток<sup>6</sup>. Окрашивание клеток TREM2KO продемонстрировано на затушеванных
- 15 графиках, окрашивание клеток дикого типа продемонстрировано на незатушеванных графиках.

Результаты

- Т-клетки, В-клетки, НК-клетки и другие популяции немиелоидных клеток, а также CD45-негативные клетки не экспрессируют детектируемую экспрессию TREM2 на клеточной поверхности. Однако субпопуляции миелоидных клеток, включая ассоциированные с опухолью
- 20 макрофаги (TAM) и клетки-супрессоры, полученные из миелоидных клеток (MDSC), экспрессируют TREM2 в различной степени на клеточной поверхности. Из типов клеток, которые являются положительными в отношении TREM2 в микроокружении опухоли, плотность экспрессии рецептора на TAM была значительно выше, чем в других типах клеток, независимо от происхождения опухоли (CT26 и MC38, продемонстрированные на Фиг.6).

- 25 **Пример 8. Ограниченная экспрессия TREM2 в лейкоцитах периферической крови человека.**

Материалы и способы

- Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и негативно отсортированные CD14+ моноциты, полученные от здоровых добровольцев, были предоставлены компанией AllCells Inc.
- 30 CD14+ моноциты дифференцировали *in vitro* согласно стандартного протокола<sup>5</sup>. CD14+ моноциты культивировали в полной культуральной среде, состоящей из среды RPMI-1640 с добавлением 2 мМ L-глутамин, 100 мкг на мл стрептомицин, 100 ед на мл пенициллина и 10% инактивированной нагреванием FBS. Для инициации дифференцировки на макрофаги, в среду добавляли 50 нг/мл M-CSF. Среду добавляли каждые 2–3 дня. Через 7 дней макрофаги собирали
- 35 с помощью пипетки, а адгерентные клетки собирали посредством последующей трипсинизации.

Затем клетки центрифугировали и ресуспендировали в RPMI-1640 с добавлением антибиотиков, 2% FBS и рекомбинантного IFN- $\gamma$  человека и 100 нг/мл LPS. Эти макрофаги окрашивали на поверхности параллельно с МКПК с применением стандартной миелоидной смеси для оценки окрашивания клеточной поверхности TREM2 в клеточных подгруппах. Клетки, окрашенные контрольным mAb, продемонстрированы на затушеванных графиках. Клетки, окрашенные анти-TREM2 mAb, продемонстрированы на незатушеванных графиках.

Результаты

Как видно на **Фиг. 7**, дифференцированные ex-vivo макрофаги демонстрируют значительно более высокую плотность рецепторов клеточной поверхности TREM2 по сравнению с любым типом МКПК-клеток. Подобно наблюдениям, опубликованным в литературе, моноциты и некоторые нейтрофилы экспрессируют более низкие уровни TREM2.

### **Пример 9: TREM2 преимущественно экспрессируется на TAM мыши**

Материалы и способы

Опухолевые ткани человека получали из Сети по вопросам тканей человека (CHTN). Свежие опухолевые ткани человека диссоциировали на суспензию отдельных клеток с помощью набора для диссоциации Miltenyi MACS и протокола gentleMACS. Суспензию отдельных клеток опухолевых тканей человека окрашивали на поверхности, применяя предварительно валидированную многоцветную панель FACS. Все данные собирали на проточном цитометре LSR Fortessa (BD) или проточном цитометре Attune (Thermo Fisher) и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo. Числа указывают индекс окрашивания для каждой популяции, определяемый как окрашивание анти-TREM2 минус окрашивание изотипического контроля.

Результаты

В микроокружении опухоли экспрессия TREM2 дифференциально экспрессируется до высоких уровней на TAM (**Фиг. 8**) по сравнению с другими клетками, что делает его трансляционно релевантным маркером для TAM. Представлены репрезентативные гистограммы окрашивания антител TREM2 (незатушеванный) или изотипического контроля (затушеванный) в различных клеточных популяциях при муцинозной аденокарциноме. В совокупности эти данные подтверждают гипотезу о том, что агенты, нацеленные на TREM2, будут способствовать специфическому деплетированию TAM при относительно низком или нулевом побочном воздействии на периферические клетки или другие резидентные для ткани иммунные субпопуляции.

### **Пример 10. Противоопухолевая эффективность антитела анти-TREM2 в комбинации с анти-PD-1 в моделях множественной сингенной опухоли.**

Материалы и способы

Клетки CT26.WT (CRL-2638), Py8119 (CRL-3278), 4T1 (CRL-2539) и EMT6 (CTL-2755) были приобретены в Американской коллекции типовых культур (ATCC). Клетки Рапс-02 применяли в AJES Life Sciences (Стони Брук, штат Нью-Йорк). Антитела для применения *in vivo* применяли в концентрации белка 0,2 ЕЭ/мг или ниже. Аминокислотную последовательность антитела против мышинового PD-1 из клона RMP1-14 определяли с помощью масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС). Единственная точечная мутация, D265A, была введена в Fc-область антитела RMP1-14 для устранения связывания с FcγR. Изотипические контроли IgG1 мыши [клон MOPC-21] и IgG2a мыши [клон C1.18.4] были приобретены у BioXCell. PI-7012 и afuc-PI-7012, оба в качестве мышинового IgG2a, были получены в клетках Expi293 (Thermo Fisher Scientific) или в клетках с нокаутом 293/FUT8, соответственно, и затем очищены с применением смолы MabSelect Protein A (GE Life Sciences). mAb элюировали 0,1 М цитратным буфером (pH 3,0) и заменяли буфер перед применением.

Все экспериментальные процедуры с участием живых животных были одобрены Институциональными комитетами по уходу и использованию животных в Murigenics. Самки мышей BALB/c или C57BL/6 (в возрасте 6-8 недель) были приобретены в Taconic или Jackson Laboratory и использовались после одной недели акклиматизации в помещении для животных. Клетки опухоли собирали в пределах 3-7 субкультур после оттаивания из запаса жидкого азота и затем применяли для экспериментов *in vivo*. Правую вентрально-латеральную область самок мышей брили и готовили для инъекции за день до инокуляции опухолевых клеток. В день инокуляции опухоли, клетки собирали и использовали в течение 30 минут. Для установления подкожных опухолей, клетки CT26, EMT6 или Рапс-02 в количестве  $1 \times 10^6$ , или клетки 4T1 в количестве  $1 \times 10^5$  имплантировали в соответствующие линии мышей, а затем за животными устанавливали наблюдение на предмет роста опухоли. Равные объемы суспензии отдельных клеток клеток Py8119 смешивали с Matrigel (Corning Cat # 354248 или 354263) перед имплантацией  $2 \times 10^6$  клеток на мышь.

Объемы опухолей рассчитывали после измерений штангенциркулем размеров опухолей по формуле  $(L \times W^2)/2$ , где L представляет собой более длинное измерение. Когда опухоли достигли среднего размера 80-100 куб. мм, мышей рандомизировали в группы лечения, как показано в **Таблице 7:**

Объемы опухолей и массу тела контролировали два раза в неделю и наносили на график для групповых сравнительных анализов с помощью однофакторного анализа ANOVA. Мышей умерщвляли, когда объем опухоли достигал  $\sim 2000$  куб. мм, или когда масса тела снижалась более чем на 15% в ходе исследования.

Таблица 7		
Группа	Лечение	Доза/Продолжительность

1	IgG1 мыши + IgG2a мыши	5 мг/кг + 15 мг/кг вн/бр, 1 р/5 дн x 4
2	Анти-PD-1 + IgG2a мыши	5 мг/кг + 15 мг/кг вн/бр, 1 р/5 дн x 4
3	IgG1 мыши + анти-TREM2	5 мг/кг + 15 мг/кг вн/бр, 1 р/5 дн x 4
4	Анти-PD-1 + Анти-TREM2	5 мг/кг + 15 мг/кг вн/бр, 1 р/5 дн x 4

### Результаты

Результаты приведены в **Таблице 8**. Ингибирование роста опухоли (% TGI) определяли в конце периода введения доз (t) по формуле:  $\%TGI = (1 - \{Tt/T0/Ct/C0\} / 1 - \{C0/Ct\}) \times 100$ , где Tt = средний объем опухоли, обработанной комбинацией, в момент времени t, T0 = средний объем опухоли, обработанной комбинацией, в момент времени 0, Ct = средний объем опухоли, обработанной изотипическим контролем, в момент времени t и C0 = средний объем опухоли, обработанной изотипическим контролем, в момент времени 0 (до начала лечения).

Таблица 8		
Модель	Линия	Активность
CT26 [CRC]	BALB/c	~ 50-85% TGI в CT26 при лечении в комбинации с анти-PD-1, а также 40-60% полного ответа
Pу8119 [TNBC]	C57BL/6	~ 56% TGI в комбинации с анти-PD-1
4T1 [TNBC]	BALB/c	~ 23% TGI в комбинации с анти-PD-1
EMT6 [молочная железа]	BALB/c	~ 63% TGI в сочетании с анти-PD-1 и 20% полного ответа
Panc02 [Поджелудочная железа]	C57BL/6	~ 63% TGI в комбинации с анти-PD-1

На **Фиг. 9A-F** продемонстрирована противоопухолевая активность анти-TREM2 PI-7012 или afuc-PI7012 в комбинации с анти-PD-1 в моделях множественных сингенных опухолей мышей. Применение анти-TREM2 mAb afuc-PI7012 в комбинации анти-PD-1 mAb приводило к значительной противоопухолевой активности в модели опухоли поджелудочной железы Panc-02. На **Фиг. 9A** продемонстрировано среднее +/- стандартное отклонение средних объемов опухолей 10 мышей в каждой группе. На **Фиг. 9B, 9C, 9D** и **9E** продемонстрированы объемы опухолей от отдельных животных в каждой группе лечения в динамике. На **Фиг. 9F** продемонстрирован статистический анализ средних объемов опухолей в группах на день 32 после имплантации. Различия в объемах опухолей между группами оценивали с помощью

статистического анализа, доступного в программном обеспечении Graph Pad Prism. Данные, полученные в исследовании подвергали однофакторному анализу ANOVA с последующим множественным сравнительному тесту Sidak.

5 Как видно на **Фиг. 9А** и **9D**, подкожная опухоль Panc-02 не отвечает ни на терапию одиночным блокатором иммунной контрольной точки с применением анти- PD-1 mAb, ни на терапию анти-TREM2 mAb afuc-PI-7012. Однако комбинированное лечение животных, имеющих опухоль Panc-02, с применением анти-TREM2 mAb afuc-PI-7012 и анти-PD-1 mAb приводило к значительному ингибированию роста опухоли.

10 Комбинированная терапевтическая стратегия, относящаяся к миелодным клеткам, наряду с реверсией истощения CD8 Т-клеток, опосредованной иммунной контрольной точкой, была протестирована на моделях множественных сингенных опухолей. Как продемонстрировано в **Таблице 8**, комбинация анти-TREM2 и анти-PD-1 mAb приводила к значительному ингибированию роста опухоли, а также к полной регрессии в некоторых из протестированных моделей опухолей. Важно отметить, что эти сингенные модели были выращены на двух разных  
15 линиях мышей (прототипные линии Th-1 C57BL/6 и Th-2 BALB/c), которые, как известно, имеют значительные различия в составе иммунных инфильтратов в опухолях, выращенных в этих линиях *in vivo*.

**Пример 11. Выявление долгосрочной противоопухолевой иммунной памяти у мышей, отвечающих на комбинированное лечение с применением анти-TREM2 mAb плюс анти-PD-1 mAb**  
20

Материалы и способы

Мышам BALB/c, которые не имели опухолей в предыдущих исследованиях после лечения с применением анти-TREM2 mAb плюс анти-PD-1 mAb, описанного в **Примере 9**, были повторно введены через три месяца опухолевые клетки CT26 в количестве  $1 \times 10^6$ . Объем опухоли измеряли  
25 в течение 25 дней после имплантации. Соответствующим по возрасту мышам, не получавшим лечения, вводили эквивалентное количество клеток CT26 и отслеживали рост опухоли в течение периода исследования. В течение периода исследования мыши не получали какого-либо дополнительного лечения.

**Результаты**

30 У мышей, которые были излечены от опухолей CT26 после лечения с применением комбинации анти-TREM2 mAb afuc-PI-7012 и анти-PD-1 mAb формировался эффективный ответ противоопухолевой памяти (**Фиг. 10**). Организм излеченных мышей был способен отклонить любой новый опухолевый рост даже в отсутствие дополнительной терапии, что указывает на длительную иммунную память против исходной имплантированной опухоли. Эта форма

долговременной иммунной памяти использует поддержание активной CD8 + эффекторной памяти.

### Литература

1. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Divergent Immunoglobulin G Subclass Activity Through Selective Fc Receptor Binding. *Science* (80-. ). **310**, 1510 LP-1512 (2005).
2. Ford, J. W. & McVicar, D. W. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 38–46 (2009).
3. Colonna, M. TREMs in the immune system and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 445 (2003).
4. Takahashi, K., Rochford, C. D. P. & Neumann, H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J. Exp. Med.* **201**, 647 LP-657 (2005).
5. Piccio, L. *et al.* Blockade of TREM-2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **37**, 1290–1301 (2007).
6. Broz, M.L. *et al.* Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell* **26**, 638–652 (2017).

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

Все ссылки, выданные патенты и патентные заявки, приведенные в основной части описания, тем самым включены посредством ссылки в полном объеме для любых целей.

## ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO	Название	Последовательность
1	37012_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPG KGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGTLTVSS
2	37012_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGNLAWYQQKPGK APKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQRIYNSPWTFGQGTKLEIK
3	37013_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPG KGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGTLTVSS
4	37013_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGNLAWYQQKPGK APKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQRIYNSPWTFGQGTKLEIK
5	37014_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPG KGLEWVASLTNSGGSTYYADSVKGRFTLSRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGTLTVSS
6	37014_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGNLAWYQQKPGK APKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQRIYNSPWTFGQGTKLEIK
7	37017_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPG KGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKEWAGSGYFDYWGQGTLTVSS
8	37017_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGNLAWYQQKPGK APKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQRIYNSPWTFGQGTKLEIK
9	CDR-H1	FSNYYMA
10	CDR-H2	SLTNSGGSTY
11	CDR-H3	EWAGSGY
12	CDR-L1	NVGNNLA
13	CDR-L2	YTSNRFT
14	CDR-L3	RIYNSPW

15	TREM2 белок человека	MEPLRLLILLFVTELSGAHNTTVFQGVAGQSLQVSCPYSMKH WGRRKAWCRQLGEKGPCQRVVSTHNLWLLSFLRRWNGSTAIT DDTLGGTLTITLRLNLPDAGLYQCQSLHGSEADTLRKVLVEV LADPLDHRDAGDLWFPGESESFEDAHVEHSISRSLLEGEIPFPPT SILLLLACIFLIKILAASALWAAAWHGQKPGTHPPSELDCGHDP GYQLQTLPLGRDT
16	TREM2 Нуклеотид (CDS)	ATGGAGCCTCTCCGGCTGCTCATCTTACTCTTTGTACAGAG CTGTCCGGAGCCCACAACACCACAGTGTCCAGGGCGTGGC GGCCAGTCCCTGCAGGTGCTTGCCCTATGACTCCATGAA GCACTGGGGGAGGCGCAAGGCCTGGTGCCGCCAGCTGGGAG AGAAGGGCCCATGCCAGCGTGTGGTCAGCACGCACAATTG TGGCTGCTGTCCTTCCCTGAGGAGGTGGAATGGGAGCACAGC CATCACAGACGATACCCTGGGTGGCACTCTCACCATTACGCT GCGGAATCTACAACCCCATGATGCGGGTCTCTACCAGTGCC AGAGCCTCCATGGCAGTGAGGCTGACACCCTCAGGAAGGTC CTGGTGGAGGTGCTGGCAGACCCCCTGGATCACCGGGATGC TGGAGATCTCTGGTTCCTCCGGGAGTCTGAGAGCTTCGAGG ATGCCCATGTGGAGCACAGCATCTCCAGGAGCCTCTTGGA GGAGAAATCCCCTTCCCACCACTTCCATCCTTCTCCTCCTG GCCTGCATCTTCTCATCAAGATTCTAGCAGCCAGCGCCCTC TGGGCTGCAGCCTGGCATGGACAGAAGCCAGGGACACATCC ACCCAGTGAAGTGGACTGTGGCCATGACCCAGGGTATCAGC TCCAAACTCTGCCAGGGCTGAGAGACACGTGA
17	TREM2 белок мышь	MGPLHQFLLLLITALSQALNTTVLQGMAGQSLRVSTYDALKH WGRRKAWCRQLGEEGPCQRVVSTHGVWLLAFLKKRNGSTVI ADDTLAGTVTITLKNLQAGDAGLYQCQSLRGREAEVLQKVLV EVLEDPLDDQDAGDLWVPESSSFEGAQVEHSTSRNQETSFPPT SILLLLACVLLSKFLAASILWAVARGRQKPGTPVVRGLDCGQD AGHQLQILTGPGGT
18	Рамка H1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMAWVRQAPG KGLEWVSSLTNSGGSTYY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEWAG SGYFDYWGQGLVTVSS
19	Рамка H2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMAWVRQAPG KGLEWVSSLTNSGGSTYY

		ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTREWAG SGYFDYWGQGLTVTVSS
20	Рамка H3	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMAWVRQAPG KGLEWVASLTNSGGSTYY ADSVKGRFTLSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTREWAG SGYFDYWGQGLTVTVSS
21	3-23*01 Рамка VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWGQG TLVTVSS
22	Рамка L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGNLAWYQQKPGK APKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQRIYNSPWTFGQGTKLEIK
23	Рамка L2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGNLAWYQQKPGK APKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYY CQRIYNSPWTFGQGTKLEIK
24	3-23*01 Рамка VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSYSTPPFGQGTKLEIK
25	Полноразм ерная 37012_H	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMAWVRQAPG KGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
26	Полноразм ерная 37012_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGNLAWYQQKPGK APKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQRIYNSPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

27	Полноразм ерная 37013_H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPG KGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
28	Полноразм ерная 37013_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVMTCKASQNVGNLAWYQQKPGK APKLLLYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYY CQRIYNPWTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
29	Полноразм ерная 37014_H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPG KGLEWVASLTNSGGSTYYADSVKGRFTLSRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	Полноразм ерная 37014_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQNVGNLAWYQQKPGK APKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQRIYNPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
31	Полноразм ерная 37017_H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPG KGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKEWAGSGYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

		TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFLYSLKLVTDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	Полноразмерная 37017_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSNRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQRIYNPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
33	Крысиный IgG2B клон # 237920, тяжелая цепь	EVQLVESGGG LVQPGRSLKL SCAASGFTFS NYMAWVRQA PTKGLEWVAS LTNSGGSTYY RDSVKGRFTL SRDNAKSTLY LQMDSLRS EDTATYYCTREW AGSGYFDYWG QGVMVTVSSA QTTAPSVYPL APGCGDTTSS TVTLGCLVKG YFPEPVTVTW NSGALSSDVH TFPAVLQSGL YTLTSSVTSS TWPSQTVTCN VAHPASSTKV DKKVERRDGG IGHKCPTCPT CHKCPVPELL GGPSVFLFPP KPKDILLLSQ NAKVTCVVVD VSEEEPDVQF SWFVNNVEVH TAQTQPREEQ YNSTFRVISA LPLQHGDWMS GKEFKCKVNN KALPSPIEKT LSKPKGLVRK PQVYVMGPPT EQLTEQTVSL TCLTSGFLPN DIGVEWTSNG HIEKKNYKNT E PVMDSGSEFF MYSKLNVERS RWDSRAPFVC SVVHEGLHNH HVEKSLSRPP G
34	Крысиный IgG2B клон # 237920,	NIVMTQSPKMSLSVSGDRVT MNCKASQNVGNLAWYQQKPGQSPKLLIYYTSNRFTGVPDRFTGGGGYGTDFLTINSVQA EDAAFYYCQR IYNPWTFGG

	легкая цепь	GTKLELKRAD APTVSIFPP STEQLATGGA SVVCLMNNFY PRDISVKWKI DGTERRDGVL DSVTDQDSKD STYSMSSTLS LTKADYESHN LYTCEVVHKT SSSPVVKSFN RNEC
--	----------------	--

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное гуманизированное антитело, которое связывается с TREM2 человека (SEQ ID NO: 15) и конкурирует за связывание с TREM2 мыши (SEQ ID NO: 17) с антителом 37017 (SEQ ID NO: 31 и 32).  
5
2. Выделенное гуманизированное антитело по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело содержит:
  - a. CDR-H1, содержащую последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 9,
  - b. CDR-H2, содержащую последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10,
  - 10 c. CDR-H3, содержащую последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 11,
  - d. CDR-L1, содержащую последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 12,
  - e. CDR-L2, содержащую последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 13, и
  - f. CDR-L3, содержащую последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 14.
3. Выделенное антитело по п. 2, отличающееся тем, что указанное антитело является афукозилированным и содержит последовательность VH, продемонстрированную в SEQ ID NO: 1; последовательность VL, продемонстрированную в SEQ ID NO: 2; и активную Fc-область IgG1 человека.  
15
4. Выделенное антитело по п. 2, отличающееся тем, что указанное антитело содержит последовательность VH, содержащую замену А на Т в положении 97 последовательности, продемонстрированной в SEQ ID NO: 7; и замену К на R в положении 98 последовательности, продемонстрированной в SEQ ID NO: 7.  
20
5. Выделенное антитело по п. 3, отличающееся тем, что указанное антитело содержит последовательность VH, продемонстрированную в SEQ ID NO: 1, 3 или 5.
6. Выделенное антитело по п. 5, отличающееся тем, что указанное антитело содержит последовательность VH, продемонстрированную в SEQ ID NO: 1, 3 или 5, и последовательность VL, продемонстрированную в SEQ ID NO: 2, 4 или 6.  
25
7. Выделенное антитело по п. 3, отличающееся тем, что указанное антитело содержит последовательность VH, продемонстрированную в SEQ ID NO: 1.
8. Выделенное антитело по п. 7, отличающееся тем, что указанное антитело содержит последовательность VH, продемонстрированную в SEQ ID NO: 1, и последовательность VL, продемонстрированную в SEQ ID NO: 2.  
30

9. Выделенное антитело по п. 8, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой антитело 37012.
10. Выделенное антитело по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело содержит последовательность тяжелой цепи, продемонстрированную в SEQ ID NO: 25, и последовательность легкой цепи, продемонстрированную в SEQ ID NO: 26.
11. Выделенное антитело, которое связывается с TREM2 человека (SEQ ID NO: 15), при этом указанное антитело
- i)* конкурирует за связывание с TREM2 мыши (SEQ ID NO: 17) с антителом 37017 (SEQ ID NO: 31 и 32); а также
  - ii)* содержит активную Fc-область человека.
12. Выделенное гуманизованное антитело, при этом указанное антитело содержит:
- a. CDR-H1, содержащую последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 9,
  - b. CDR-H2, содержащую последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10,
  - c. CDR-H3, содержащую последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 11,
  - d. CDR-L1, содержащую последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 12,
  - e. CDR-L2, содержащую последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 13, и
  - f. CDR-L3, содержащую последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 14.
13. Выделенное антитело по п. 12, отличающееся тем, что указанное антитело содержит последовательность VH, содержащую замену А на Т в положении 97 последовательности, продемонстрированной в SEQ ID NO: 7; и замену К на R в положении 98 последовательности, продемонстрированной в SEQ ID NO: 7.
14. Выделенное антитело по п. 13, отличающееся тем, что указанное антитело содержит последовательность VH, продемонстрированную в SEQ ID NO: 1, 3 или 5.
15. Выделенное антитело по п. 14, отличающееся тем, что указанное антитело содержит последовательность VH, продемонстрированную в SEQ ID NO: 1, 3 или 5, и последовательность VL, продемонстрированную в SEQ ID NO: 2, 4 или 6.
16. Выделенное антитело по п. 15, отличающееся тем, что указанное антитело содержит последовательность VH, продемонстрированную в SEQ ID NO: 1.
17. Выделенное антитело по п. 16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит последовательность VH, продемонстрированную в SEQ ID NO: 1, и последовательность VL, продемонстрированную в SEQ ID NO: 2.

18. Выделенное антитело по п. 17, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой антитело 37012.
19. Выделенное антитело по п. 12, отличающееся тем, что указанное антитело содержит последовательность тяжелой цепи, продемонстрированную в SEQ ID NO: 25, и последовательность легкой цепи, продемонстрированную в SEQ ID NO: 26.
20. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с TREM2 человека с  $K_D$ , меньшим или равным около 1, 2, 3, 4 или  $5 \times 10^{-9}$  М, которая измерена с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR).
21. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело способно специфически уничтожать, деплетировать или деактивировать TREM2+ миелоидные клетки; необязательно нестимулирующие миелоидные клетки; необязательно внутриопухолевые миелоидные клетки.
22. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело обладает активностью индукции антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).
23. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело обладает активностью индукции антитело-опосредованного клеточного фагоцитоза (ADCP).
24. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело обладает комплементзависимой цитотоксической активностью (CDC).
25. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой по меньшей мере одно из следующего: моноклональное антитело, нейтральное антитело, антагонистическое антитело, агонистическое антитело, поликлональное антитело, антитело IgG1, антитело IgG3, афукозилированное антитело, биспецифическое антитело, антитело человека, химерное антитело, полноразмерное антитело и его антигенсвязывающий фрагмент.
26. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой моноклональное антитело.
27. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой мультиспецифическое антитело.
28. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой афукозилированное антитело.

29. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой его антигенсвязывающий фрагмент, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, (scFv)<sub>2</sub>, молекулу одноцепочечного антитела, антитело с двойным переменным доменом, антитело с одним переменным доменом, линейное антитело или антитело с V-доменом.
- 5 30. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело содержит каркас, необязательно при этом указанный каркас представляет собой Fc, необязательно Fc человека.
31. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи класса, выбранного из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.
- 10 32. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи подкласса, выбранного из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.
33. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG1.
- 15 34. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или большее количество модификаций, при этом одна или большее количество модификаций приводят к увеличению периода полужизни, повышенной ADCC-активности, повышенной ADCP-активности или повышенной CDC-активности по сравнению с Fc, не содержащей одну или большее количество модификаций.
- 20 35. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанная Fc-область связывает рецептор Fcγ, выбранный из группы, состоящей из: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa и FcγRIIIb.
36. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов для применения при лечении рака, отличающееся тем, что указанный рак выбирают из твердой опухоли и гематологической опухоли.
- 25 37. Выделенное антитело, которое конкурирует за связывание с TREM2 человека с антителом по любому из предыдущих пунктов.
38. Выделенное антитело, которое связывает эпитоп TREM2 человека, связанный антителом по любому из предыдущих пунктов.
- 30 39. Выделенный полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующих антитело по любому из предыдущих пунктов, его VH, его VL, его легкую цепь, его тяжелую цепь или его

антигенсвязывающую часть; необязательно при этом указанный полинуклеотид или набор полинуклеотидов представляют собой кДНК.

40. Вектор или набор векторов, содержащие полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. 39.
- 5 41. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. 39 или вектор или набор векторов по п. 40.
42. Способ получения антитела, включающий экспрессию указанного антитела в клетке-хозяине по п. 41, и выделение экспрессированного антитела.
- 10 43. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1 - 38 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество
44. Способ лечения или профилактики заболевания или патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества антитела по любому из пп. 1 - 38 или фармацевтической композиции по п. 43.
- 15 45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что указанное заболевание или патологическое состояние представляет собой рак.
46. Способ по п. 44, отличающийся тем, что указанное антитело связывается с внеклеточным доменом из TREM2 на TREM2+ миелоидных клетках, необязательно при этом миелоидные клетки являются внутриопухолевыми.
- 20 47. Способ по п. 44, отличающийся тем, что указанное антитело связывается с внеклеточным доменом TREM2 на миелоидных клетках, при этом миелоидные клетки являются нестимулирующими миелоидными клетками, которые представляют собой CD45+, HLA-DR+, CD11c+, CD14+ и BDCA3-, при этом указанное антитело уничтожает, деактивирует или деплетирует нестимулирующие миелоидные клетки посредством ADCC, CDC и/или ADCP до уровня, который является ниже уровня нестимулирующих миелоидных клеток, присутствующих в тканях рака до контакта нестимулирующих миелоидных клеток с указанным антителом, при этом нестимулирующие миелоидные клетки присутствуют в популяции иммунных клеток, включающей стимулирующие миелоидные клетки, которые представляют собой CD45+, HLA-DR+, CD14-, CD11c+, BDCA1- и BDCA3+ и нестимулирующие миелоидные клетки, и при этом посредством уничтожения, деактивации или деплетирования нестимулирующих миелоидных клеток лечат рак.
- 25 30 48. Способ по п. 44, отличающийся тем, что указанное антитело обладает активностью индуцирования антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).

49. Выделенное антитело по п. 44, отличающееся тем, что указанное антитело обладает активностью индуцирования комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).
50. Выделенное антитело по п. 44, отличающееся тем, что указанное антитело обладает активностью индуцирования антитело-опосредованного фагоцитоза (ADCP).
- 5 51. Способ по п. 44, отличающийся тем, что указанное антитело обладает активностью блокирования взаимодействия рецептор-лиганд, агонистической или антагонистической активностью.
52. Способ по любому из пп. 44-51, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой человека.
- 10 53. Способ по любому из пп. 44-52, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой твердую опухоль.
54. Способ по любому из пп. 44-52, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой гемобластоз.
55. Способ по любому из пп. 44-52, отличающийся тем, что указанный рак выбирают из группы, состоящей из меланомы, карциномы почек, гепатобилиарной карциномы, плоскоклеточной карциномы области головы и шеи (HNSC), рака поджелудочной железы, рака толстого кишечника, рака мочевого пузыря, глиобластомы, рака предстательной железы, рака легкого, рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, рака почек, рака мочевого пузыря, рака пищевода, почечного рака, меланомы и мезотелиомы.
- 15
- 20 56. Способ по п. 55, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой рак толстой кишки или рак молочной железы.
57. Способ по любому из пп. 44-56, отличающийся тем, что приведение в контакт усиливает иммунный ответ у субъекта.
58. Способ по п. 57, отличающийся тем, что указанный усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ.
- 25
59. Способ по п. 57, отличающийся тем, что указанный усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.
60. Способ по любому из пп. 44-59, отличающийся тем, что указанный субъект ранее получал, одновременно получает или впоследствии получит иммунотерапию.
- 30 61. Способ по п. 60, отличающийся тем, что указанная иммунотерапия представляет собой по меньшей мере одно из следующих: ингибитор контрольной точки; ингибитор контрольной точки Т-клеток; антитело анти-PD1; антитело анти-PDL1; антитело анти-CTLA4; адоптивная

- Т-клеточная терапия; клеточная терапия CAR-T; вакцина из дендритных клеток; моноцитарная вакцина; антигенсвязывающий белок, который связывает как Т-клетку, так и антигенпрезентирующую клетку; двойной антигенсвязывающий белок ViTE; лиганд Toll-подобного рецептора; цитокин; цитотоксическая терапия; химиотерапия; лучевая терапия; низкомолекулярный ингибитор; низкомолекулярный агонист; иммуномодулятор; и эпигенетический модулятор.
- 5
62. Способ по п. 61, отличающийся тем, что указанная иммунотерапия представляет собой анти-PD1 антитело.
63. Способ уничтожения, деактивации или деплетирования TREM2+ миелоидных клеток у субъекта, страдающего раком, включающие приведение в контакт указанных миелоидных клеток с антителом по любому из пп. 1- 38 или фармацевтической композицией по п. 43, необязательно при этом миелоидные клетки являются внутриопухолевыми.
- 10
64. Способ по п. 63, отличающийся тем, что указанное антитело связывается с внеклеточным доменом TREM2, при этом миелоидные клетки являются нестимулирующими миелоидными клетками, которые представляют собой CD45+, HLA-DR+, CD11c+, CD14+ и BDCA3-, при этом указанное антитело уничтожает, деактивирует или деплетировывает нестимулирующие миелоидные клетки посредством ADCC, CDC и/или ADCP до уровня, который является ниже уровня нестимулирующих миелоидных клеток, присутствующих в тканях рака до контакта нестимулирующих миелоидных клеток с указанным антителом, при этом нестимулирующие миелоидные клетки присутствуют в популяции иммунных клеток, включающей стимулирующие миелоидные клетки, которые представляют собой CD45+, HLA-DR+, CD14-, CD11c+, BDCA1-и BDCA3+ и нестимулирующие миелоидные клетки, и при этом приведение в контакт по существу не уничтожает, не деактивирует или не деплетировывает миелоидные клетки, присутствующие вне раковой ткани, и/или стимулирующие миелоидные клетки, присутствующие в ткани рака, и при этом посредством уничтожения, деактивации или деплетирования нестимулирующих миелоидных клеток лечат рак путем усиления противоракового иммунного ответа.
- 15
- 20
- 25
65. Способ по п. 63, отличающийся тем, что указанное антитело уничтожает миелоидные клетки по меньшей мере посредством одного из следующих механизмов: ADCC, CDC и ADCP.
- 30
66. Способ по п. 63, отличающийся тем, что указанное антитело деактивирует миелоидные клетки по меньшей мере посредством одного из следующих механизмов: ADCC, CDC и ADCP.
67. Способ по п. 63, отличающийся тем, что указанное антитело деплетировывает миелоидные клетки по меньшей мере посредством одного из следующих механизмов: ADCC, CDC и ADCP.

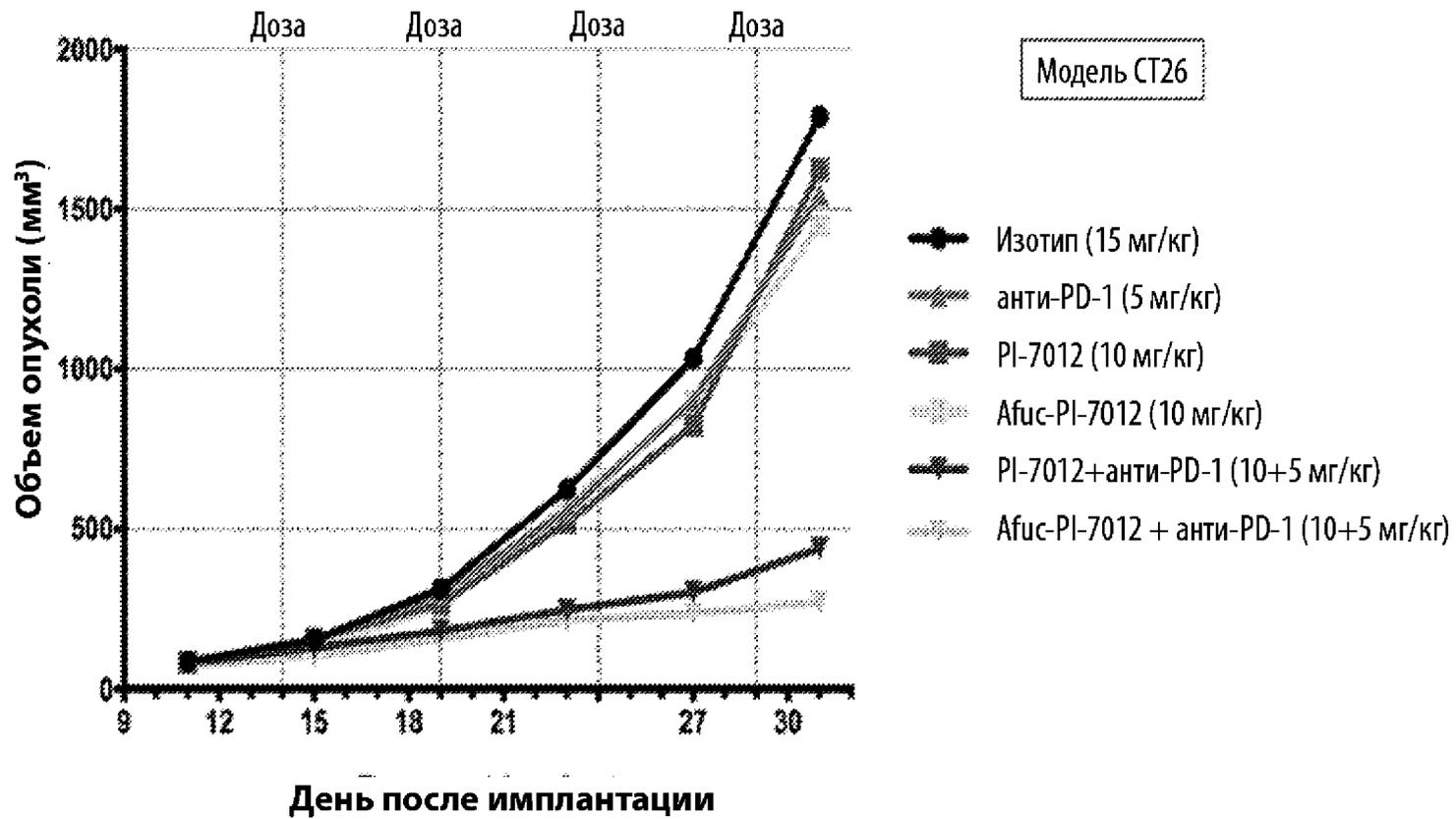
68. Способ по п. 63, отличающийся тем, что указанное антитело обладает активностью индуцирования антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).
69. Способ по п. 63, отличающийся тем, что указанное антитело обладает активностью индукции комплементзависимой цитотоксичности (CDC)
- 5 70. Способ по п. 63, отличающийся тем, что указанное антитело обладает активностью индукции антитело-опосредованного фагоцитоза (ADCP).
71. Способ по п. 63, отличающийся тем, что указанное антитело обладает активностью блокирования взаимодействия рецептор-лиганд, агонистической или антагонистической активностью.
- 10 72. Способ по любому из пп. 63-71, отличающийся тем, что миелоидные клетки представляют собой стимулирующие миелоидные клетки.
73. Способ по любому из пп. 63-71, отличающийся тем, что миелоидные клетки представляют собой нестимулирующие миелоидные клетки.
74. Способ по одному из пп. 63-73, отличающийся тем, что указанные миелоидные клетки  
15 включают по меньшей мере один из следующих типов клеток: дендритные клетки, ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM), нейтрофилы или моноциты.
75. Способ по п. 74, отличающийся тем, что указанные миелоидные клетки представляют собой нейтрофилы.
76. Способ по п. 74, отличающийся тем, что указанные миелоидные клетки представляют собой  
20 ассоциированные с опухолью макрофаги.
77. Способ по любому из пп. 63-76, отличающийся тем, что указанные миелоидные клетки являются внутриопухолевыми.
78. Способ по любому из пп. 63-77, отличающийся тем, что указанные миелоидные клетки  
25 находятся в популяции иммунных клеток, содержащей стимулирующие миелоидные клетки и нестимулирующие миелоидные клетки.
79. Способ по любому из пп. 63-78, отличающийся тем, что приведение в контакт происходит *in vitro* или *in vivo*.
80. Способ по любому из пп. 63-79, отличающийся тем, что приведение в контакт происходит *in vivo* у субъекта, нуждающегося в этом, необязательно при этом указанный субъект имеет рак.
- 30 81. Способ по любому из пп. 31-80, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой человека.

82. Способ по любому из пп. 63-81, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой твердую опухоль.
83. Способ по любому из пп. 63-81, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой гемобластоз.
- 5 84. Способ по п. 80, отличающийся тем, что указанный рак выбирают из группы, состоящей из меланомы, карциномы почек, гепатобилиарной карциномы, плоскоклеточной карциномы области головы и шеи (HNSC), рака поджелудочной железы, рака толстого кишечника, рака мочевого пузыря, глиобластомы, рака предстательной железы, рака легкого, рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, рака почек, рака мочевого пузыря, рака пищевода, почечного рака, меланомы и мезотелиомы.
- 10 85. Способ по п. 84, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой рак толстой кишки или рак молочной железы.
86. Способ по п. 80, отличающийся тем, что приведение в контакт усиливает иммунный ответ у субъекта.
- 15 87. Способ по п. 80, отличающийся тем, что указанный усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ.
88. Способ по п. 80, отличающийся тем, что указанный усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.
89. Способ по любому из пп. 80-88, отличающийся тем, что указанный субъект ранее получал, одновременно получает или впоследствии получит иммунотерапию.
- 20 90. Способ по п. 89, отличающийся тем, что указанная иммунотерапия представляет собой по меньшей мере одно из следующих: ингибитор контрольной точки; ингибитор контрольной точки Т-клеток; антитело анти-PD1; антитело анти-PDL1; антитело анти-CTLA4; адаптивная Т-клеточная терапия; клеточная терапия CAR-T; вакцина из дендритных клеток; моноцитарная вакцина; антигенсвязывающий белок, который связывает как Т-клетку, так и антигенпрезентирующую клетку; двойной антигенсвязывающий белок ViTE; лиганд Toll-подобного рецептора; цитокин; цитотоксическая терапия; химиотерапия; лучевая терапия; низкомолекулярный ингибитор; низкомолекулярный агонист; иммуномодулятор; и эпигенетический модулятор.
- 25 91. Способ по п. 90, отличающийся тем, что указанная иммунотерапия представляет собой анти-PD1 антитело.
- 30 92. Способ обнаружения TREM2 у субъекта, имеющего или подозреваемого на наличие заболевания или патологического состояния, при этом указанный способ включает: (а)

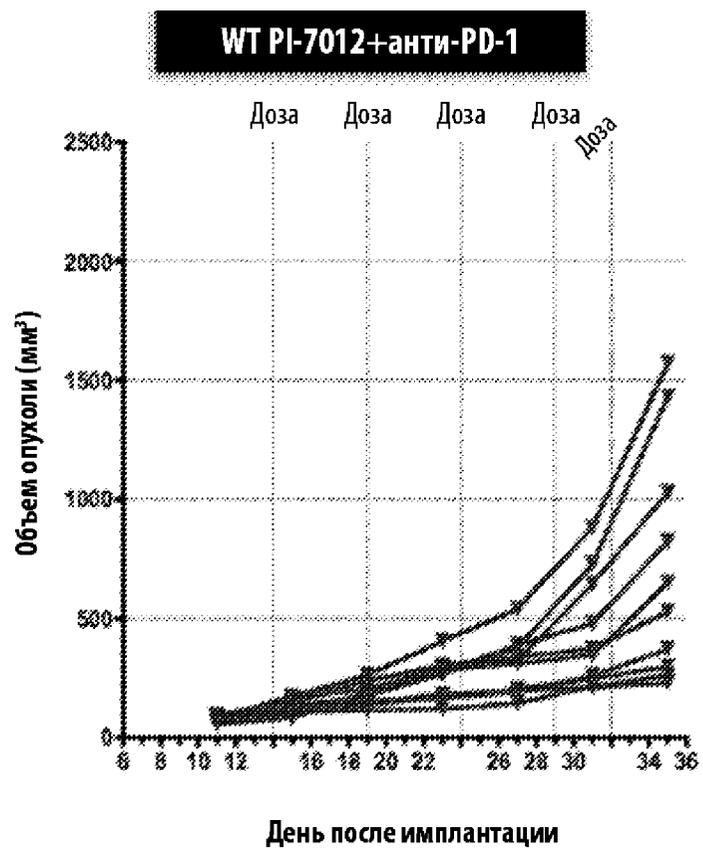
получение образца от субъекта; и (b) обнаружение присутствия или уровня TREM2 в образце путем приведения в контакт образца с антителом по любому из пп. 1 - 38.

93. Способ по п. 92, отличающийся тем, что указанное заболевание или патологическое состояние представляет собой рак.
- 5 94. Способ по п. 92 или 93, дополнительно включающий введение ингибитора контрольной точки, необязательно при этом ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор оси PD1:PDL1, необязательно при этом ингибитор представляет собой антитело, и необязательно при этом антитело представляет собой анти- PD1 антитело или анти-PDL1 антитело.
- 10 95. Набор, содержащий антитело по любому из пп. 1 - 38 или фармацевтическую композицию по п. 43 и инструкции по применению.

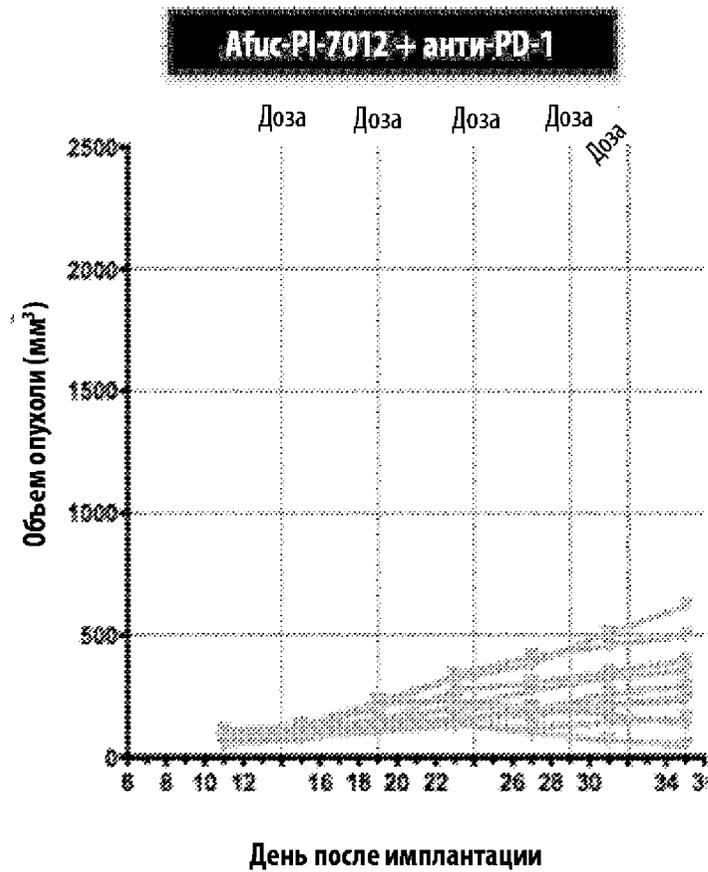
Фиг. 1А

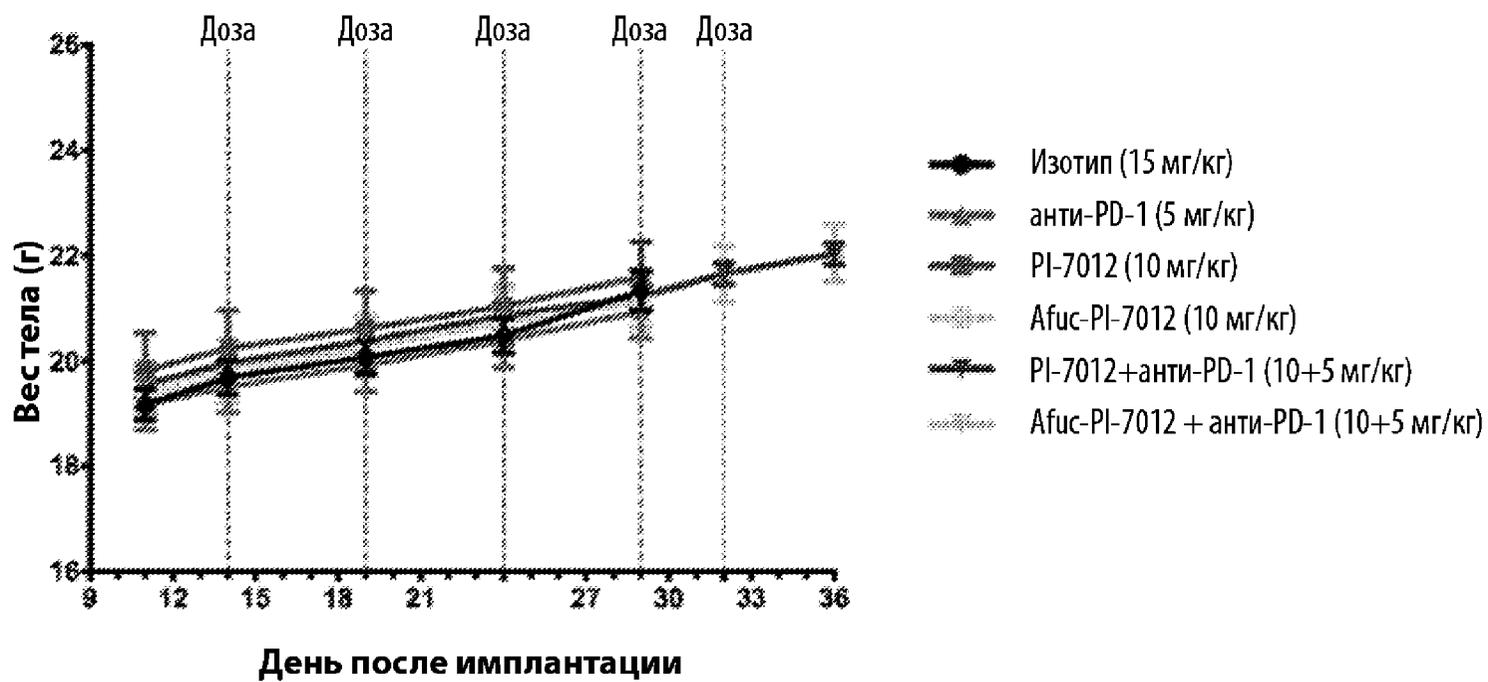


Фиг. 1В

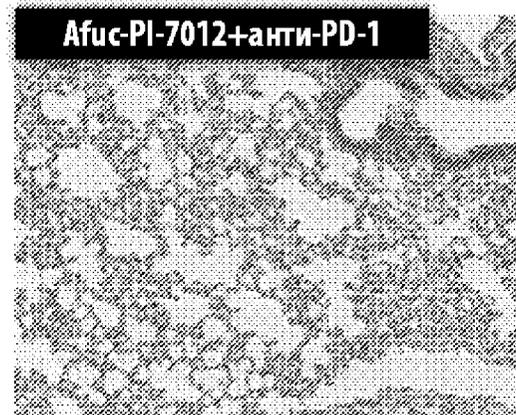
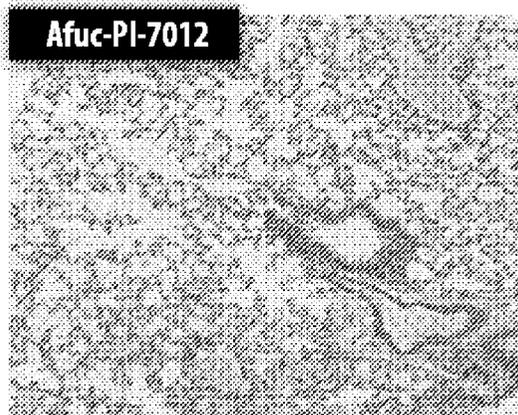
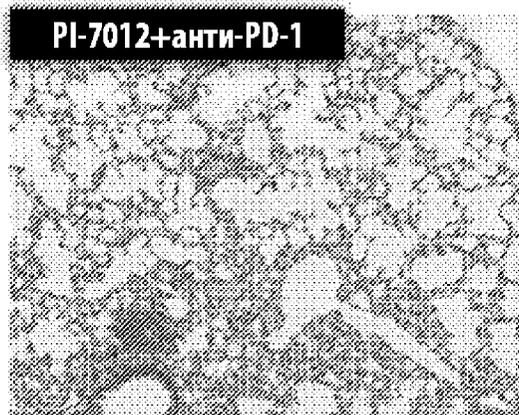
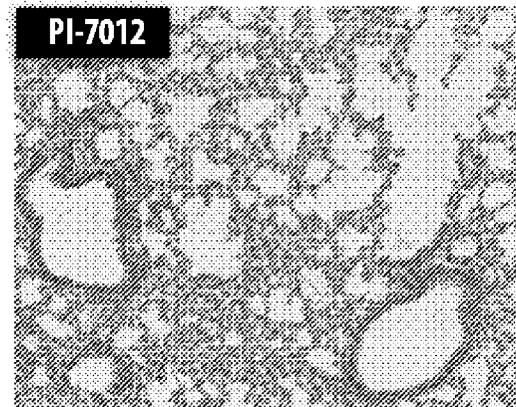
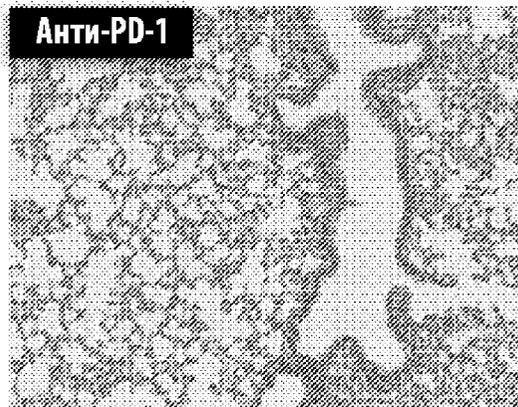
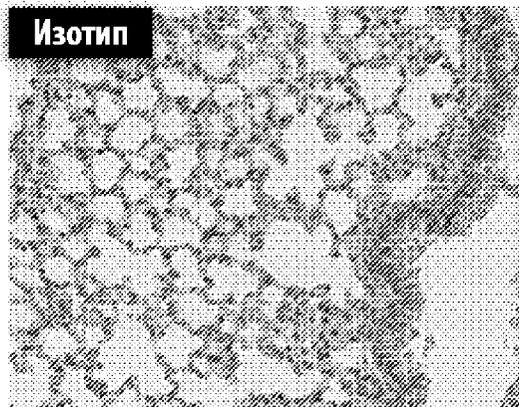


Фиг. 1С



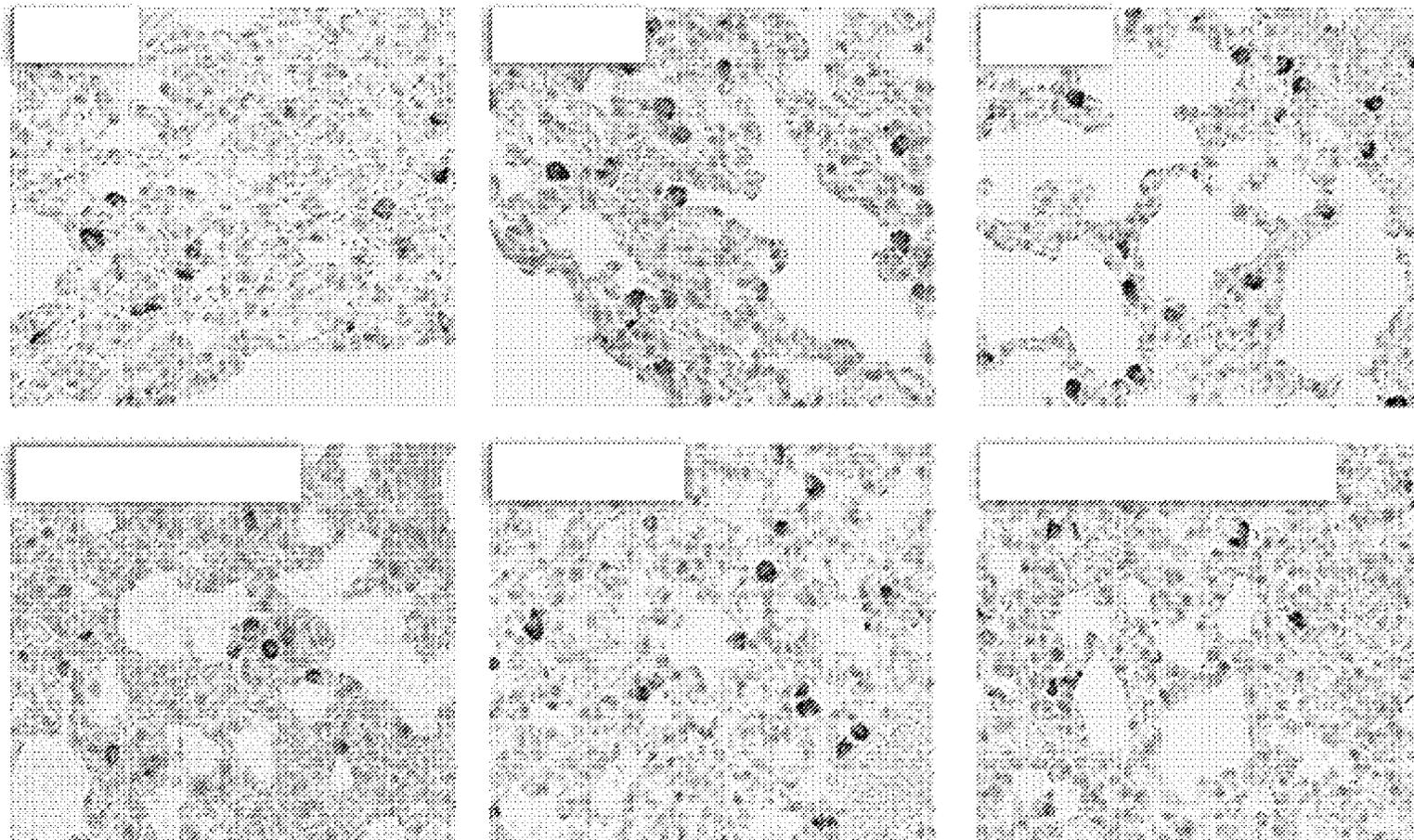


Фиг. 2

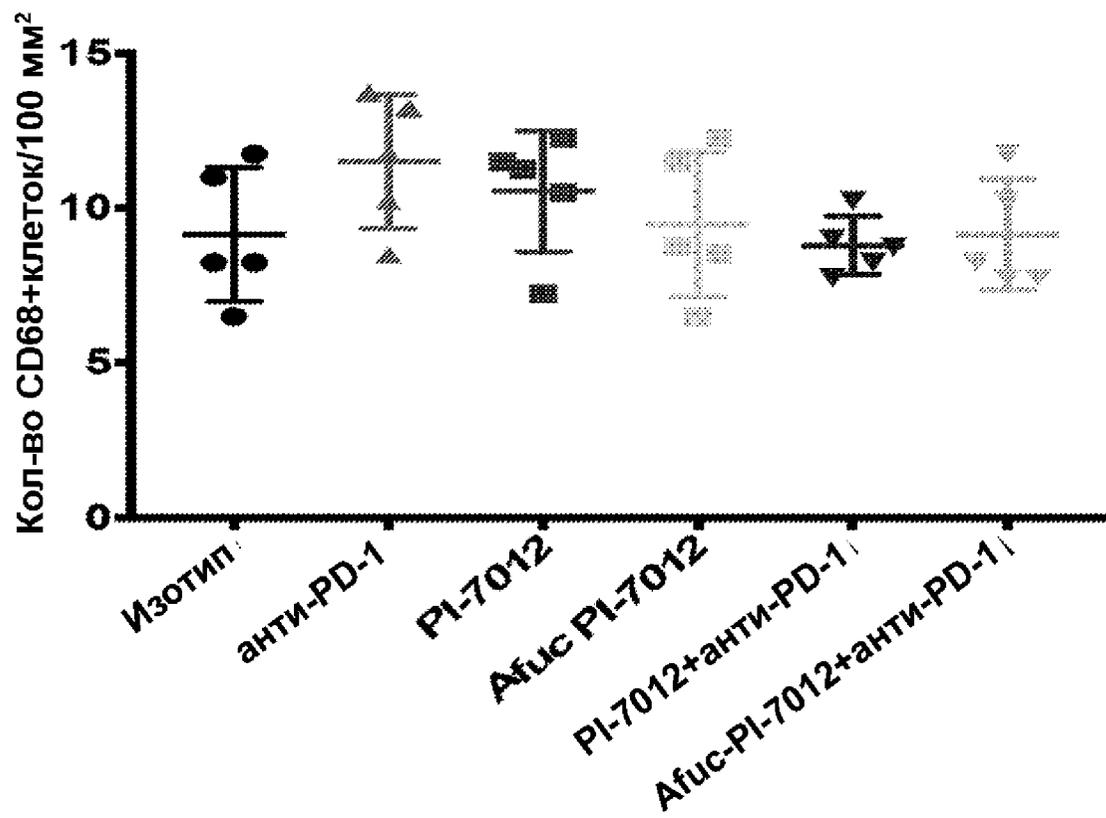


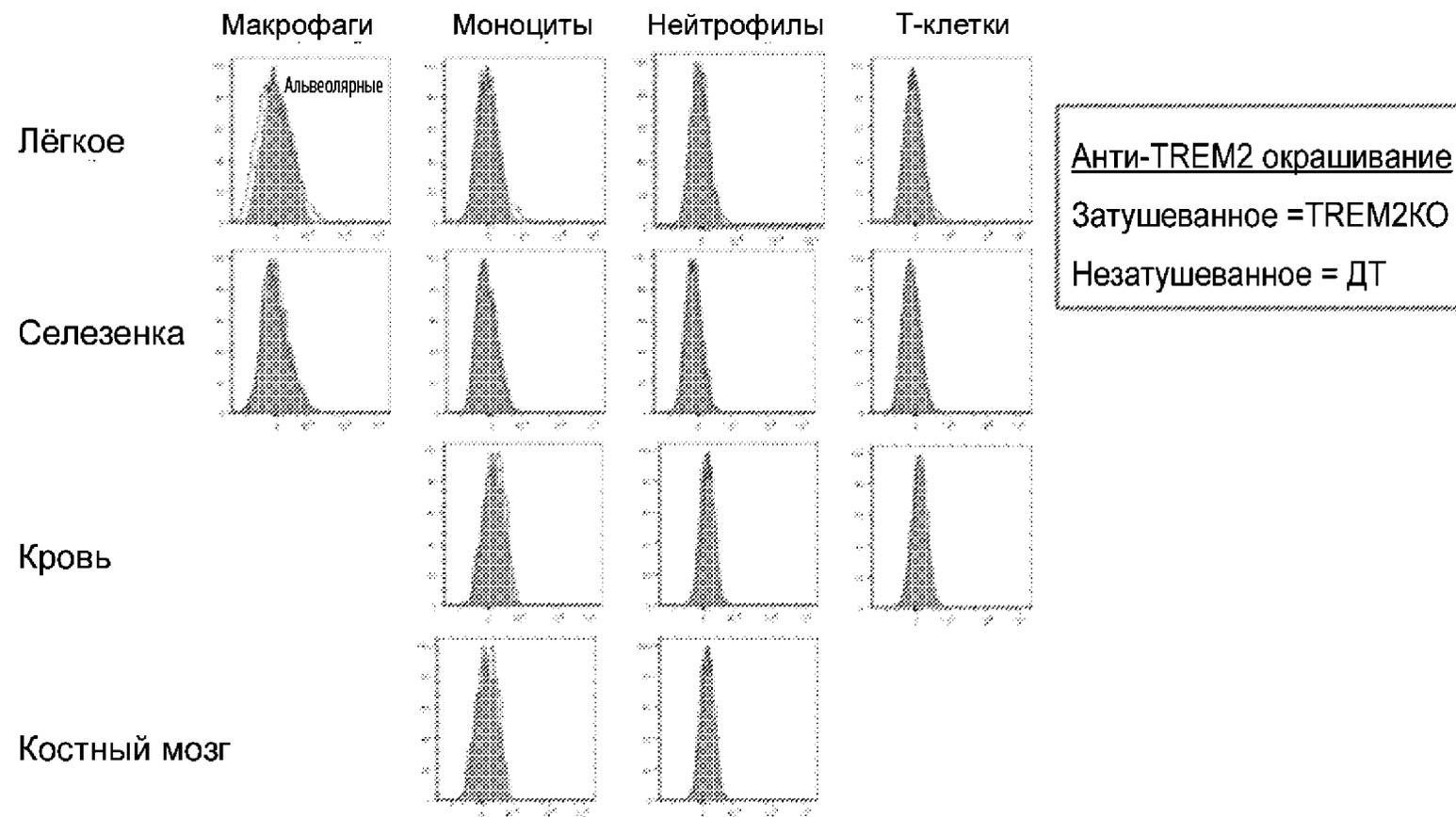
Фиг. 3

Фиг. 4А

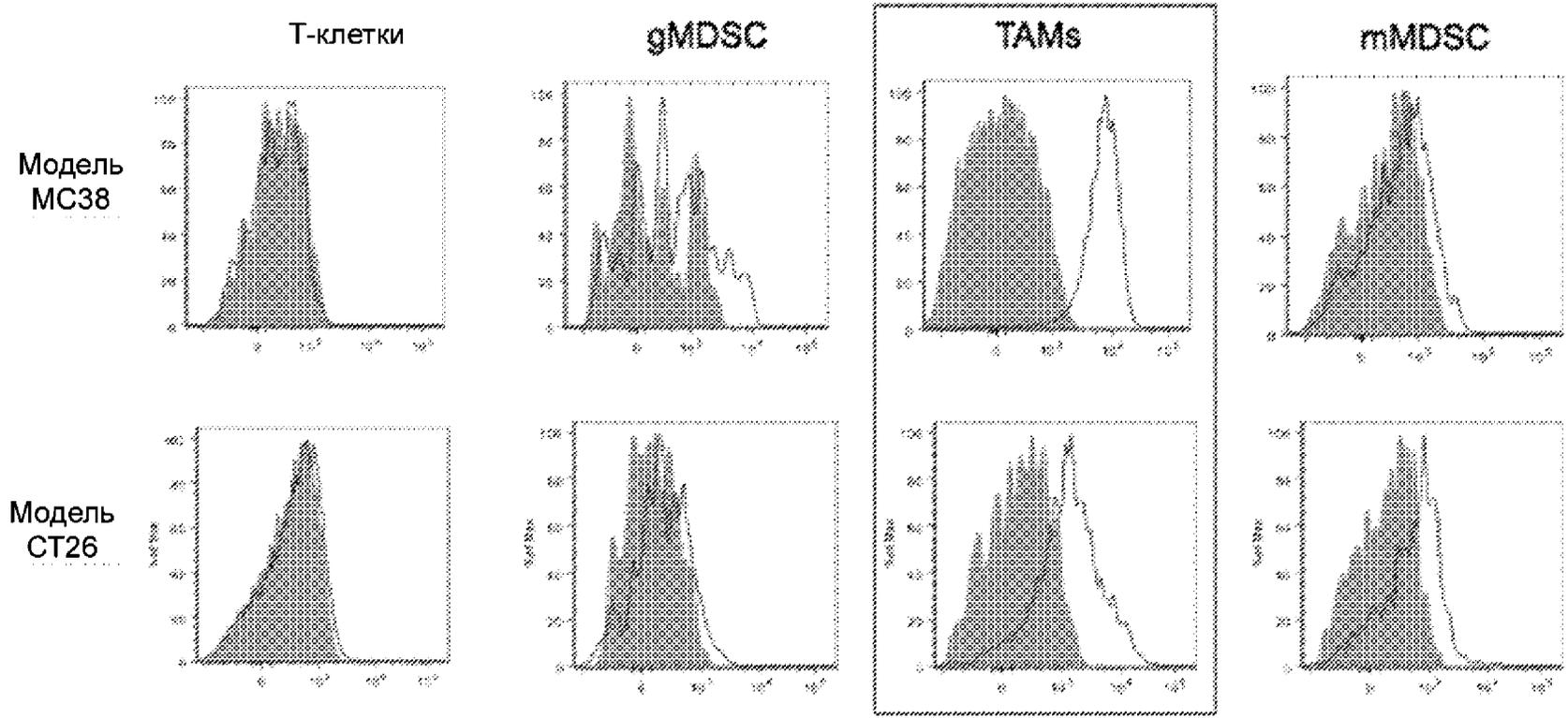


Фиг. 4В

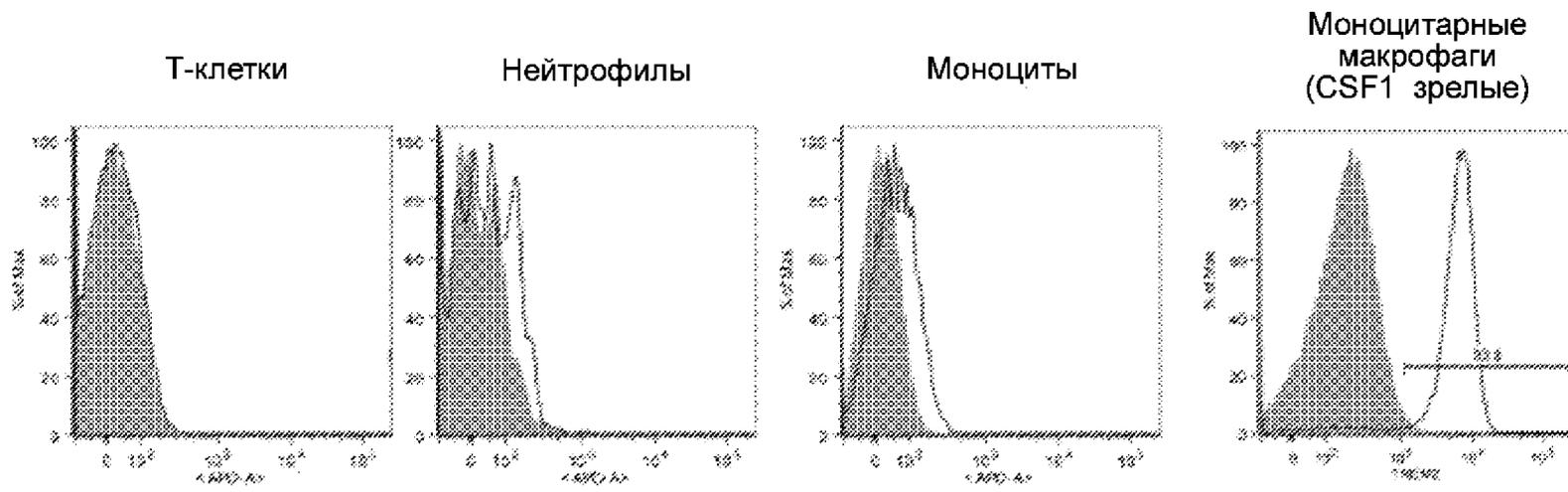




Фиг. 5



Фиг. 6



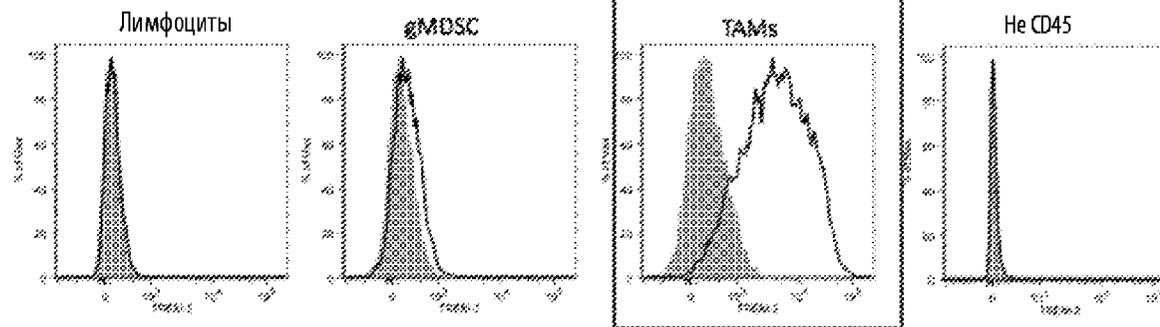
- \* МКПК человека, окрашенные PI-7012
- \* Репрезентативные графики от 3 доноров

Окрашивание анти-TREM2  
 Затусованное = контрольное mAb  
 Незатусованное = анти-TREM2 mAb

Фиг. 7

Опухоль	Лимфоциты	gM $\phi$ SC	TAMs	He CD45
Светлоклеточная почечная (1)	138*	NA**	652	125.8
Почечная метастатическая папиллярная	-3	NA	370	-41
Светлоклеточная почечная (2)	10	37	2,225	13
Почечная первичная папиллярная	76	294	1,107	1
Муцинозная аденокарцинома	11	105	3,588	1

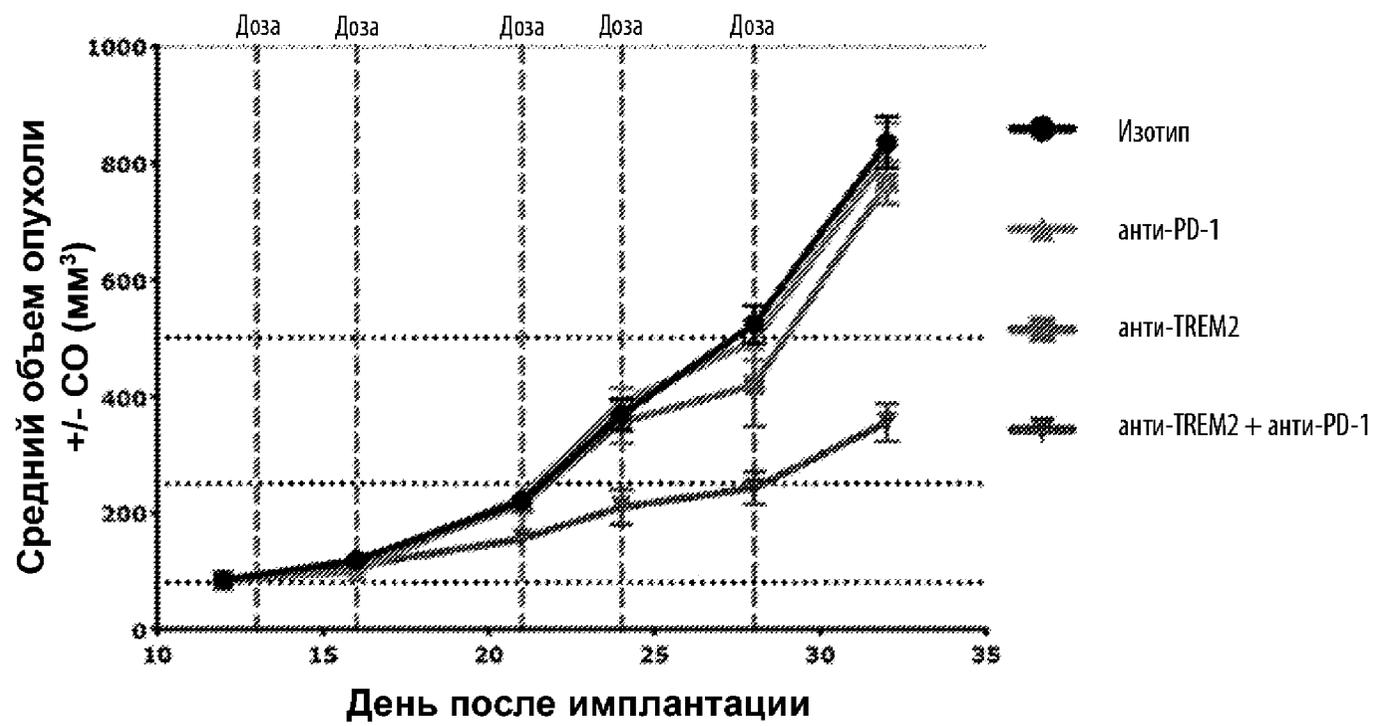
Продемонстрированы репрезентативные гистограммы муцинозной аденокарциномы



\* Указан определенный индекс окрашивания для каждой популяции (анти-TREM2-изотипический контроль)

\*\* NA = не оценивали

Фиг. 8

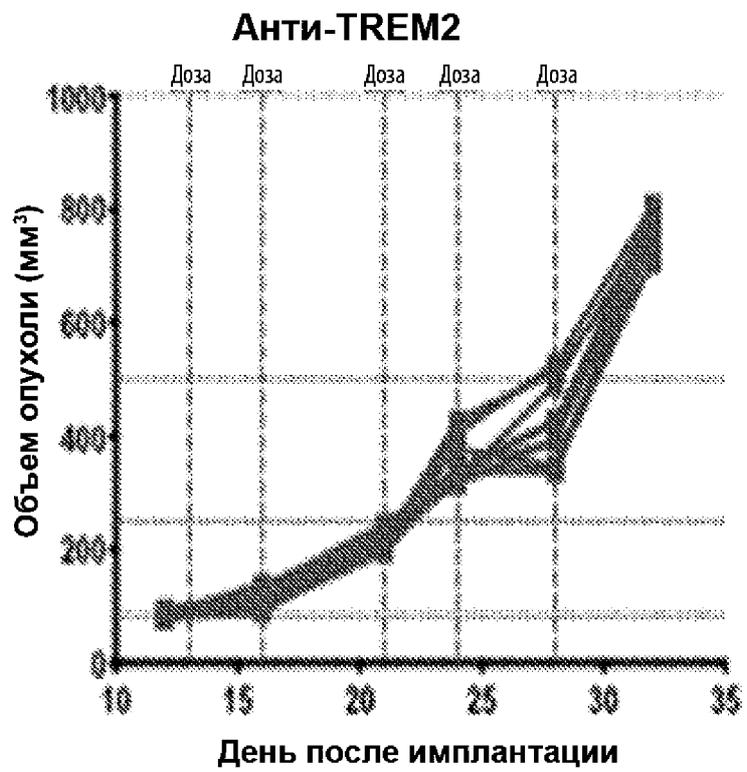


Фиг. 9А

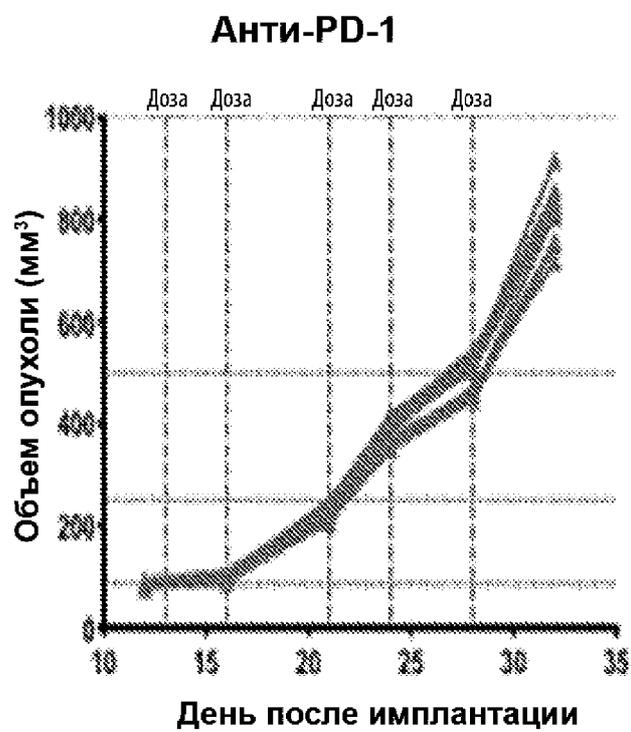
Фиг. 9В



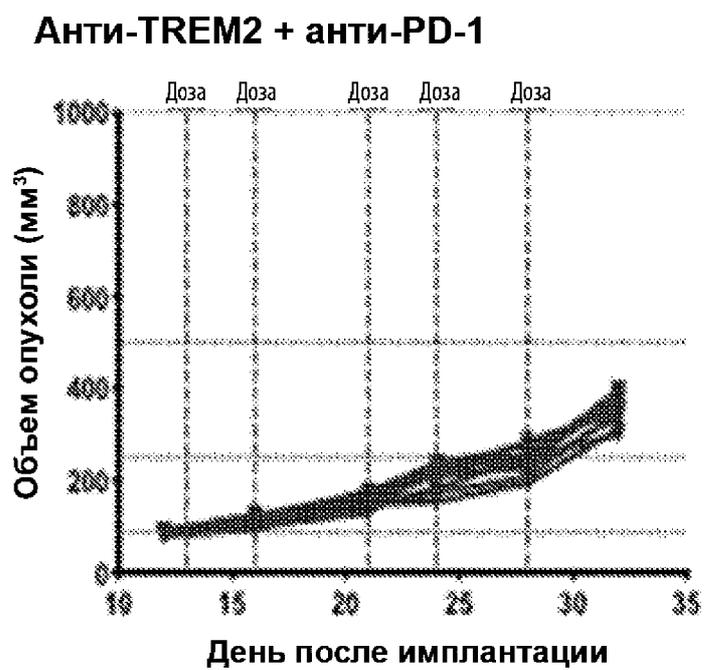
Фиг. 9С



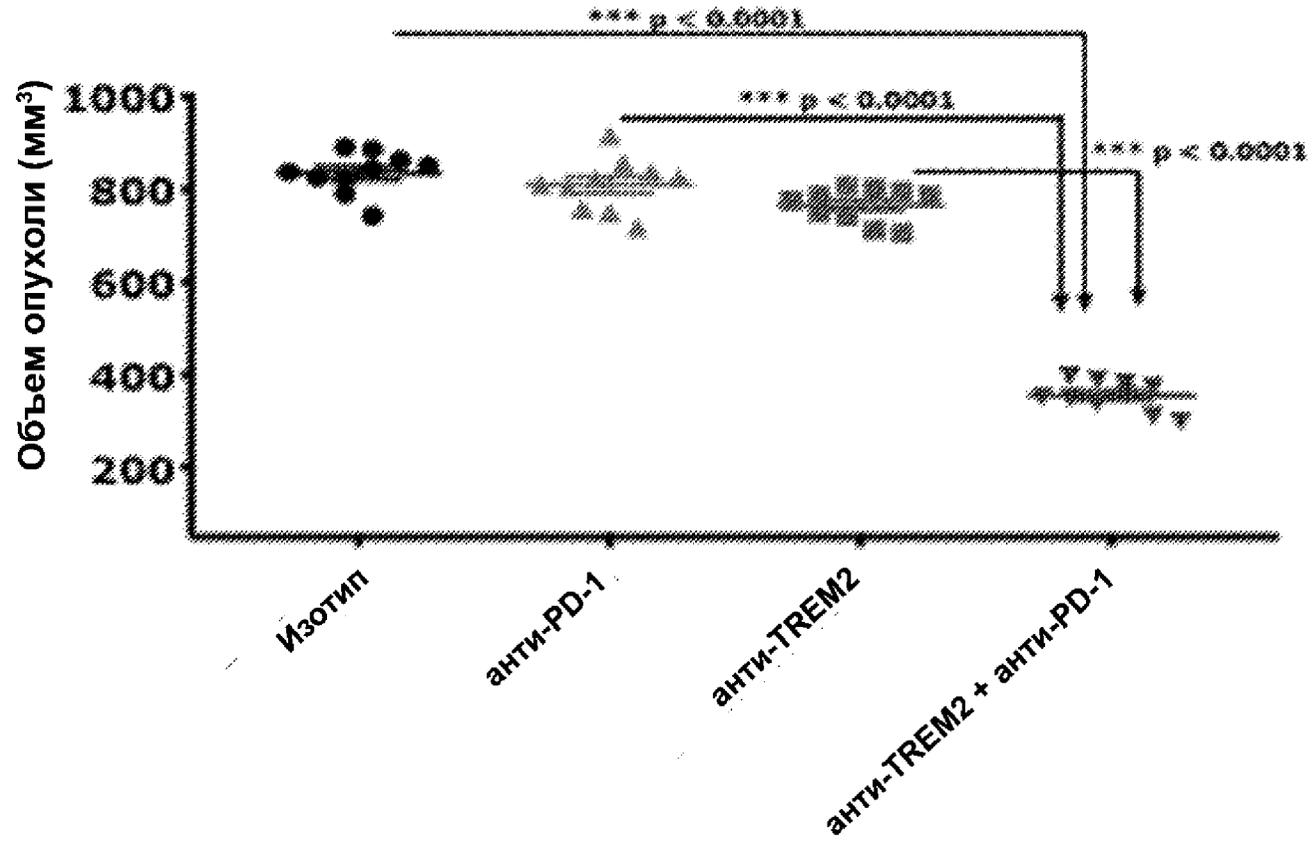
Фиг. 9D



Фиг. 9E



Фиг. 9F



Фиг. 10

