

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192182** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.01

(22) Дата подачи заявки
2020.02.06

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К TREM1 И СООТВЕТСТВУЮЩИЕ СПОСОБЫ

(31) 62/802,161; 62/889,994

(32) 2019.02.06; 2019.08.21

(33) US

(86) PCT/US2020/016949

(87) WO 2020/163564 2020.08.13

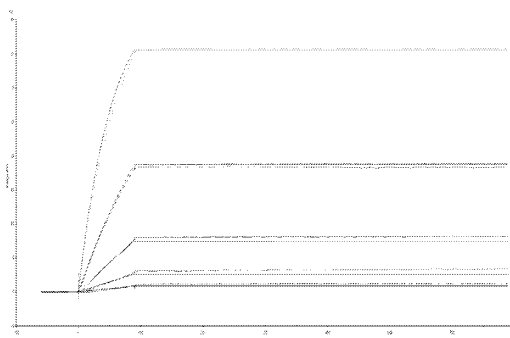
(88) 2020.09.24

(71) Заявитель:
**ПАЙОНИР
ИММУНОТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)**

(72) Изобретатель:
**Чань Кристофер, Пал Аритра,
Срирам Венкатараман, Преста
Леонард Г., Ле Тиен Ту, Лян Линда
(US)**

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

(57) В изобретении представлены антитела к TREM1 и соответствующие способы получения и применения антител к TREM1. Также представлены способы и композиции для усиления иммунного ответа и/или для лечения связанного с иммунной системой патологического состояния у человека, например рака, включающие уничтожение, инактивацию или истощение нестимулирующих миелоидных клеток с помощью антитела к TREM1 или его антигенсвязывающего фрагмента.



A1

202192182

202192182

A1

АНТИТЕЛА К TREM1 И СООТВЕТСТВУЮЩИЕ СПОСОБЫ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/802161, поданной 6 февраля 2019 г., и по предварительной заявке на патент США № 62/889994 поданной 21 августа 2019 г., которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, который был подан через EFS-Web и включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная в XX, 20XX, называется XXXXXUS_sequencelisting.txt и имеет размер XXXXXXX байтов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Иммуитет играет роль в предотвращении роста опухоли. Внутри поражения может развиваться сложное микроокружение, и, несмотря на рекрутинг Т-клеток, часто отсутствует эффективный контроль над развивающейся массой. Понимание баланса между элиминацией опухоли и ускользанием опухоли может основываться на понимании различных ролей, которые миелоидные клетки играют в микроокружении опухоли.

[0004] Популяции миелоидных клеток микроокружения опухоли включают моноциты и нейтрофилы (иногда не совсем точно сгруппированные как миелоидные супрессорные клетки), макрофаги и дендритные клетки. Хотя внутриопухолевые миелоидные популяции в целом долгое время считались нестимулирующими или супрессорными, в последнее время было признано, что не все инфильтрирующие опухоль миелоидные клетки функционально эквивалентны.

[0005] В нормальных тканях многие из этих миелоидных клеток необходимы для правильного функционирования как врожденного, так и адаптивного иммунитета, особенно для заживления ран. Однако при раке, как правило, описывают значительный избыток макрофагов и дисфункциональные или искаженные популяции этих и других типов клеток. Если рассматривать совокупную популяцию, определяемую отдельными маркерами, такими как CD68 или CD163, инфильтрация «макрофагами» коррелирует с худшими исходами у пациентов при нескольких 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 фенотипическое и функциональное выделение макрофагов из микроокружения опухоли осложняется сходством макрофагов и дендритных клеток и проблематично с точки зрения биологии опухоли. К решению проблемы часто применяли морфологический критерий; один подход к попытке дифференцировать дендритные клетки от макрофагов был основан на более шипастой или дендритной морфологии для первых и более вуалевидной или луковичной морфологии для последних (Bell et al., J Exp Med 555, 1999;190:1417–26). Другие группы пытаются дифференцировать на основе генетических маркеров и маркеров клеточной поверхности.

[0006] Внутри опухолей есть разнообразие антигенпрезентирующих компартментов, а Т-клетки могут дифференцировать признаки антигенпрезентирующих клеток (АПК). Поскольку Т-клетки являются основным двигателем иммунитета к опухоли, важно понимать точные признаки родственных им АПК. Миелоидные клетки занимают видное место среди клеток, способных презентовать Т-клеткам антигены

опухолевого происхождения и тем самым поддерживать последние в активированном состоянии. Презентация антигена происходит внутри самой опухоли и, вероятно, влияет на функции опухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Активация Т-клеток антигенпрезентирующими клетками (АПК) является важным компонентом антигенспецифических иммунных ответов и уничтожения опухолевых клеток. Поскольку эти миелоидные популяции представляют собой основных взаимодействующих с Т-клетками партнеров и антигенпрезентирующие клетки для входящих опухолереактивных цитотоксических Т-лимфоцитов, понимание их различий может определять терапевтические способы.

[0007] Триггерный рецептор, экспрессирующийся на миелоидных клетках 1 (TREM1, но также известный как CD354, HGNC: 17760, ген Entrez: 54210, UniProtKB: Q9NP99), принадлежит к суперсемейству рецепторов Ig и высоко экспрессируется в субпопуляциях миелоидных клеток, включая нейтрофилы, моноциты и др. макрофаги. В TREM1 отсутствуют сигнальные мотивы, и вместо этого активация рецептора опосредуется адаптером DAP12 (DNAX-активирующий белок 12), что приводит к усилению воспалительных реакций (Bouchon, et al (2000) J. Immunol. 164 (10): 4991-4995). В частности, сшивание TREM1 индуцирует экспрессию ИЛ-8, миелопероксидазы, ФНО- α и MCP-1. Экспрессия TREM1 повышается в миелоидных клетках в ответ на стимуляцию толл-подобного рецептора (бактериальная и грибковая стимуляция), и было показано, что он способствует и усиливает острый воспалительный ответ во время септического шока и инфекции (Cohen, (2001) Lancet. 358: 776-778). Хотя лиганд для TREM1 оставался неуловимым, недавно PGLYRP1 (белок распознавания пептидогликана 1) был идентифицирован как мощный лиганд TREM1 (Read et al, (2015) J of Immunol. 194: 1417-1421). У мышей существует 5 активирующих форм рецепторов TREM, включая TREM 1, 2, 3, 4 и 5, с растворимой формой TREM1 (sTREM1), высвобождаемой во время инфекции. TREM1 мыши и человеческий гомолог TREM1 имеют относительно низкую идентичность последовательностей, составляющую 46% (Radaev, et al. (2003) Structure 11: 1527-1535). Структурно TREM1 состоит из одного иммуноглобулин (Ig) -подобного домена V-типа (Ig-V) из около 108 аминокислот, за которым следует стеблевая область из 70 аминокислот. Помимо роли, которую TREM1 играет в сепсисе, его также связывают с воспалительным заболеванием кишечника. Однако очень мало известно о роли TREM1 в микроокружении опухоли. (Schenk, et al (2007) JCI. 117: 3097-3106).

[0008] Существует неудовлетворенная потребность в новых терапевтических подходах к лечению рака, которые включают избирательное уменьшение количества клеток, которые неэффективны при стимуляции Т-клеточных ответов или реполяризации таких клеток, тем самым усиливая иммунный ответ в микроокружении опухоли.

[0009] Связанные патентные заявки включают: PCT/US2018/045680, поданную 7 августа 2018 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки для всех целей.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] В одном аспекте в данном документе представлены выделенные антитела, которые связываются с TREM1 человека (SEQ ID NO: 1), где антитело *i*) связывается в пределах остатков 21–34 (SEQ ID NO: 42), 103–109 (SEQ ID NO: 43) и 128–136 (SEQ ID NO: 44) TREM1 человека (SEQ ID NO: 1); и *ii*) содержит область Fc человека.

[0011] В одном аспекте в данном документе представлены выделенные гуманизированные антитела, которые связываются с TREM1 человека (SEQ ID NO: 1), где антитело *i)* связывается в пределах остатков 21–34 (SEQ ID NO: 42), 103–109 (SEQ ID NO: 43) и 128–136 (SEQ ID NO: 44) человеческого TREM1 (SEQ ID NO: 1); и *ii)* необязательно содержит область Fc человека.

[0012] В одном аспекте в данном документе предложено выделенное антитело или антитела, которые связываются с TREM1 человека (SEQ ID NO: 1), содержащие последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность вариабельной легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где: CDR-H1 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, CDR-H2 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24, CDR-H3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 29, где X представляет собой лейцин (L), глутамин (Q), метионин (M), изолейцин (I) или глутаминовую кислоту (E), CDR-L1 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26, CDR-L2 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27, и CDR-L3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28. В одном аспекте в данном документе предложено выделенное антитело или антитела, которые связываются с TREM1 человека (SEQ ID NO: 1), содержащие тяжелую цепь, содержащую последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и легкую цепь, содержащую последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где: CDR-H1 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, CDR-H2 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24, CDR-H3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 29, где X представляет собой лейцин (L), глутамин (Q), метионин (M), изолейцин (I) или глутаминовую кислоту (E), CDR-L1 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26, CDR-L2 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27, и CDR-L3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28.

[0013] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H3, включающую последовательность RXAAMDY (SEQ ID NO: 29), где X представляет собой лейцин (L), глутамин (Q), метионин (M), изолейцин (I) или глутаминовую кислоту (E). В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит CDR-H1, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, и CDR-H2, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33; и антитело дополнительно содержит CDR-H1, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, и CDR-H2, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24.

[0014] В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит CDR-L1, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26, CDR-L2, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27, и CDR-L3, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28.

[0015] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 16, 17 или 18. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 17.

[0016] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VL, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 20, 21 или 22. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.

[0017] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 17, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.

[0018] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой scFv и содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 17, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.

[0019] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой scFv и содержит последовательность VH, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 16, 17 или 18, и последовательность VL, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 20, 21, или 22. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 17, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20; и область Fc человека включает Fc человеческого IgG1 дикого типа.

[0020] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 34, и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 35.

[0021] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 4, 5 или 6.

[0022] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VL, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 20, 21 или 22.

[0023] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 8, 9 или 10.

[0024] В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 32, и антитело дополнительно содержит CDR-H1, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, и CDR-H2, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24.

[0025] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 12, 13 или 14. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 13.

[0026] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VL, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 20, 21 или 22. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.

[0027] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 13, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой scFv и содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 13, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.

[0028] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой scFv и содержит последовательность VH, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 112, 13 или 14, и последовательность VL, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 20, 21, или 22.

[0029] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 13, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20; и область Fc человека включает Fc человеческого IgG1 дикого типа.

[0030] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 36, и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 37.

[0031] В некоторых вариантах осуществления антитело состоит из последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 17, 13 или 9; и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления антитело состоит из последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 17; и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления антитело состоит из последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 13; и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления антитело состоит из последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 9; и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 20.

[0032] В некоторых вариантах осуществления антитело состоит из последовательности тяжелой цепи, указанной в SEQ ID NO: 34; и последовательности легкой цепи указанной в SEQ ID NO: 35.

[0033] В некоторых вариантах осуществления антитело состоит из последовательности тяжелой цепи, указанной в SEQ ID NO: 36, и последовательности легкой цепи, указанной в SEQ ID NO: 37.

[0034] В некоторых вариантах осуществления антитело является афукозилированным.

[0035] В другом аспекте в данном документе предложены выделенные антитела, которые связываются с TREM1 человека (SEQ ID NO: 1), где антитело афукозилировано, и антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 17, 13 или 9; и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 17, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.

[0036] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 34, и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 35.

[0037] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 13, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.

[0038] В некоторых вариантах осуществления антитело является афукозилированным, и антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 36, и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 37.

[0039] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 9, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.

[0040] В некоторых вариантах осуществления антитело является афукозилированным, и антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 38, и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 39.

[0041] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное, человеческое или химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит человеческую константную область тяжелой цепи класса, выбранного из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM. В некоторых вариантах

осуществления антитело содержит область Fc. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc человека. В некоторых вариантах осуществления область Fc человека содержит константную область тяжелой цепи человека класса IgG и подкласса, выбранного из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления область Fc человека включает Fc человеческого IgG1 дикого типа.

[0042] В некоторых вариантах осуществления антитело состоит из последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 17, и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 20; и область Fc человека включает Fc человеческого IgG1 дикого типа.

[0043] В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит одну или более аминокислотных замен, при этом одна или более замен приводят к увеличению периода полужизни антитела, увеличению активности АЗКЦ, увеличению активности АЗКФ или увеличению активности КЗЦ по сравнению с Fc без одной или более замен. В некоторых вариантах осуществления область Fc связывает рецептор Fcγ, выбранный из группы, состоящей из: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa и FcγRIIIb.

[0044] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело.

[0045] В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с TREM1 человека с KD менее или равной около 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, или 7×10^{-9} M, по данным анализа методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с TREM1 человека с KD менее или равной около 7 нМ, по данным анализа методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

[0046] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой агонистическое антитело.

[0047] В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля.

[0048] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один цитокин или хемокин выбран из группы, состоящей из: ИФН-γ, ИЛ-1α, ИЛ-12, ИЛ-2, TNFSF9, TNFSF10, CXCL9, CXCL10, CCL17, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL11, CXCL15, CCL3, CCL4, CCL2, FasL, CD274, CRTAM, гранзима A (GzmA) или гранзима B (GzmB). В некоторых вариантах осуществления цитокин или хемокин представляет собой CXCL10 или ИФН-γ.

[0049] В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного миелоидного костимулирующего белка в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля.

[0050] В некоторых вариантах осуществления миелоидный костимулирующий белок представляет собой HLA-DR, CD40, CD80 или CD86 в клетке.

[0051] В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует повышенную активацию внутриклеточных сигнальных путей ERK и/или STAT3 в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля.

[0052] В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует противоопухолевый вторичный иммунный ответ по сравнению с антителом изотипического контроля.

[0053] В некоторых вариантах осуществления антитело: конкурирует за связывание с TREM1 человека с антителом TREM-26 человека; связывается с TREM1 человека; связывается с TREM1 яванского макака;

стимулирует сигналинг TREM1; индуцирует иммунные сигнальные пути; индуцирует секрецию цитокинов или хемокинов; индуцирует экспрессию костимулирующих молекул; уничтожает, инактивирует или истощает миелоидные клетки; или способно к любой комбинации а.- h.

[0054] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ). В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность антителозависимого клеточно-опосредованного фагоцитоза (АЗКФ). В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ).

[0055] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой TREM1+ клетку.

[0056] В некоторых вариантах осуществления TREM1+ клетка выбрана из группы, состоящей из: дендритных клеток, опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ), миелоидных супрессорных клеток (МСК), нейтрофилов и опухолеассоциированных нейтрофилов (ОАН). В некоторых вариантах осуществления TREM1+ клетка представляет собой миелоидную супрессорную клетку или опухолеассоциированный нейтрофил.

[0057] В некоторых вариантах осуществления антитело перекрестно связывает TREM1 с TREM1 на поверхности TREM1+ клетки.

[0058] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело предназначено для применения в качестве лекарственного препарата. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело предназначено для лечения рака или инфекции. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело предназначено для лечения рака, при этом рак выбран из солидной опухоли и гемобластоза.

[0059] В еще одном аспекте в данном документе предложены выделенные полинуклеотиды или набор полинуклеотидов, кодирующих описанное в данном документе антитело, его VH, его VL, его легкую цепь, его тяжелую цепь или его антигенсвязывающую часть; необязательно кДНК.

[0060] В еще одном аспекте в данном документе представлены векторы или набор векторов, содержащий полинуклеотид или набор полинуклеотидов, как описано в данном документе.

[0061] В еще одном аспекте в данном документе представлены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид или набор полинуклеотидов, или вектор, или набор векторов, как описано в данном документе.

[0062] В еще одном аспекте в данном документе представлены способы получения антитела, включающие осуществление экспрессии антитела с использованием клетки-хозяина и выделение экспрессированного антитела.

[0063] В еще одном аспекте в данном документе представлены фармацевтические композиции, содержащие антитело, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0064] В еще одном аспекте в данном документе представлены наборы, содержащие антитело или фармацевтическую композицию, как описано в данном документе, и инструкции по применению.

[0065] В еще одном аспекте в данном документе представлены способы усиления иммунного ответа, включающие введение субъекту композиции, содержащей антитело к TREM1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

- [0066]** В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитело или фармацевтическую композицию, как описано в данном документе.
- [0067]** В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность, блокирующую рецептор-лиганд, агонистическую или антагонистическую активность.
- [0068]** В некоторых вариантах осуществления антитело имеет агонистическую активность.
- [0069]** В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля.
- [0070]** В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один цитокин или хемокин выбран из группы, состоящей из: ИФН- γ , ИЛ-1 α , ИЛ-12, ИЛ-2, TNFSF9, TNFSF10, CXCL9, CXCL10, CCL17, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL11, CXCL15, CCL3, CCL4, CCL2, FasL, CD274, CRTAM, гранзима A (GzmA) или гранзима B (GzmB).
- [0071]** В некоторых вариантах осуществления цитокин или хемокин представляет собой CXCL10 или ИФН- γ .
- [0072]** В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного миелоидного костимулирующего белка по сравнению с антителом изотипического контроля.
- [0073]** В некоторых вариантах осуществления миелоидный костимулирующий белок представляет собой HLA-DR, CD40, CD80 или CD86 в клетке.
- [0074]** В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует повышенную активацию внутриклеточных сигнальных путей ERK и/или STAT3 в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля.
- [0075]** В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует вторичный иммунный ответ.
- [0076]** В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой TREM1+ клетку.
- [0077]** В некоторых вариантах осуществления TREM1+ клетка выбрана из группы, состоящей из: дендритных клеток, опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ), миелоидных супрессорных клеток (МСК), нейтрофилов и опухолеассоциированных нейтрофилов (ОАН).
- [0078]** В некоторых вариантах осуществления TREM1+ клетка представляет собой миелоидную супрессорную клетку или опухолеассоциированный нейтрофил.
- [0079]** В некоторых вариантах осуществления антитело перекрестно связывает TREM1 с TREM1 на поверхности TREM1+ клетки.
- [0080]** В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек.
- [0081]** В другом аспекте в данном документе представлены способы лечения рака, включающие введение субъекту композиции, содержащей антитело к TREM1 или его антигенсвязывающий фрагмент.
- [0082]** В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитело или фармацевтическую композицию, как описано в данном документе.
- [0083]** В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность, блокирующую рецептор-лиганд, агонистическую или антагонистическую активность.

- [0084]** В некоторых вариантах осуществления антитело имеет агонистическую активность.
- [0085]** В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля.
- [0086]** В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один цитокин или хемокин выбран из группы, состоящей из: ИФН- γ , ИЛ-1 α , ИЛ-12, ИЛ-2, TNFSF9, TNFSF10, CXCL9, CXCL10, CCL17, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL11, CXCL15, CCL3, CCL4, CCL2, FasL, CD274, CRTAM, гранзима A (GzmA) или гранзима B (GzmB).
- [0087]** В некоторых вариантах осуществления цитокин или хемокин представляет собой CXCL10 или ИФН- γ .
- [0088]** В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного миелоидного костимулирующего белка по сравнению с антителом изотипического контроля.
- [0089]** В некоторых вариантах осуществления миелоидный костимулирующий белок представляет собой HLA-DR, CD40, CD80 или CD86 в клетке.
- [0090]** В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует повышенную активацию внутриклеточных сигнальных путей ERK и/или STAT3 в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля.
- [0091]** В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует противоопухолевый вторичный иммунный ответ по сравнению с антителом изотипического контроля.
- [0092]** В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ).
- [0093]** В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ).
- [0094]** В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность антитело-опосредованного фагоцитоза (АЗКФ).
- [0095]** В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой TREM1+ клетку.
- [0096]** В некоторых вариантах осуществления TREM1+ клетка выбрана из группы, состоящей из: дендритных клеток, опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ), миелоидных супрессорных клеток (МСК), нейтрофилов и опухолеассоциированных нейтрофилов (ОАН).
- [0097]** В некоторых вариантах осуществления TREM1+ клетка представляет собой миелоидную супрессорную клетку или опухолеассоциированный нейтрофил.
- [0098]** В некоторых вариантах осуществления антитело перекрестно связывает TREM1 с TREM1 на поверхности TREM1+ клетки.
- [0099]** В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек.
- [0100]** В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидный рак.
- [0101]** В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз.

[0102] В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из: меланомы, рака почек, гепатобилиарного рака, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКГШ), рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака мочевого пузыря, рака уротелия, глиобластомы, рака предстательной железы, рака легкого, рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, рака пищевода, рака почек, рака эндометрия, рака шейки матки, рака яичек и мезотелиомы.

[0103] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудка, рак яичников, рак толстой кишки или рак молочной железы.

[0104] В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт усиливает иммунный ответ у субъекта.

[0105] В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ.

[0106] В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.

[0107] В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал, одновременно получает или впоследствии получит иммунотерапию.

[0108] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия представляет собой по меньшей мере одно из: ингибитора контрольной точки; ингибитора контрольной точки Т-клеток; антитела к PD1; антитела к PDL1; антитела к CTLA4; адаптивной клеточной терапии; адаптивной Т-клеточной терапии; CAR-T-клеточной терапии; вакцины из дендритных клеток; агониста STING; моноклеточной вакцины; вакцины бацилл Кальметта-Герена; антигенсвязывающего белка, который связывает как Т-клетку, так и антигенпрезентирующую клетку; двойного антигенсвязывающего белка BiTE; лиганда толл-подобного рецептора; цитокина; цитотоксической терапии; химиотерапии; лучевой терапии; низкомолекулярного ингибитора; низкомолекулярного агониста; иммуномодулятора; онколитического вируса; и эпигенетического модулятора.

[0109] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия выбрана из группы, состоящей из: антитела к PD1, антитела к PDL1; или антитело к CTLA4.

[0110] В еще одном аспекте в данном документе представлены способы уничтожения, инактивации или истощения миелоидных клеток, которые экспрессируют триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 1, (TREM1) на поверхности клетки, включающие приведение в контакт миелоидных клеток с антителом или фармацевтической композицией, как описано в данном документе.

[0111] В некоторых вариантах осуществления антитело уничтожает, инактивирует или истощает миелоидные клетки по меньшей мере одним из АЗКЦ, КЗЦ и АЗКФ, необязательно при этом антитело уничтожает, инактивирует или истощает миелоидные клетки путем АЗКЦ, при этом необязательно антитело уничтожает, инактивирует или истощает миелоидные клетки путем КЗЦ, и при этом необязательно антитело уничтожает, инактивирует или истощает миелоидные клетки путем АЗКФ.

[0112] В некоторых вариантах осуществления антитело уничтожает миелоидные клетки путем по меньшей мере одного из АЗКЦ, КЗЦ и АЗКФ.

[0113] В некоторых вариантах осуществления антитело инактивирует миелоидные клетки путем по меньшей мере одного из АЗКЦ, КЗЦ и АЗКФ.

[0114] В некоторых вариантах осуществления антитело истощает миелоидные клетки путем по меньшей мере одного из АЗКЦ, КЗЦ и АЗКФ.

[0115] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ).

[0116] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ).

[0117] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность антитело-опосредованного фагоцитоза (АЗКФ).

[0118] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность, блокирующую рецептор-лиганд, агонистическую или антагонистическую активность.

[0119] В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки представляют собой стимулирующие миелоидные клетки.

[0120] В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки представляют собой нестимулирующие миелоидные клетки.

[0121] В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки содержат по меньшей мере одну из дендритных клеток, опухлеассоциированных макрофагов (ОАМ), нейтрофилов, моноцитов или миелоидных супрессорных клеток.

[0122] В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки представляют собой нейтрофилы или опухлеассоциированные нейтрофилы.

[0123] В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки представляют собой опухлеассоциированные макрофаги.

[0124] В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки представляют собой моноцитарные миелоидные супрессорные клетки.

[0125] В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки находятся внутри опухоли.

[0126] В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, включающей стимулирующие миелоидные клетки и нестимулирующие миелоидные клетки.

[0127] В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляют *in vitro* или *in vivo*.

[0128] В некоторых вариантах осуществление приведение в контакт происходит *in vivo* у субъекта, необязательно при этом указанный субъект имеет рак.

[0129] В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек.

[0130] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидный рак.

[0131] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз.

[0132] В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из: меланомы, рака почек, гепатобилиарного рака, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКГШ), рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака мочевого пузыря, рака уротелия, глиобластомы, рака предстательной железы, рака легкого, рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, рака пищевода, рака почек, рака эндометрия, рака шейки матки, рака яичек и мезотелиомы.

[0133] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудка, рак яичников, рак толстой кишки или рак молочной железы.

[0134] В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт усиливает иммунный ответ у субъекта.

[0135] В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ.

[0136] В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.

[0137] В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ включает экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина.

[0138] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один цитокин или хемокин выбран из группы, состоящей из: ИФН- γ , ИЛ-1 α , ИЛ-12, ИЛ-2, TNFSF9, TNFSF10, CXCL9, CXCL10, CCL17, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL11, CXCL15, CCL3, CCL4, CCL2, FasL, CD274, CRTAM, гранзима A (GzmA) или гранзима B (GzmB).

[0139] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один цитокин или хемокин представляет собой CXCL10 или ИФН- γ .

[0140] В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал, одновременно получает или впоследствии получит иммунотерапию.

[0141] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия представляет собой по меньшей мере одно из: ингибитора контрольной точки; ингибитора контрольной точки Т-клеток; антитела к PD1; антитела к PDL1; антитела к CTLA4; адаптивной клеточной терапии; адаптивной Т-клеточной терапии; CAR-Т-клеточной терапии; вакцины из дендритных клеток; агониста STING; моноцитарной вакцины; вакцины бацилл Кальметта-Герена; антигенсвязывающего белка, который связывает как Т-клетку, так и антигенпрезентирующую клетку; двойного антигенсвязывающего белка BiTE; лиганда толл-подобного рецептора; цитокина; цитотоксической терапии; химиотерапии; лучевой терапии; низкомолекулярного ингибитора; низкомолекулярного агониста; иммуномодулятора; онколитического вируса; и эпигенетического модулятора.

[0142] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия выбрана из группы, состоящей из: антитела к PD1, антитела к PDL1; или антителу к CTLA4.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0143] Эти и другие особенности, аспекты и преимущества настоящего изобретения станут более понятными с учетом следующего описания и сопроводительных графических материалов, на которых:

[0144] На Фиг. 1 показана кинетика связывания PI-4026-5 методом ППР.

[0145] На Фиг. 2А показано связывание PI-4026-5 с контрольными клетками НЕК293. На Фиг. 2В показано связывание PI-4026-5 с клетками НЕК293, сверхэкспрессирующими TREM1 человека.

[0146] На Фиг. 3А показано связывание PI-4026-5 с нейтрофилами периферической крови человека. На Фиг. 3В показано связывание PI-4026-5 с моноцитами периферической крови человека.

[0147] На **Фиг. 4А** показано связывание PI-4026-5 с клетками, экспрессирующими TREM1 яванского макака. На **Фиг. 4В** показано отсутствие связывания PI-4026-5 с клетками, экспрессирующими TREM1 мыши.

[0148] На **Фиг. 5А** показан сигналинг FcγR, индуцированный PI-4026-5 с использованием систем для анализа репортерного гена hCD16. На **Фиг. 5В** показан сигналинг FcγR, индуцированный PI-4026-5 с использованием систем для анализа репортерного гена hCD32.

[0149] На **Фиг. 6А** показано, что PI-4026-5 не индуцирует АЗКФ исходных клеток eхрi293 первичными макрофагами человека. На **Фиг. 6В** показано, что PI-4026-5 индуцирует АЗКФ клеток eхрi293, экспрессирующих hTREM1, первичными макрофагами человека.

[0150] На **Фиг. 7А** показано взаимодействие остатков в CDRH1 Fab PI-4026 и домена IgV к TREM1. На **Фиг. 7В** показано взаимодействие остатков в CDRH2 Fab PI-4026 и домена IgV к TREM1. На **Фиг. 7С** показано взаимодействие остатков в CDRH3 Fab PI-4026 и домена IgV к TREM1. На **Фиг. 7D** показано взаимодействие остатков в CDRL1 Fab PI-4026 и домена IgV к TREM1. На **Фиг. 7Е** показано взаимодействие остатков в CDRL3 Fab PI-4026 и домена IgV к TREM1.

[0151] На **Фиг. 8** показаны профили ЭХ PI-4026-5 после воздействия различных концентраций H₂O₂.

[0152] На **Фиг. 9А** показано, что фукозилированные антитела PI-4026-5 связываются с периферическими моноцитами человека. На **Фиг. 9В** показано, что афукозилированные антитела PI-4026-5 связываются с периферическими моноцитами человека.

[0153] На **Фиг. 10А** показано, что фукозилированные антитела PI-4026-5 связываются с периферическими моноцитами яванского макака. На **Фиг. 10В** показано, что афукозилированные антитела PI-4026-5 связываются с периферическими моноцитами яванского макака.

[0154] На **Фиг. 11А** показан сигналинг FcγR, индуцированный фукозилированным PI-4026-5 с использованием систем для анализа репортерного гена hCD16. На **Фиг. 11В** показан сигналинг FcγR, индуцированный афукозилированными антителами PI-4026-5 с использованием системы для анализа репортерного гена hCD16.

[0155] На **Фиг. 12А** показан средний радиус антител PI64052 (PI-4026-5-M100L) и PI64062 (PI-4026-5-M100Q), определенный с помощью ДРС в ответ на тепловой стресс. На **Фиг. 12В** показан % полидисперсности антител PI64052 и PI64062, как определено с помощью ДРС в ответ на тепловой стресс. Вышеуказанное относится к измерениям кинетики стабильности.

[0156] На **Фиг. 13А** показан % мономера антител PI64052 и PI64062, определенный с помощью ЭХ в ответ на тепловой стресс. На **Фиг. 13В** показан % совокупности антител PI64052 и PI64062, как определено с помощью ЭХ в ответ на тепловой стресс. Вышеуказанное относится к измерениям кинетики стабильности.

[0157] На **Фиг. 14А** показан % основных молекул антител PI64052 и PI64062 через 24 часа после воздействия различных концентраций H₂O₂ с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий. На **Фиг. 14В** показан % гидрофильных молекул антител PI64052 и PI64062 через 24 часа после воздействия различных концентраций H₂O₂ с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий. Вышеуказанное относится к измерениям чувствительности к окислительному стрессу.

[0158] На **Фиг. 15А** показан % основных молекул антител PI64052 и PI64062 через 14 дней после воздействия различных концентраций H₂O₂ с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий. На **Фиг. 15В** показан % гидрофильных молекул антител PI64052 и PI64062 через 14 дней после воздействия различных концентраций H₂O₂ с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий. Вышеуказанное относится к измерениям чувствительности к окислительному стрессу.

[0159] На **Фиг. 16А** показаны % основных молекул антител PI64052 и PI64062 через 28 дней после воздействия различных концентраций H₂O₂ с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий. На **Фиг. 16В** показан % гидрофильных молекул антител PI64052 и PI64062 через 28 дней после воздействия различных концентраций H₂O₂ с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий.

[0160] На **Фиг. 17А** показаны результаты анализа дезамидирования антител PI64052 и PI64062. На **Фиг. 17В** показаны результаты анализа дезамидирования антител PI64052 и PI64062. На **Фиг. 17С** показаны результаты анализа дезамидирования антител PI64052 и PI64062. На **Фиг. 17D** показаны результаты анализа дезамидирования антител PI64052 и PI64062.

[0161] На **Фиг. 18А** показано отсутствие фоновое связывания PI64052 и PI64062 с клетками HEK293. На **Фиг. 18В** показано отсутствие фоновое связывания PI64052 и PI64062 с клетками HEK293. На **Фиг. 18С** показано отсутствие фоновое связывания PI64052 и PI64062 с клетками HEK293.

[0162] На **Фиг. 19А** показано отсутствие связывания PI64052 и PI64062 с лимфоцитами (Т-клетками). На **Фиг. 19В** показано отсутствие связывания PI64052 и PI64062 с лимфоцитами (Т-клетками). На **Фиг. 19С** показано отсутствие связывания PI64052 и PI64062 с лимфоцитами (Т-клетками). На **Фиг. 19D** показано отсутствие связывания PI64052 и PI64062 с лимфоцитами (В-клетками). На **Фиг. 19Е** показано отсутствие связывания PI64052 и PI64062 с лимфоцитами (В-клетками). На **Фиг. 19F** показано отсутствие связывание PI64052 и PI64062 с лимфоцитами (В-клетками).

[0163] На **Фиг. 20А** показано связывание антител PI64052 и PI64062 с клетками HEK293, сверхэкспрессирующими TREM1 человека. На **Фиг. 20В** показано связывание антител PI64052 и PI64062 с клетками HEK293, сверхэкспрессирующими TREM1 человека. На **Фиг. 20С** показано связывание антител PI64052 и PI64062 с клетками HEK293, сверхэкспрессирующими TREM1 человека.

[0164] На **Фиг. 21А** показано связывание антител PI64052 и PI64062 с клетками HEK293, сверхэкспрессирующими TREM1 яванского макака. На **Фиг. 21В** показано связывание антител PI64052 и PI64062 с клетками HEK293, сверхэкспрессирующими TREM1 яванского макака. На **Фиг. 21С** показано связывание антител PI64052 и PI64062 с клетками HEK293, сверхэкспрессирующими TREM1 яванского макака.

[0165] На **Фиг. 22А** показано связывание PI64052 и PI64062 с моноцитами человека. На **Фиг. 22В** показано связывание PI64052 и PI64062 с моноцитами человека. На **Фиг. 22В** показано связывание PI64052 и PI64062 с моноцитами человека.

[0166] На **Фиг. 23А** показано связывание PI64052 и PI64062 с моноцитами яванского макака. На **Фиг. 23В** показано связывание PI64052 и PI64062 с моноцитами яванского макака.

[0167] На **Фиг. 24** показан сигналинг FcγR, индуцированный PI64052 и PI64062, с использованием системы для анализа репортерного гена hCD16, и она отображает 3 отдельных эксперимента.

[0168] На **Фиг. 25А** показано, что PI64052 индуцирует АЗКФ клеток ехрі, экспрессирующих hTREM1, но не исходных клеток ехрі, первичными макрофагами человека. На **Фиг. 25В** показано, что PI64062 индуцирует АЗКФ клеток ехрі, экспрессирующих hTREM1, но не исходных клеток ехрі, первичными макрофагами человека. На **Фиг. 25С** показано, что PI64052 индуцирует АЗКФ клеток ехрі, экспрессирующих hTREM1, но не исходных клеток ехрі, первичными макрофагами человека. На **Фиг. 25D** показано, что PI64062 индуцирует АЗКФ клеток ехрі, экспрессирующих hTREM1, но не исходных клеток ехрі, первичными макрофагами человека.

[0169] На **Фиг. 26А** показано связывание PI64052 и PI64062 и их фукозилированных исходных вариантов (PI-4026-5-M100L и PI-4026-5-M100Q, соответственно) с hFcγRI. На **Фиг. 26В** показано связывание PI64052 и PI64062 и их фукозилированных исходных вариантов с hFcγRIIα. На **Фиг. 26С** показано связывание PI64052 и PI64062 и их фукозилированных исходных вариантов с hFcγRIIβ. На **Фиг. 26D** показано связывание PI64052 и PI64062 и их фукозилированных исходных вариантов с hFcγRIIIα. На **Фиг. 26Е** показано связывание PI64052 и PI64062 и их фукозилированных исходных вариантов с hFcγRIIIα. На **Фиг. 26F** показано связывание PI64052 и PI64062 и их фукозилированных исходных вариантов с hFcγRIIIβ.

[0170] На **Фиг. 27А** показана дозозависимая занятость рецепторов PI-4026-5-M100Q и афукозилированным PI-4026-5-M100Q на моноцитах из периферической крови. На **Фиг. 27В** показано дозозависимая занятость рецепторов PI-4026-5-M100Q и афукозилированным PI-4026-5-M100Q на нейтрофилах из периферической крови.

[0171] На **Фиг. 28А** показано, что афукозилированный PI-4026-5-M100Q индуцирует более устойчивое дозозависимое высвобождение цитокинов ИФН-γ из лейкоцитов периферической крови человека, чем PI-4026-5-M100Q. На **Фиг. 28В** показано, что афукозилированное PI-4026-5-M100Q индуцирует более устойчивое дозозависимое высвобождение цитокина ИЛ-8 из лейкоцитов периферической крови человека, чем PI-4026-5-M100Q. На **Фиг. 28С** показано, что афукозилированное PI-4026-5-M100Q индуцирует более устойчивое дозозависимое высвобождение цитокина ИЛ-2 из лейкоцитов периферической крови человека, чем PI-4026-5-M100Q. На **Фиг. 28D** показано, что афукозилированное PI-4026-5-M100Q индуцирует более устойчивое дозозависимое высвобождение цитокина IP-10 из лейкоцитов периферической крови человека, чем PI-4026-5-M100Q.

[0172] На **Фиг. 29А** показано, что комбинированная терапия афукозилированными антителами к TREM1 и PD-1 PI-4928 индуцирует профиль цитокинов периферической крови *in vivo*. На **Фиг. 29В** показано, что комбинированная терапия афукозилированными антителами PI-4928 к TREM1 и PD-1 индуцирует профиль цитокинов периферической крови *in vivo*.

[0173] На **Фиг. 30** показано, что афукозилированное антитело PI-9067 к TREM1 обладает монотерапевтической активностью в модели опухоли Panc02.

[0174] На **Фиг. 31А** представлены кривые роста для каждой мыши из группы изотипа в модели опухоли Panc02. На **Фиг. 31В** представлены кривые роста для каждой мыши из группы анти-PD-1 в модели опухоли Panc02. На **Фиг. 31С** представлены кривые роста для каждой мыши из группы анти-TREM1 в модели опухоли Panc02. На **Фиг. 31D** представлены кривые роста для каждой мыши из группы анти-TREM1 и анти-PD-1 в модели опухоли Panc02.

[0175] На **Фиг. 32** представлены объемы опухолей на 28 день для каждой мыши из каждой указанной группы в модели опухоли Рапс02.

[0176] На **Фиг. 33** показано, что TREM1 человека экспрессируется при различных онкологических показаниях и ограничивается миелоидными клетками.

[0177] На **Фиг. 34А** показано кратность изменения в цитокинах, индуцированных афукозилированным PI64062 в клетках крови человека. На **Фиг. 34В** показано повышение поверхностной экспрессии HLA-DR после обработки афукозилированным PI64062. На **Фиг. 34С** показано повышение уровня поверхностной экспрессии CD40 после обработки афукозилированным PI64062.

[0178] На **Фиг. 35** показана матрица экспрессии 1000 генов с наибольшей дисперсией в образцах крови, отсортированных по типу клеток. Кластеризация экспрессии генов хорошо коррелировала с отсортированными популяциями иммунных клеток.

[0179] На **Фиг. 36А** показана экспрессия гена HLA-DR в указанных типах клеток после обработки изотипическим антителом (ISO) или обработкой антителом к TREM1 (афукозилированное PI64062). На **Фиг. 36В** показана экспрессия гена CD40 в указанных типах клеток после обработки изотипическим антителом (ISO) или обработкой антителом к TREM1 (афукозилированное PI64062). На **Фиг. 36С** показана экспрессия гена CD80 в указанных типах клеток после обработки изотипическим антителом (ISO) или обработкой антителом к TREM1 (афукозилированное PI64062). На **Фиг. 36D** показана экспрессия гена CD86 в указанных типах клеток после обработки изотипическим антителом (ISO) или обработкой антителом к TREM1 (афукозилированное PI64062).

[0180] На **Фиг. 37А** показаны репрезентативные наложения гистограмм для экспрессии HLA-DR на клеточной поверхности в моноцитах после обработки антителом к TREM1 (афукозилированное PI64062). На **Фиг. 37В** показаны репрезентативные наложения гистограмм для экспрессии CD40 на клеточной поверхности в моноцитах после обработки антителом к TREM1 (афукозилированное PI64062). На **Фиг. 37С** показаны репрезентативные наложения гистограмм экспрессии CD80 на клеточной поверхности в моноцитах после обработки антителом к TREM1 (афукозилированное PI64062). На **Фиг. 37D** показаны репрезентативные наложения гистограмм экспрессии CD86 на клеточной поверхности в моноцитах после обработки антителом к TREM1 (афукозилированное PI64062).

[0181] На **Фиг. 38А** показано процентное содержание pERK и pSTAT3 в нейтрофилах, моноцитах или Т-клетках после обработки изотипическим контролем или афукозилированным антителом PI64062. На **Фиг. 38В** (* <0,05, ** <0,001) показано результаты анализа методом РНК-секвенирования путей ERK и STAT, демонстрируя значительное обогащение генов, связанных с этими путями, в моноцитах, но не в нейтрофилах или NK-клетках.

[0182] На **Фиг. 39** показаны хемокины и цитокины, активируемые антителом к TREM1 в мышцах или клетках крови человека.

[0183] На **Фиг. 40** показано, что афукозилированное антитело PI-9067L к TREM1 обладает монотерапевтической активностью в модели опухоли яичника ID8.

[0184] На **Фиг. 41** показано, что афукозилированное антитело PI-9067L индуцирует иммунную память у повторно зараженных мышей в модели опухоли СТ26.

[0185] На **Фиг. 42А** показана экспрессия TREM1 при колоректальном раке. На **Фиг. 42В** показана вероятность выживаемости пациента с колоректальным раком и экспрессия TREM1.

[0186] На **Фиг. 43А** показано, что афукозилированное антитело PI-4928 к TREM1 демонстрирует дозозависимую фармакокинетику. На **Фиг. 43В** показан растворимый мышинный TREM1 в сыворотке после обработки афукозилированным антителом PI-4928 к TREM1.

[0187] На **Фиг. 44А** показано количество клеток крови на 7 день. На **Фиг. 44В** показано количество клеток крови на 14 день. На **Фиг. 44С** показаны параметры эритроцитов мыши на 7 день. На **Фиг. 44D** показаны значения параметров эритроцитов мыши на 14 день.

[0188] На **Фиг. 45А** показана противоопухолевая эффективность лечения анти-TREM1, анти-PD-1 или комбинацией анти-TREM1 и анти-PD-1 у самок мышей BALB/c с небольшими подкожными опухолями EMT6. На **Фиг. 45В** показана противоопухолевая эффективность лечения анти-TREM1, анти-PD-1 или комбинацией анти-TREM1 и анти-PD-1 у самок мышей BALB/c с крупной подкожной опухолью EMT6.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

[0189] Если не указано иное, все термины, обозначения и другая научная терминология, используемые в данном документе, предназначены для того, чтобы иметь значения, обычно понятные специалистам в области техники. В некоторых случаях термины с общепринятыми значениями определены в данном документе для ясности и/или для удобства ссылки, и включение таких определений в данный документ не обязательно должно толковаться как представляющее отличие от того, что обычно учитывается в данной области техники. Способы и процедуры, описанные или на которые в данном документе делается ссылка, как правило, являются хорошо понятными и обычно используются специалистами в данной области техники с использованием широкопринятых методологий, таких как, например, широко используемые методологии молекулярного клонирования, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4th ed. (2012) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. В зависимости от конкретного случая процедуры, включающие использование имеющихся в продаже наборов и реагентов в целом проводятся в соответствии с протоколами и условиями, определенными производителем, если не указано иное.

[0190] В контексте данного документа, слова в единственном числе означают также и множественное число, если не указано иное.

[0191] Понятно, что аспекты и варианты осуществления данного изобретения, описанные в данном документе, включают в себя аспекты и варианты «содержащий», «состоящий из» и «состоящий по существу из».

[0192] Для всех описанных в данном документе композиций и всех способов с использованием описанных в данном документе композиций композиции могут либо содержать перечисленные компоненты или стадии, либо могут «состоять по существу из» перечисленных компонентов или стадий. Когда композиция описывается как «состоящая по существу из» перечисленных компонентов, композиция содержит перечисленные компоненты и может содержать другие компоненты, которые существенно не влияют на патологическое состояние, которое лечат, но не содержат каких-либо других компонентов, которые

существенно влияют на патологическое состояние, которое лечат, кроме тех компонентов, которые явно указаны; или, если композиция действительно содержит дополнительные компоненты, кроме перечисленных, которые существенно влияют на патологическое состояние, которое лечат, композиция не содержит достаточной концентрации или количества дополнительных компонентов, чтобы существенно повлиять на патологическое состояние, которое лечат. Когда способ описан как «состоящий в основном из» перечисленных стадий, способ включает перечисленные стадии и может включать другие стадии, которые существенно не влияют на патологическое состояние, которое лечат, но способ не включает никаких других стадий, которые существенно влияют на патологическое состояние, которое лечат, кроме тех стадий, которые явно перечислены. В качестве неограничивающего конкретного примера, когда композиция описана как «состоящая по существу из» компонента, композиция может дополнительно содержать любое количество фармацевтически приемлемых носителей, наполнителей или разбавителей и других таких компонентов, которые существенно не влияют на патологическое состояние, которое лечат.

[0193] Термин «вектор» в контексте данного документа относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной обеспечивать репродукцию другой нуклеиновой кислоты, связанной с ней. Термин включает вектор как самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, который включен в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в данном документе называют «векторами экспрессии».

[0194] Термины «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используются как взаимозаменяемые и относятся к клеткам, в которые введена экзогенная нуклеиновая кислота, и потомству таких клеток. Клетки-хозяева включают «трансформанты» (или «трансформированные клетки») и «трансфектанты» (или «трансфицированные клетки»), каждый из которых включает первично трансформированную или трансфицированную клетку и потомство, полученное от нее. Такое потомство может не быть полностью идентичным исходной клетке по содержанию нуклеиновых кислот, и может содержать мутации.

[0195] «Эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» в контексте данного документа относится к количеству терапевтического соединения, такого как антитело к TREM1, которое вводится индивидууму, или в виде разовой дозы, или в виде части серии доз, которые эффективны для получения или обеспечения желаемого терапевтического эффекта, или отдельно, или в комбинации с другим терапевтическим воздействием. Примеры желаемого терапевтического эффекта представляют собой усиление иммунного ответа, замедление или задержку развития опухоли; стабилизацию болезни; улучшение одного или более симптомов. Эффективное количество может быть обеспечено в одной или более дозах.

[0196] Термин «процесс лечения» (и его варианты, такие как «лечить» или «лечение») относится к клиническому вмешательству в попытке изменить естественное течение заболевания или патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом. Лечение можно проводить в процессе клинического проявления патологии. Желательные эффекты лечения включают предотвращение рецидива заболевания, ослабление симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, уменьшение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или смягчение болезненного состояния, а также ремиссию или улучшение прогноза.

[0197] Термин «достаточное количество» означает количество, достаточное для получения желаемого эффекта, например, количество, достаточное для модуляции иммунного ответа у субъекта.

[0198] Используемый в данном документе термин «субъект» или «индивидуум» означает млекопитающего. Примеры субъектов включают людей, обезьян, собак, кошек, мышей, крыс, коров, лошадей, верблюдов, коз, кроликов и овец. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает заболеванием или патологическим состоянием, которое можно лечить с помощью антител, представленных в данном документе. В некоторых аспектах заболевание или патологическое состояние представляет собой рак. В некоторых аспектах заболевание или патологическое состояние представляет собой вирусную инфекцию.

[0199] Термин «*in vitro*» относится к процессам, которые происходят в живой клетке, растущей отдельно от живого организма, например, при росте в культуре ткани.

[0200] Термин «*in vivo*» относится к процессам, происходящим в живом организме.

[0201] Термин «листок-вкладыш в упаковке» используется для обозначения инструкций, которые обычно вкладывают в коммерческие упаковки терапевтических или диагностических продуктов для продажи (например, наборы), содержащие информацию о показаниях, использовании, дозах, приеме, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях, которые касаются использования таких терапевтических или диагностических продуктов.

[0202] Используемый в данном документе термин «цитотоксический агент» относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает клеточную функцию и/или вызывает гибель или разрушение клеток.

[0203] «Химиотерапевтический агент» относится к химическому соединению, используемому при лечении рака. Химиотерапевтические агенты включают «антигормональные агенты» или «эндокринные терапевтические агенты», которые действуют, регулируя, уменьшая, блокируя или подавляя эффекты гормонов, которые могут способствовать росту злокачественного новообразования.

[0204] Термин «цитостатический агент» относится к соединению или композиции, которые останавливают рост клетки либо *in vitro*, либо *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления цитостатический агент представляет собой агент, который снижает процент клеток в S-фазе. В некоторых вариантах осуществления цитостатический агент снижает процент клеток в S-фазе на по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 60% или на по меньшей мере около 80%.

[0205] Термин «опухоль» относится ко всем видам роста и пролиферации опухолевых клеток, будь то злокачественные или доброкачественные, и всем предраковым и раковым клеткам и тканям. Термины «злокачественное новообразование», «злокачественный», «нарушение пролиферации клеток», «пролиферативное расстройство» и «опухоль» не исключают друг друга, как упоминается в данном документе. Термины «нарушение пролиферации клеток» и «пролиферативное нарушение» относятся к нарушениям, которые связаны с некоторой степенью аномальной пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления нарушение пролиферации клеток представляет собой рак. В некоторых аспектах опухоль представляет собой солидную опухоль. В некоторых аспектах опухоль является гематологической злокачественной опухолью.

[0206] Термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы позволить биологической активности содержащегося в нем активного ингредиента быть эффективной

при лечении субъекта, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта в количествах, предусмотренных в фармацевтической композиции.

[0207] Термины «совместное введение», «совместно вводить» и «в комбинации с» включают введение двух или более терапевтических агентов совмещенно, одновременно или последовательно без каких-либо конкретных временных ограничений. В одном варианте осуществления агенты присутствуют в клетке или в теле субъекта одновременно или одновременно оказывают биологический или терапевтический эффект. В одном варианте осуществления терапевтические агенты находятся в одном и том же составе или в виде единичной дозированной формы. В другом варианте осуществления терапевтические агенты находятся в различных композициях или в единичной дозированной формы. В определенных вариантах осуществления первый агент можно вводить до введения второго терапевтического агента.

[0208] Термины «модулировать» и «модуляция» относятся к уменьшению или ингибированию или, альтернативно, активации или увеличению указанной переменной.

[0209] Термины «увеличить» и «активировать» относятся к увеличению на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз или на большее значение в указанной переменной.

[0210] Термины «уменьшить» и «ингибировать» относятся к уменьшению на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз или на большее значение в указанной переменной.

[0211] Термин «около» указывает и охватывает указанное значение и диапазон выше и ниже этого значения. В определенных вариантах осуществления термин «около» означает указанное значение $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 1\%$. В определенных вариантах осуществления, где это применимо, термин «около» указывает обозначенное значение(-я) $\pm$ одно стандартное отклонение этого значения(-й).

[0212] Термин «агонизировать» относится к активации сигналинга рецептора, чтобы индуцировать биологический ответ, связанный с активацией рецептора. «Агонист» представляет собой соединение, которое связывается с рецептором и агонизирует его.

[0213] Термин «антагонизировать» относится к ингибированию сигналинга рецептора для ингибирования биологического ответа, связанного с активацией рецептора. «Антагонист» представляет собой соединение, которое связывается с рецептором и антагонизирует его.

[0214] Для любых описанных в данном документе структурных и функциональных характеристик способы определения этих характеристик известны в данной области техники.

[0215] Термин «необязательно» при последовательном использовании означает включение от одной до всех перечисленных комбинаций и предполагает все подкомбинации.

[0216] Термин «аминокислота» относится к двадцати обычным природным аминокислотам. Природные аминокислоты включают аланин (Ala; A), аргинин (Arg; R), аспарагин (Asn; N), аспарагиновую кислоту (Asp; D), цистеин (Cys; C), глутаминовую кислоту (Glu; E), глутамин (Gln; Q), глицин (Gly; G), гистидин (His; H), изолейцин (Ile; I), лейцин (Leu; L), лизин (Lys; K), метионин (Met; M), фенилаланин (Phe; F), пролин (Pro; P), серин (Ser; S), треонин (Thr; T), триптофан (Trp; W), тирозин (Tyr; Y) и валин (Val; V).

[0217] Термин «процент идентичности» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые имеют определенный процент одинаковых нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, как измерено с использованием одного из алгоритмов сравнения последовательностей, описанных ниже (например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLASTP, BLASTN, BLAST-2, ALIGN, MEGALIGN (DNASTAR), CLUSTALW, CLUSTAL OMEGA или программного обеспечения MUSCLE или других алгоритмов, доступных специалистам) или путем визуального осмотра. Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным через Национальный центр биотехнологической информации (ncbi.nlm.nih.gov). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. В зависимости от применения процент «идентичности» может наблюдаться в области сравниваемой последовательности, например, в функциональном домене, или, альтернативно, существовать по всей длине двух сравниваемых последовательностей.

[0218] Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность служит эталонной последовательностью с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости, обозначают координаты последовательности и указывают программные параметры алгоритма для работы с последовательностями. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательностей для исследуемой последовательности(-ей) по сравнению с эталонной последовательностью на основании программных параметров.

[0219] Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии согласно Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), алгоритма гомологичного выравнивания согласно Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), поиск по методу сходства согласно Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), путем компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA, и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин, США), или путем визуального осмотра (см. в целом Ausubel et al., ниже).

[0220] Считается, что диапазоны, указанные в данном документе, являются сокращением для всех значений в пределах диапазона, включая указанные конечные точки. Например, под диапазоном «от 1 до 50» понимается любое число, комбинация чисел или поддиапазон из группы, состоящей из чисел 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 и 50.

Антитело к TREM1

Структура

[0221] Настоящая заявка обеспечивает антитела и композиции, содержащие антитело, которое связывает белок TREM1, включая антитела, которые инактивируют нестимулирующие миелиоидные клетки.

[0222] Термин «антитело» используется в данном документе в самом широком смысле и включает определенные типы молекул иммуноглобулинов, содержащих один или более антигенсвязывающих доменов, которые специфически связываются с антигеном или эпитопом. Антитело, в частности, включает интактные антитела (например, интактные иммуноглобулины), фрагменты антител и полиспецифичные антитела.

[0223] Распознанные гены иммуноглобулинов включают гены константных областей каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эпсилон и мю, а также множество генов переменных областей иммуноглобулинов. Легкие цепи классифицируются на каппа или лямбда. «Класс» антитела или иммуноглобулина относится к типу константного домена или константной области, содержащейся в его тяжелой цепи. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно.

[0224] Структурная единица иллюстративного иммуноглобулина (антитела) состоит из двух пар полипептидных цепей, каждая пара содержит одну «легкую» цепь (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь иммуноглобулина (около 50–70 кДа). N-концевой домен каждой цепи определяет переменную область от около 100 до 110 или более аминокислот, в основном ответственных за распознавание антигена. Термины переменный легкий цепи (VL) и переменный тяжелой цепи (VH) относятся к этим доменам легкой и тяжелой цепи, соответственно. Тяжелая цепь IgG1 содержит, соответственно от N- до C-конца, домены VH, CH1, CH2 и CH3. Легкая цепь содержит домены VL и CL от N- до C-конца. Тяжелая цепь IgG1 содержит шарнир между доменами CH1 и CH2. В определенных вариантах осуществления иммуноглобулиновые конструкции содержат по меньшей мере один домен иммуноглобулина из IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, связанный с терапевтическим полипептидом. В некоторых вариантах осуществления домен иммуноглобулина, обнаруженный в антителе, представленном в данном документе, получен из конструкции на основе иммуноглобулина, такой как диатело или наноантитело, или получен из нее. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновые конструкции, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере один домен иммуноглобулина из антитела, состоящего из тяжелых цепей, такого как верблюжье антитело. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновые конструкции, представленные в данном документе, содержат по меньшей мере один домен иммуноглобулина из антитела млекопитающего, такого как антитело крупного рогатого скота, антитело человека, верблюжье антитело, антитело мыши или любое химерное антитело.

[0225] В некоторых вариантах осуществления антитела, представленные в данном документе, содержат тяжелую цепь. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgA. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgD. В одном варианте

осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgE. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgG. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgM. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgG1. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgG2. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgG3. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgG4. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgA1. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgA2.

[0226] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG1.

[0227] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG3.

[0228] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG2.

[0229] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG4.

[0230] Используемый в данном документе термин «гипервариабельная область» или «HVR» относится к каждой из областей вариабельного домена антитела, являющихся гипервариабельными по последовательности и/или образующих структурно определенные петли («гипервариабельные петли»). Как правило, нативные четырехцепочечные антитела содержат шесть HVR: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). HVR обычно содержат аминокислотные остатки из гипервариабельных петель и/или из «определяющих комплементарность областей» (CDR), причем последние характеризуются высочайшей изменчивостью последовательности и/или участвуют в распознавании антигенов. За исключением CDR1 в VH, CDR обычно содержат аминокислотные остатки, образующие гипервариабельные петли. Гипервариабельные области (HVR) также называют «определяющими комплементарность областями» (CDR), и эти термины используются в данном документе взаимозаменяемо по отношению к частям вариабельной области, которые образуют антигенсвязывающие области. Эта конкретная область была описана у Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) и у Chothia et al., J Mol Biol 196:901–917 (1987), где определения включают перекрывание или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее предполагается, что применение любого определения для обозначения CDR антитела или его вариантов находится в пределах объема термина, определенного и используемого в данном документе. Точные номера остатков, которые охватывают конкретную CDR, будут варьироваться в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники могут обычным образом определить, какие остатки содержат конкретный CDR, учитывая аминокислотную последовательность вариабельной области антитела.

[0231] Границы аминокислотной последовательности CDR могут быть определены специалистом в данной области техники с помощью любой из ряда известных схем нумерации, включая схемы, описанные Kabat et al., выше (схема нумерации «Kabat»); Al-Lazikani et al., 1997, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948 (схема нумерации «Chothia»); MacCallum et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (схема нумерации «Contact»); Lefranc et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 2003, 27:55-77 (схема нумерации «IMGT»); и Honegge and Plückthun, *J. Mol. Biol.*, 2001, 309:657-70 (схема нумерации «АНо»); каждая из которых полностью включена посредством ссылки.

[0232] В таблице А представлены положения CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, как определено схемами Kabat и Chothia. Для CDR-H1 нумерация остатков обеспечивается с использованием схем нумерации Kabat и Chothia.

[0233] CDR могут быть присвоены, например, с использованием программного обеспечения для нумерации антител, такого как Abnum, доступного на www.bioinf.org.uk/abs/abnum/ и описанного в Abhinandan and Martin, *Immunology*, 2008, 45:3832-3839, включенного по ссылке в полном объеме.

Таблица А. Остатки в CDR согласно схемам нумерации Kabat и Chothia.

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

* С-конец CDR-H1 при нумерации с использованием системы нумерации по Kabat варьируется от H32 до H34, в зависимости от длины CDR.

[0234] «Схема нумерации EU», как правило, используется для обозначения остатка в константной области тяжелой цепи антитела (например, как описано у Kabat et al., выше). Если не указано иное, схема нумерации EU используется для обозначения остатков в константных областях тяжелой цепи антитела, описанных в данном документе.

[0235] Термин «антигенсвязывающий домен» означает часть антитела, которая способна специфически связываться с антигеном или эпитопом. Одним из примеров антигенсвязывающего домена является антигенсвязывающий домен, образованный димером VH-VL антитела. Другим примером антигенсвязывающего домена является антигенсвязывающий домен, образованный диверсификацией определенных петель из десятого домена фибронектина типа III аднектина. Антигенсвязывающий домен может включать CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи в указанном порядке; и CDR 1, 2 и 3 легкой цепи в указанном порядке.

[0236] Термин «эпитоп» означает часть антигена, которая специфически связывается с антителом. Эпитопы часто состоят из доступных на поверхности аминокислотных остатков и/или боковых цепей сахаров и могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические зарядовые характеристики. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первым, но не со вторым, может быть потеряно в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, которые непосредственно участвуют в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании. Эпитоп, с которым

связывается антитело, может быть определен с использованием известных методов определения эпитопа, таких как, например, тестирование связывания антитела с вариантами TREM1 с различными точечными мутациями или с химерными вариантами TREM1.

[0237] Для скрининга антител, которые связываются с эпитопом антигена-мишени, связанного с представляющим интерес антителом (например, TREM1), может быть выполнен стандартный анализ перекрестного блокирования, такой как описанный в *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Альтернативно или дополнительно картирование эпитопов может быть выполнено способами, известными в данной области техники.

[0238] Термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором фрагмент тяжелой и/или легкой цепи получен из конкретного источника или вида, в то время как часть тяжелой и/или легкой цепи получены из другого источника или вида.

[0239] «Антитело человека» представляет собой антитело, которое обладает аминокислотной последовательностью, соответствующей аминокислотной последовательности антитела, продуцируемого человеком или клеткой человека, или полученного из не относящегося к человеку источника, который использует репертуар антител человека или последовательности, кодирующие антитела человека (например, получены из человеческих источников или созданы *de novo*). Антитела человека конкретно исключают гуманизированные антитела.

[0240] «Гуманизированное антитело» имеет последовательность, которая отличается от последовательности антитела, полученного от не относящихся к человеку видов, одной или более аминокислотными заменами, делециями и/или добавлениями, так что гуманизированное антитело с меньшей вероятностью индуцирует иммунный ответ и/или индуцирует менее сильный иммунный ответ по сравнению с антителом отличного от человека вида, когда его вводят субъекту-человеку. В одном варианте осуществления определенные аминокислоты в каркасных и константных доменах тяжелой и/или легкой цепей антитела отличного от человека вида подвергают мутации с образованием гуманизированного антитела. В еще одном варианте осуществления константный домен(-ы) из антитела человека слит с переменным(-ыми) доменом(-ами) не относящегося к человеку вида. В еще одном варианте осуществления один или более аминокислотных остатков в одной или более последовательностях CDR нечеловеческого антитела изменены для снижения вероятной иммуногенности нечеловеческого антитела при его введении субъекту-человеку, причем измененные аминокислотные остатки либо не являются критическими для иммуноспецифического связывания антитела с его антигеном, либо внесенные изменения в аминокислотную последовательность являются консервативными изменениями, таким образом, чтобы связывание гуманизированного антитела с антигеном не намного хуже, чем связывание нечеловеческого антитела с антигеном. Примеры того, как получить гуманизированные антитела, можно найти в патентах США №№ 6054297, 5886152 и 5877293. Для получения дополнительной информации, см., Jones et al., *Nature*, 1986, 321:522-525; Riechmann et al., *Nature*, 1988, 332:323-329; и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, 2:593-596, каждый из которых включен в полном объеме посредством ссылки.

[0241] «Полиспецифичное антитело» представляет собой антитело, которое содержит два или более разных антигенсвязывающих домена, которые вместе специфически связывают два или более разных эпитопов. Два или более разных эпитопов могут быть эпитопами одного и того же антигена (например, одна молекула

TREM1, экспрессируемая клеткой) или разных антигенов (например, разные молекулы TREM1, экспрессируемые одной и той же клеткой, или молекула TREM1 и молекула, отличная от TREM1). В некоторых аспектах полиспецифичное антитело связывает два разных эпитопа (т. е. «биспецифичное антитело»). В некоторых аспектах полиспецифичное антитело связывает три разных эпитопа (т. е. «триспецифичное антитело»).

[0242] «Моноспецифичное антитело» представляет собой антитело, которое содержит один или более сайтов связывания, которые специфически связываются с одним эпитопом. Примером моноспецифичного антитела является встречающаяся в природе молекула IgG, которая, будучи двухвалентной (т. е. имеющей два антигенсвязывающих домена), распознает один и тот же эпитоп в каждом из двух антигенсвязывающих доменов. Специфичность связывания может иметь любую подходящую валентность.

[0243] Термин «моноклональное антитело» относится к антителу из популяции по существу гомогенных антител. Популяция по существу гомогенных антител включает антитела, которые по существу сходны и связывают один и тот же эпитоп(-ы), за исключением вариантов, которые обычно могут возникать во время продукции моноклонального антитела. Такие варианты, как правило, присутствуют только в незначительных количествах. Моноклональное антитело, как правило, получают с помощью процесса, который включает выбор одного антитела из множества антител. Например, процесс отбора может представлять собой отбор уникального клона из множества клонов, таких как пул гибридных клонов, фаговых клонов, дрожжевых клонов, бактериальных клонов или других клонов рекомбинантной ДНК. Выбранное антитело можно дополнительно изменить, например, для улучшения аффинности к мишени («созревание аффинности»), для гуманизации антитела, для улучшения его продукции в культуре клеток и/или для снижения его иммуногенности у субъекта.

[0244] Термин «одноцепочечный» относится к молекуле, содержащей аминокислотные мономеры, линейно связанные пептидными связями. В конкретном таком варианте осуществления С-конец легкой цепи Fab соединен с N-концом тяжелой цепи Fab в одноцепочечной молекуле Fab. Как более подробно описано в данном документе, scFv имеет переменный домен легкой цепи (VL), соединенный своим С-концом с N-концом переменного домена тяжелой цепи (VH) при помощи полипептидной цепи. С другой стороны, scFv содержит полипептидную цепь, где С-терминальный конец VH соединен с N-терминальным концом VL полипептидной цепью.

[0245] «Фрагмент Fab» (также называемый как антигенсвязывающий фрагмент) содержит константный домен (CL) легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи наряду с переменными доменами VL и VH, соответственно на легкой и тяжелой цепях. Переменные домены содержат определяющую комплементарность петли (CDR, также называемую гиперпеременной областью), которые вовлечены в связывании антигена. Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab добавлением нескольких остатков на карбоксильном конце домена CH1 тяжелой цепи, в том числе одного или более цистеинов из шарнирной области антитела.

[0246] Фрагменты «F(ab')₂» содержат два фрагмента Fab', соединенных около шарнирной области дисульфидными связями. Фрагменты F(ab')₂ можно получить, например, рекомбинантными методами или ферментативным расщеплением пепсином интактного антитела. Фрагменты F(ab') можно диссоциировать, например, обработкой β-меркаптоэтанолом.

[0247] Фрагменты «Fv» содержат нековалентно связанный димер одного вариабельного домена тяжелой цепи и одного вариабельного домена легкой цепи.

[0248] Используемые в данном документе термины «одноцепочечные Fv» или «sFv» или «scFv» включают домены VH и VL антитела, причем эти домены находятся в одной полипептидной цепи. В одном варианте осуществления полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, дающий возможность scFv образовываться требуемой структуре для связывания антигена. В качестве обзора scFv см. Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269–315 (1994). Фрагменты scFv антитела к HER2 описаны в WO93/16185; патенте США № 5571894; и патенте США. № 5587458.

[0249] 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 вариабельных доменов в scFv (т. е. VH-VL или VL-VH). Может быть использован любой подходящий домен Fc, известный в данной области техники или описанный в данном документе. В некоторых случаях домен Fc включает домен Fc IgG4.

[0250] Термин «однодоменное антитело» или «sdAb» относится к молекуле, в которой один вариабельный домен антитела специфически связывается с антигеном без присутствия другого вариабельного домена. Однодоменные антитела и их фрагменты описаны в Arabi Ghahroudi et al., *FEBS Letters*, 1998, 414:521-526 и Muyldermans et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 2001, 26:230-245, каждый из которых включен в полном объеме посредством ссылки. Однодоменные антитела также известны как sdAb или наноантитела. Sdab довольно стабильны и легко экспрессируются в качестве партнера по слиянию с цепью Fc антитела (Harmsen MM, De Haard HJ (2007). "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments". *Appl. Microbiol Biotechnol.* 77(1): 13-22).

[0251] Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «целое антитело» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, по существу аналогичную структуре природного антитела, и имеющего тяжелые цепи, которые содержат область Fc. Например, «полноразмерное антитело», когда используется для обозначения молекулы IgG, представляет собой антитело, которое содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи.

[0252] «Фрагмент антител» содержит часть интактного антитела, такую как антигенсвязывающая или вариабельная область интактного антитела. Фрагменты антител включают, например, фрагменты Fv, фрагменты Fab, фрагменты F(ab')₂, фрагменты Fab', фрагменты scFv (sFv) и фрагменты scFv-Fc.

[0253] Антитела к TREM1 могут включать описанные в данном документе, например, клоны, указанные в таблицах. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит альтернативный каркас. В некоторых вариантах осуществления антитело состоит из альтернативного каркаса. В некоторых вариантах осуществления антитело состоит по существу из альтернативного каркаса. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело состоит из фрагмента антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело состоит по существу из фрагмента антитела. «Антитело к TREM1», «антитело против TREM1» или «TREM1-специфическое антитело» представляет собой антитело, представленное в данном документе, которое специфически связывается с антигеном TREM1. В некоторых вариантах осуществления антитело связывает внеклеточный

домен TREM1. В определенных вариантах осуществления антитело к TREM1, представленное в данном документе, связывается с эпитопом TREM1, который является консервативным между белками TREM1 разных видов или среди них. Антитело к TREM1 может включать клон TREM-26. (BioLegend; кат. № 314907; Li J, *et al.* 2011. *Dev. Comp. Immunol.* epub.).

[0254] В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой моноклональные антитела.

[0255] В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой поликлональные антитела.

[0256] В некоторых вариантах осуществления антитела продуцируются гибридомами. В других вариантах осуществления антитела продуцируются рекомбинантными клетками, сконструированными для экспрессии желаемых переменных и константных доменов.

[0257] В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть одноцепочечными антителами или другими производными антител, сохраняющими антигенную специфичность и нижнюю шарнирную область или ее вариант.

[0258] В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть полифункциональными антителами, рекомбинантными антителами, человеческими антителами, гуманизированными антителами, их фрагментами или вариантами. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело, нейтральное антитело, антагонистическое антитело, агонистическое антитело, поликлональное антитело, афукозилированное антитело, биспецифическое антитело, человеческое антитело, химерное антитело, полноразмерное антитело и его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных вариантах осуществления фрагмент антитела или его производное выбрано из фрагмента Fab, фрагмента Fab'2, CDR и ScFv. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой его антигенсвязывающий фрагмент, Fab, Fab', F(ab')2, Fv, scFv, (scFv)2, молекулу одноцепочечного антитела, антитело с двумя переменными доменами, антитело с одним переменным доменом, линейное антитело или антитело с V-доменом.

[0259] В некоторых вариантах осуществления антитела способны образовывать иммунный комплекс. Например, иммунный комплекс может быть опухолевой клеткой, покрытой антителами.

[0260] В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM1 конкурируют за связывание с TREM1 человека (SEQ ID NO: 1) с эталонным антителом.

Последовательности антител к TREM1

Домены V_H

[0261] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H, выбранную из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 и 18. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в

данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антители, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антители, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления антители, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антители, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления антители, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антители, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления антители, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления антители, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления антители, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антители, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления антители, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 18.

[0262] В некоторых вариантах осуществления антители, представленное 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: 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, и 18. В некоторых вариантах осуществления антители, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H , представленную в SEQ ID NO: 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17 и 18, с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, представленным в данном документе, для получения антител.

Домены V_L

[0263] В некоторых вариантах осуществления антители, представленное в данном документе, содержит последовательность V_L , выбранную из SEQ ID NO: 19, 20, 21 и 22. В некоторых вариантах осуществления антители, представленное в данном документе, содержит последовательность V_L с SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления антители, представленное в данном документе, содержит последовательность V_L с SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления антители, представленное в данном документе, содержит последовательность V_L с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах

осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность VL с SEQ ID NO: 22.

[0264] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность VL, имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичности с иллюстративной последовательностью VL, представленной в SEQ ID NO: 19, 20, 21, и 22. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 19, 20, 21 и 22, с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, представленным в данном документе, для получения антител.

Комбинации VH-VL

[0265] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H, выбранную из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 и 18; и последовательность V_L, выбранную из SEQ ID NO: 19, 20, 21 и 22.

[0266] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 17 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 17 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 17 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 17 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 22.

[0267] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 16 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 16 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 16 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 16 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 18 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID

представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 8 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 8 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 10 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 10 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 10 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 10 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 20.

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

CDR

[0276] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит от одной до трех CDR из домена V_H, выбранного из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, и 18. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит от двух до трех CDR из домена V_H, выбранного из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, и 18. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит три CDR из домена V_H, выбранного из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, и 18. В некоторых аспектах CDR представляют собой иллюстративные CDR. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Kabat. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Chothia. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно AbM. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Contact. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR по IMGT.

[0277] В некоторых вариантах осуществления 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 SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 и 18. В некоторых вариантах осуществления CDR-H1 представляет собой CDR-H1 из домена V_H, выбранного из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 и 18 с не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления CDR-H2 представляет собой CDR-H2 из домена V_H, выбранного из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 и 18, с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3 из домена V_H, выбранного из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 и 18, с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного

мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, представленным в данном документе, для получения антител.

[0278] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит от одной до трех CDR из домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 19, 20, 21 и 22. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит от двух до трех CDR из домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 19, 20, 21 и 22. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит три CDR из домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 19, 20, 21 и 22. В некоторых аспектах CDR представляют собой иллюстративные CDR. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Kabat. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Chothia. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно AbM. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Contact. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR по IMGT.

[0279] В некоторых вариантах осуществления 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: 19, 20, 21 и 22. В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 представляет собой CDR-L1 из домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 19, 20, 21, и 22 с не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления CDR-L2 представляет собой CDR-L2 из домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 19, 20, 21, и 22 с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления CDR-L3 представляет собой CDR-L3 из домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 19, 20, 21, и 22 с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, представленным в данном документе, для получения антител.

[0280] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит от одной до трех CDR из домена VH, выбранного из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 и 18, и от одной до трех CDR из домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 19, 20, 21 и 22. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит от двух до трех CDR из домена VH, выбранного из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 и 18, и от двух до трех CDR из домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 19, 20, 21 и 22. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит три CDR из домена VH, выбранного из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 и 18, и три CDR из домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 19, 20, 21 и 22. В некоторых аспектах CDR представляют собой иллюстративные CDR. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Kabat. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно

Chothia. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно AbM. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Contact. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR по IMGT.

[0281] В некоторых вариантах осуществления антитела, представленное в данном документе, содержит CDR-H3, выбранную из SEQ ID NO: 25, 29, 30, 31, 32 и 33. В некоторых аспектах CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 с SEQ ID NO: 25, 29, 30, 31, 32, и 33. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3, выбранную из SEQ ID NO: 25, 29, 30, 31, 32 и 33, с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, представленным в данном документе, для получения антител.

[0282] В некоторых вариантах осуществления антитела, представленное в данном документе, содержит CDR-H3, выбранное из SEQ ID NO: 33. В некоторых аспектах CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3, выбранной из SEQ ID NO: 33, с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, представленным в данном документе, для получения антител.

[0283] В некоторых вариантах осуществления антитела, представленное в данном документе, содержит CDR-H3, выбранное из SEQ ID NO: 32. В некоторых аспектах CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 с SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3, выбранную из SEQ ID NO: 32, с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном

документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, представленным в данном документе, для получения антител.

[0284] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-H3, выбранное из SEQ ID NO: 25. В некоторых аспектах CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 с SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3, выбранной из SEQ ID NO: 25, с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, представленным в данном документе, для получения антител.

[0285] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, включает CDR-H2 с SEQ ID NO: 24. В некоторых аспектах CDR-H2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 с SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления CDR-H2 представляет собой CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, представленным в данном документе, для получения антител.

[0286] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, включает CDR-H1 с SEQ ID NO: 23. В некоторых аспектах CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 с SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления CDR-H1 представляет собой CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном

75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 с SEQ ID NO: 32, CDR-H2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, и CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 с SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3 с SEQ ID NO: 32, с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами; CDR-H2 представляет собой CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами; и CDR-H1 представляет собой CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, с не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в этом абзаце, называют в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, представленным в данном документе, для получения антител.

[0291] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 30 и CDR-H2 с SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 30, CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, и CDR-H1 с SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 31 и CDR-H2 с SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 31, CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, и CDR-H1 с SEQ ID NO: 23.

[0292] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, включает CDR-L3 с SEQ ID NO: 28. В некоторых аспектах CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 с SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления CDR-L3 представляет собой CDR-L3 с SEQ ID NO: 28, с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, представленным в данном документе, для получения антител.

[0293] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, включает CDR-L2 с SEQ ID NO: 27. В некоторых аспектах CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 с SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления CDR-L2 представляет собой CDR-L2 с SEQ ID NO: 27, с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными

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

[0294] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, включает CDR-L1 с SEQ ID NO: 26. В некоторых аспектах CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 представляет собой CDR-L1 с SEQ ID NO: 26, с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, представленным в данном документе, для получения антител.

[0295] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-L3 с SEQ ID NO: 28 и CDR-L2 с SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-L3 с SEQ ID NO: 28, CDR-L2 с SEQ ID NO: 27, и CDR-L1 с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 с SEQ ID NO: 28, CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 с SEQ ID NO: 27, и CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления CDR-L3 представляет собой CDR-L3 с SEQ ID NO: 28, с не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами; CDR-L2 представляет собой CDR-L2 с SEQ ID NO: 27, с не более 1, 2, 3 или 4 аминокислотными заменами; и CDR-L1 представляет собой CDR-L1 с SEQ ID NO: 26, с не более 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном

документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, представленным в данном документе, для получения антител.

[0296] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 33, CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, CDR-L3 с SEQ ID NO: 28, CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 и CDR-L1 с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 с SEQ ID NO: 33, CDR-H2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 с SEQ ID NO: 28, CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 и CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3 с SEQ ID NO: 33 с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами; CDR-H2 представляет собой CDR-H2 с SEQ ID NO: 24 с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами; CDR-H1 представляет собой CDR-H1 с SEQ ID NO: 23 с не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами; CDR-L3 представляет собой CDR-L3 с SEQ ID NO: 28 с не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами; CDR-L2 представляет собой CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 с не более 1, 2, 3 или 4 аминокислотными заменами; и CDR-L1 представляет собой CDR-L1 с SEQ ID NO: 26 с не более 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, представленным в данном документе, для получения антител.

[0297] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 32, CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, CDR-L3 с SEQ ID NO: 28, CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 и CDR-L1 с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 с SEQ ID NO: 32, CDR-H2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 с SEQ ID NO: 28, CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 и CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3 с SEQ ID NO: 32 с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами; CDR-H2 представляет собой CDR-H2 с SEQ ID NO: 24 с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами; CDR-H1 представляет собой CDR-H1 с SEQ ID NO: 23 с не более 1, 2, 3, 4 или 5

аминокислотными заменами; CDR-L3 представляет собой CDR-L3 с SEQ ID NO: 28 с не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами; CDR-L2 представляет собой CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 с не более 1, 2, 3 или 4 аминокислотными заменами; и CDR-L1 представляет собой CDR-L1 с SEQ ID NO: 26 с не более 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, представленным в данном документе, для получения антител.

[0298] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 29, CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, CDR-L3 с SEQ ID NO: 28, CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 и CDR-L1 с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 с SEQ ID NO: 29, CDR-H2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 с SEQ ID NO: 28, CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 и CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3 с SEQ ID NO: 29 с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами; CDR-H2 представляет собой CDR-H2 с SEQ ID NO: 24 с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами; CDR-H1 представляет собой CDR-H1 с SEQ ID NO: 23 с не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами; CDR-L3 представляет собой CDR-L3 с SEQ ID NO: 28 с не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами; CDR-L2 представляет собой CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 с не более 1, 2, 3 или 4 аминокислотными заменами; и CDR-L1 представляет собой CDR-L1 с SEQ ID NO: 26 с не более 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, представленным в данном документе, для получения антител.

[0299] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 25, CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, CDR-L3 с SEQ ID NO: 28, CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 и CDR-L1 с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 имеет

по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 с SEQ ID NO: 25, CDR-H2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 с SEQ ID NO: 28, CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 и CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3 с SEQ ID NO: 25 с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами; CDR-H2 представляет собой CDR-H2 с SEQ ID NO: 24 с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами; CDR-H1 представляет собой CDR-H1 с SEQ ID NO: 23 с не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами; CDR-L3 представляет собой CDR-L3 с SEQ ID NO: 28 с не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами; CDR-L2 представляет собой CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 с не более 1, 2, 3 или 4 аминокислотными заменами; и CDR-L1 представляет собой CDR-L1 с SEQ ID NO: 26 с не более 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в этом абзаце, называются в данном документе «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, представленной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, представленной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, представленным в данном документе, для получения антител.

[0300] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 30 или 31, CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, CDR-L3 с SEQ ID NO: 28, CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 и CDR-L1 с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 с SEQ ID NO: 30 или 31, CDR-H2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 с SEQ ID NO: 28, CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 и CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3 с SEQ ID NO: 30 или 31 с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами; CDR-H2 представляет собой CDR-H2 с SEQ ID NO: 24 с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами; CDR-H1 представляет собой CDR-H1 с SEQ ID NO: 23 с не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами; CDR-L3 представляет собой CDR-L3 с SEQ ID NO: 28 с не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами; CDR-L2 представляет собой CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 с не более 1, 2, 3 или 4 аминокислотными заменами; и CDR-L1 представляет собой CDR-L1 с SEQ ID NO: 26 с не более 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные

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

[0301] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, CDR-H3 с SEQ ID NO: 33, CDR-L1 с SEQ ID NO: 26, CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 и CDR-L3 с SEQ ID NO: 28.

[0302] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, CDR-H3 с SEQ ID NO: 25, CDR-L1 с SEQ ID NO: 26, CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 и CDR-L3 с SEQ ID NO: 28.

[0303] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, CDR-H3 с SEQ ID NO: 29, CDR-L1 с SEQ ID NO: 26, CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 и CDR-L3 с SEQ ID NO: 28.

[0304] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, CDR-H3 с SEQ ID NO: 32, CDR-L1 с SEQ ID NO: 26, CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 и CDR-L3 с SEQ ID NO: 28.

[0305] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, CDR-H3 с SEQ ID NO: 30, CDR-L1 с SEQ ID NO: 26, CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 и CDR-L3 с SEQ ID NO: 28.

[0306] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит CDR-H1 с SEQ ID NO: 23, CDR-H2 с SEQ ID NO: 24, CDR-H3 с SEQ ID NO: 31, CDR-L1 с SEQ ID NO: 26, CDR-L2 с SEQ ID NO: 27 и CDR-L3 с SEQ ID NO: 28.

Область Fc

[0307] Термин «домен Fc» или «область Fc» в данном документе используется для определения С-терминальной области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Данный термин включает нативные последовательности областей Fc и варианты областей Fc. Структуры областей Fc различных иммуноглобулинов и содержащиеся в них сайты гликозилирования известны в данной области техники. См., Schroeder and Cavacini, J. Allergy Clin. Immunol., 2010, 125:S41-52, включенную посредством ссылки в полном объеме. Область Fc может быть природной областью Fc или областью Fc, модифицированной, как описано в уровне техники или где-либо еще в данном изобретении.

[0308] Если не указано иное, нумерация аминокислотных остатков области Fc или константной области соответствует системе нумерации EU, также называемой индексом EU, как описано в Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. В контексте данного документа «полипептид Fc» димерного Fc относится к одному из двух

полипептидов, образующих димерный домен Fc, т.е. полипептид, содержащий C-терминальные константные области тяжелой цепи иммуноглобулина, который способен к стабильной самоассоциации. Например, полипептид Fc димерного Fc IgG содержит последовательность константных доменов CH2 IgG и CH3 IgG. Fc может относиться к классу IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, и IgA₂.

[0309] Термины «рецептор Fc» и «FcR» используются для описания рецептора, который связывается с областью Fc антитела. Например, FcR может представлять собой FcR с нативной человеческой последовательностью. В целом FcR представляет собой рецептор, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII, и FcγRIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые содержат аналогичные аминокислотные последовательности, отличающиеся преимущественно цитоплазматическими доменами. С определенными FcR также могут связываться иммуноглобулины других изотипов (см., например, Janeway et al., *Immuno Biology: the immune system in health and disease*, (Elsevier Science Ltd., NY) (4th ed., 1999)). Активирующий рецептор FcγRIIA содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит мотив ингибирования на основе тирозина иммунорецептора (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (см., обзор M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcR рассмотрены в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем, включены в термин «FcR» в данном документе. Этот термин также включает неонатальный рецептор, FcRn, отвечающий за перенос материнских IgG в плод (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976); и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

[0310] Модификации в домене CH2 могут влиять на связывание FcR с Fc. В данной области техники известен ряд модификаций аминокислот в области Fc для избирательного изменения аффинности Fc для различных Fc-гамма-рецепторов. В некоторых аспектах Fc включает одну или более модификаций, способствующих селективному связыванию Fc-гамма-рецепторов.

[0311] Иллюстративные мутации, которые изменяют связывание FcR с Fc, перечислены ниже:

[0312] 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);

[0313] F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L (Stavenhagen JB, Gorlatov S, Tuaillon 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);

[0314] 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);

[0315] 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);

[0316] S239D/S267E, S267E/L328F (Chu SY, Vostiar I, Karki S, et al. *Mol Immunol.* 2008 Sep;45(15):3926-33);

[0317] S239D/D265S/S298A/I332E, S239E/S298A/K326A/A327H, G237F/S298A/A330L/I332E, S239D/I332E/S298A, S239D/K326E/A330L/I332E/S298A, G236A/S239D/D270L/I332E, S239E/S267E/H268D, L234F/S267E/N325L, G237F/V266L/S267D и другие мутации, перечисленные в WO2011/120134 и WO2011/120135, включенные в данный документ посредством ссылки. В *Therapeutic Antibody Engineering* (William R. Strohl and Lila M. Strohl, Woodhead Publishing series in Biomedicine No 11, ISBN 1 907568 37 9, Oct 2012) на странице 283 описаны мутации.

[0318] В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе антитело содержит модификации для улучшения его способности опосредовать эффекторную функцию. Такие модификации известны в данной области техники и включают афукозилирование или конструирование аффинности Fc в направлении активации рецептора, в основном FCGR3a, в отношении A3KЦ, и в направлении C1q в отношении K3Ц. В следующей таблице В приведены различные дизайны, представленные в литературе в отношении модификации эффекторной функции.

[0319] Способы получения антител с незначительным содержанием фукозы или без нее на сайте гликозилирования Fc (Asn 297, нумерация EU) без изменения аминокислотной последовательности хорошо известны в данной области техники. Технология GlymaX® (ProBioGen AG) основана на введении гена фермента, который изменяет клеточный путь биосинтеза фукозы, в клетки, используемые для получения антител. Это предотвращает добавление сахарной «фукозы» к углеводной части N-связанного антитела со стороны продуцирующих антитела клеток (von Horsten et al. (2010) *Glycobiology*. 2010 Dec; 20 (12):1607-18. Другой подход к получению антител с пониженным уровнем фукозилирования можно найти в патенте США 8409572, который обеспечивает информацию относительно отбора линии клеток для получения антител по их способности обеспечивать более низкие уровни фукозилирования антител. Антитела могут быть полностью афукозилированными (то есть не содержать обнаруживаемой фукозы) или частично афукозилированными, то есть 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 обнаруживаемого для аналогичного антитела, полученного с помощью системы экспрессии млекопитающих.

[0320] Таким образом, в одном варианте осуществления описанное в данном документе антитело может содержать димерный Fc, который содержит одну или более модификаций аминокислот, как указано в таблице В, которые обеспечивают повышенную эффекторную функцию. В еще одном варианте осуществления антител может быть афукозилировано для улучшения эффекторной функции.

Таблица В: Домены CH2 и модификация эффекторной функции

Таблица В		
Эталон	Мутации	Эффект
Lu, 2011, Ferrara 2011, Mizushima 2011	Афукозилированное	Увеличенная АЗКЦ
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A	Увеличенная АЗКЦ
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A/K326A	Увеличенная АЗКЦ
Stavenhagen, 2007	F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L	Увеличенная АЗКЦ

Nordstrom, 2011	F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L	Увеличенная АЗКЦ
Stewart, 2011	F243L	Увеличенная АЗКЦ
Shields, 2001	S298A/E333A/K334A	Увеличенная АЗКЦ
Lazar, 2006	S239D/I332E/A330L	Увеличенная АЗКЦ
Lazar, 2006	S239D/I332E	Увеличенная АЗКЦ
Bowles, 2006	AME-D, не указанные мутации	Увеличенная АЗКЦ
Heider, 2011	37,1, мутации не раскрыты	Увеличенная АЗКЦ
Moore, 2010	S267E/H268F/S324T	Увеличенная КЗЦ

[0321] Модификации Fc, снижающие связывание FcγR и/или комплемента, и/или эффекторную функцию, известны в данной области техники. В недавних публикациях описаны стратегии, которые использовались для создания антител со сниженной или подавленной эффекторной активностью (см. Strohl, WR (2009), Curr Opin Biotech 20:685-691, и Strohl, WR and Strohl LM, “Antibody Fc engineering for optimal antibody performance” In Therapeutic Antibody Engineering, Cambridge: Woodhead Publishing (2012), pp 225-249). Эти стратегии включают снижение эффекторной функции путем модификации гликозилирования, используя каркасы IgG2/IgG4 или введение мутаций в шарнирную или CH2 области Fc. Например, в публикации патента США № 2011/0212087 (Strohl), публикации международного патента № WO 2006/105338 (Xencor), публикации патента США № 2012/0225058 (Xencor), публикации патента США № 2012/0251531 (Genentech), и Strop et al ((2012) J. Mol. Biol. 420: 204-219) описаны специфические модификации для уменьшения связывания FcγR или комплемента с Fc.

[0322] Конкретные неограничивающие примеры известных модификаций аминокислот для уменьшения связывания FcγR или комплемента с Fc включают те, которые определены в следующей таблице С:

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

Таблица С	
Компания	Мутации
GSK	N297A
Ortho Biotech	L234A/L235A
Protein Design labs	IGG2 V234A/G237A
Wellcome Labs	IGG4 L235A/G237A/E318A
GSK	IGG4 S228P/L236E
Alexion	IGG2/IGG4combo
Merck	IGG2 H268Q/V309L/A330S/A331S

Bristol-Myers	C220S/C226S/C229S/P238S
Seattle Genetics	C226S/C229S/E3233P/L235V/L235A
Amgen	Продукция E.coli, негликозилированные
Medimune	L234F/L235E/P331S
Trubion	Мутант по шарниру, возможно C226S/P230S

[0323] Способы получения антител с незначительным содержанием фукозы или без нее на сайте гликозилирования Fc (Asn 297, нумерация EU) без изменения аминокислотной последовательности хорошо известны в данной области техники. Технология GlymaxX® (ProBioGen AG) основана на введении гена фермента, который изменяет клеточный путь биосинтеза фукозы, в клетки, используемые для получения антител. Это предотвращает добавление сахарной «фукозы» к углеводной части N-связанного антитела со стороны продуцирующих антитела клеток. (von Horsten et al. (2010) *Glycobiology*. 2010 Dec; 20 (12):1607-18.) Иллюстративные линии клеток, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают CHO-DG44 со стабильной сверхэкспрессией бактериальной оксидоредуктазы GDP-6-дезоксид-липсо-4-гексозоредуктазы (RMD) (см. Henning von Horsten et al., *Glycobiol* 2010, 20:1607-1618) или клетки Lec13 CHO, у которых отсутствует фукозилирование белка (см. Ripka et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, 249:533-545; публикацию патента США № 2003/0157108; WO 2004/056312; каждая из которых полностью включена посредством ссылки), и линии клеток с нокаутом, такой как ген альфа-1,6-фукозилтрансферазы, или клетки CHO с нокаутом FUT8 (см. Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.*, 2004, 87: 614-622; Kanda et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 94:680-688; и WO 2003/085107; каждая из которых полностью включена посредством ссылки). Другой подход к получению антител с пониженным уровнем фукозилирования можно найти в патенте США 8409572, который обеспечивает информацию относительно отбора линии клеток для получения антител по их способности обеспечивать более низкие уровни фукозилирования антител.

[0324] Иллюстративные линии клеток, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают CHO-DG44 со стабильной сверхэкспрессией бактериальной оксидоредуктазы GDP-6-дезоксид-липсо-4-гексозоредуктазы (RMD) (см. Henning von Horsten et al., *Glycobiol* 2010, 20:1607-1618) или клетки Lec13 CHO, у которых отсутствует фукозилирование белка (см. Ripka et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, 249:533-545; публикацию патента США № 2003/0157108; WO 2004/056312; каждая из которых полностью включена посредством ссылки), и линии клеток с нокаутом, такой как ген альфа-1,6-фукозилтрансферазы, или клетки CHO с нокаутом FUT8 (см. Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.*, 2004, 87: 614-622; Kanda et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 94:680-688; и WO 2003/085107; каждая из которых полностью включена посредством ссылки).

[0325] Антитела могут быть полностью афукозилированными (что означает, что они не содержат обнаруживаемой фукозы) или они могут быть частично афукозилированными, что означает, что выделенное антитело содержит менее 95%, менее 85%, менее 75%, менее 65%, менее 55%, менее 45%, менее 35%, менее 25%, менее 15% или менее 5% от количества фукозы, обычно обнаруживаемого для аналогичного антитела, продуцируемого с помощью системы экспрессии млекопитающих.

[0326] В некоторых аспектах предлагаемое в данном документе антитело содержит домен IgG1 с пониженным содержанием фукозы в положении Asn 297 по сравнению с природным доменом IgG1. Известно, что такие домены Fc улучшают АЗКЦ. См. Shields et al., *J. Biol. Chem.*, 2002, 277:26733-26740, включенную посредством ссылки в полном объеме. В некоторых аспектах такие антитела не содержат фукозу в положении Asn 297. Количество фукозы можно определить с использованием любого подходящего способа, например, как описано в WO 2008/077546, включенной посредством ссылки во всей ее полноте.

[0327] В определенных вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит область Fc с одной или более аминокислотными заменами, которые улучшают АЗКЦ, например, заменой в одном или более положениях 298, 333 и 334 области Fc. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит область Fc с одной или более аминокислотными заменами в положениях 239, 332 и 330, как описано в Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103:4005-4010, включенной в полном объеме посредством ссылки.

[0328] Другие иллюстративные варианты гликозилирования, которые могут быть включены в антитела, представленные в данном документе, описаны, например, в патентных публикациях США №№ 2003/0157108, 2004/0093621, 2003/0157108, 2003/0115614, 2002/0164328, 2004/0093621, 2004/0132140, 2004/0110704, 2004/0110282, 2004/0109865; международных патентных публикациях 2000/61739, 2001/29246, 2003/085119, 2003/084570, 2005/035586, 2005/035778; 2005/053742, 2002/031140; Okazaki et al., *J. Mol. Biol.*, 2004, 336:1239-1249; и Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.*, 2004, 87: 614-622; каждая которых включена в полном объеме посредством ссылки.

[0329] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит область Fc с по меньшей мере одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенным к области Fc. Такие варианты антител могут обладать улучшенной функцией КЗЦ. Примеры таких вариантов антител описаны, например, в WO 1997/30087; WO 1998/58964; и WO 1999/22764; каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте.

[0330] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит одно или более изменений, которые улучшают или уменьшают связывание C1q и/или КЗЦ. См. патент США № 6194551; WO 99/51642; и Idusogie et al., *J. Immunol.*, 2000, 164:4178-4184; каждый из которых включен посредством ссылки во всей полноте.

[0331] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит человеческую константную область тяжелой цепи класса, выбранного из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область Fc. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc человека. В некоторых вариантах осуществления область Fc человека содержит константную область тяжелой цепи человека класса IgG и подкласса, выбранного из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления область Fc человека включает Fc человеческого IgG1 дикого типа.

Связывание

[0332] Термин «аффинность» относится к силе суммарных общих нековалентных взаимодействий между одиночным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнера по связыванию (например, антигена или эпитопа). Если не указано иное, используемый в данном документе термин «связывание»

относится к действительной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие в соотношении 1:1 между членами связывающей пары (например, антителом и антигеном или эпитопом). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y может быть представлена константой диссоциации (K_D). Кинетические компоненты, которые вносят вклад в константу равновесия диссоциации, более подробно описаны ниже. Аффинность можно измерить с помощью общепринятых методов, известных в данной области техники, в том числе описанных в данном документе, таких как технология поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (например, BIACORE®) или биослойная интерферометрия (например, FORTEBIO®).

[0333] Что касается связывания антитела с молекулой-мишенью, термины «связывает», «специфическое связывание», «специфически связывается с», «специфично для», «селективно связывается» и «селективно в отношении» конкретного антигена (например, полипептид-мишень) или эпитоп на конкретном антигене означает связывание, которое заметно отличается от неспецифического или неселективного взаимодействия (например, с молекулой, не являющейся мишенью). Специфическое связывание можно измерить, например, путем измерения связывания с молекулой-мишенью и сравнения его со связыванием с молекулой, отличной от мишени. Специфическое связывание также может быть определено путем конкуренции с контрольной молекулой, которая имитирует эпитоп, распознаваемый на молекуле-мишени. В этом случае специфическое связывание указывается, если связывание антитела с молекулой-мишенью конкурентно ингибируется контрольной молекулой. В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела к TREM1 в отношении молекулы, отличной от мишени, составляет менее около 50% от аффинности в отношении TREM1. В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела к TREM1 в отношении молекулы, отличной от мишени, составляет менее около 40% от аффинности в отношении TREM1. В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела к TREM1 в отношении молекулы, отличной от мишени, составляет менее около 30% от аффинности в отношении TREM1. В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела к TREM1 в отношении молекулы, отличной от мишени, составляет менее около 20% от аффинности в отношении TREM1. В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела к TREM1 в отношении молекулы, отличной от мишени, составляет менее около 10% от аффинности в отношении TREM1. В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела к TREM1 в отношении молекулы, отличной от мишени, составляет менее около 1% от аффинности в отношении TREM1. В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела к TREM1 в отношении молекулы, отличной от мишени, составляет менее около 0,1% от аффинности в отношении TREM1.

[0334] Термин « k_d » (s^{-1}), используемый в данном документе, относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Это значение также называется значением k_{off} .

[0335] Термин « k_a » ($M^{-1} \times s^{-1}$), используемый в данном документе, относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Это значение также называется значением k_{on} .

[0336] В контексте данного документа термин « K_D » (M) относится к константе равновесия диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. $K_D = k_d/k_a$. В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела описывается в терминах K_D для взаимодействия между таким антителом и его антигеном. Для ясности, как известно в данной области техники, меньшее значение K_D указывает на более

высокую аффинность взаимодействия, в то время как большее значение K_D указывает на более низкую аффинность взаимодействия.

[0337] В контексте данного документа термин « K_A » (M^{-1}) относится к константе равновесия ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. $K_A = k_a/k_d$.

[0338] При использовании в данном документе в контексте двух или более антител термин «конкурирует с» или «перекрестно конкурирует с» указывает на то, что два или более антитела конкурируют за связывание с антигеном (например, TREM1). В одном из примеров анализа TREM1 наносят на поверхность и приводят в контакт с первым антителом к TREM1, после чего добавляют второе антитело к TREM1. В еще одном примере анализа первое антитело к TREM1 наносят на поверхность и приводят в контакт с TREM1, а затем добавляют второе антитело к TREM1. Если присутствие первого антитела TREM1 снижает связывание второго антитела к TREM1 в любом анализе, тогда антитела конкурируют друг с другом. Термин «конкурирует с» также включает комбинации антител, в которых одно антитело снижает связывание другого антитела, но где не наблюдается конкуренции, когда антитела добавляются в обратном порядке. Однако в некоторых вариантах осуществления первое и второе антитела ингибируют связывание друг друга независимо от порядка, в котором они добавлены. В некоторых вариантах осуществления одно антитело снижает связывание другого антитела с его антигеном на по меньшей мере 25%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания. Квалифицированный специалист может выбрать концентрации антител, используемых в конкурентных анализах, на основе аффинности антител к TREM1 и валентности антител. Анализы, описанные в этом определении, являются иллюстративными, и квалифицированный специалист может использовать любой подходящий анализ, чтобы определить, конкурируют ли антитела друг с другом. Подходящие анализы описаны, например, в Cox et al., “Immunoassay Methods,” in Assay Guidance Manual [Internet], Updated December 24, 2014 (ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/; по состоянию на 29 сентября, 2015); Silman et al., Cytometry, 2001, 44:30-37; и Finco et al., J. Pharm. Biomed. Anal., 2011, 54:351-358, каждый из которых включен в полном объеме посредством ссылки.

[0339] Тестируемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если избыток тестируемого антитела (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%, как измерено в анализе конкурентного связывания. Антитела, идентифицируемые в конкурентном анализе (конкурирующее антитело), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся со смежным эпитопом, расположенным достаточно близко к эпитопу, связываемому эталонному антителу, для появления стерического затруднения для антител. Например, можно идентифицировать второе конкурирующее антитело, которое конкурирует за связывание с TREM1 с первым описанным в данном документе антителом. В определенных случаях второе антитело может блокировать или ингибировать связывание первого антитела, например, на по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, как измеряется в анализе конкурентного связывания. В определенных случаях второе антитело может замещать первое антитело более чем на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%.

[0340] В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM1 по существу не связывает миелоидные клетки, присутствующие вне раковой ткани. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM1 по существу не связывает стимулирующие миелоидные клетки, присутствующие в раковой ткани.

[0341] В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM1 связывается с остатками 21–34 (SEQ ID NO: 42), 103–109 (SEQ ID NO: 43) и 128–136 (SEQ ID NO: 44) TREM1 человека. Связывающий эпитоп включает остатки в числовом диапазоне (например, остатки 22–33 TREM1), начальный остаток каждого диапазона (например, остатки 21–33 TREM1) и конечный остаток каждого диапазона (например, остатки 22–34 TREM1) или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM1 связывается с остатками 22–33, 104–108 и 129–135 TREM1 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM1 связывается с остатками 21–33, 103–108 и 128–135 TREM1 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM1 связывается с остатками 22–34, 104–109 и 129–136 TREM1 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM1 связывается с остатками, выбранными из остатков 21–34, 22–33, 21–33 или 22–34; 103–109, 104–108, 103–108 или 104–109; и 128–136, 129–135, 128–135 или 129–136.

[0342] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, связывает TREM1 человека с K_D меньше 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, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 8, 9, или 10×10^{-9} М, по данным анализа Biacore. В некоторых вариантах осуществления K_D антитела, представленного в данном документе, составляет 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, 5–6, 5–5,5, 5,5–6, 5–7, 6–7, 6–6,5, 6,5–7, 6–8, 7–9, 7–10, или $5–10 \times 10^{-9}$ М, по данным анализа Biacore.

[0343] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, связывает TREM1 человека с K_D менее или равным около 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 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, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,85, 0,8, 0,75, 0,7, 0,65, 0,6, 0,55, 0,5, 0,45, 0,4, 0,35, 0,3, 0,25, 0,2, 0,15, или $0,1 \times 10^{-9}$ М, или меньше, по данным анализа Biacore. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, связывает TREM1 человека с K_D между 5–3, 4–2, 3–1, 1,9–1,8, 1,8–1,7, 1,7–1,6, 1,6–1,5, 1,9–1,5, 1,5–1, 1–0,8, 1–0,5, 0,9–0,6, 0,7–0,4, 0,6–0,2, 0,5–0,3, 0,3–0,2 или $0,2–0,1 \times 10^{-9}$ М, по данным анализа Biacore. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, связывает TREM1 человека с K_d меньше или равным около 10, 9,56, 9,5, 9,0, 8,88, 8,84, 8,5, 8, 7,5, 7,32, 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5, или 1×10^{-4} (1/с), или меньше, по данным анализа Biacore. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, связывает TREM1 человека с K_d между 7–10, 7–8, 8–9, 9–10, 7–7,5, 7,5–8, 8–8,5, 8,5–9, 9–9,5 или $9,5–10 \times 10^{-4}$ (1/с), по данным анализа Biacore. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, связывает TREM1 человека с K_a больше 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 10×10^5 (1/М*с), или более, по данным анализа Biacore. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, связывает TREM1 человека с K_a между 4–7, 4–4,5, 4,5–5, 5–5,5, 5,5–6, 6–6,5 или 6,5–7, 7–8, 8–9 или $9–10 \times 10^5$ (1/М*с), по данным анализа Biacore.

[0344] В некоторых вариантах осуществления антитело связывает моноциты человека с EC50 около 0,1, 0,15, 0,2, 0,22, 0,25, 0,27, 0,3, 0,32, 0,35, 0,37, 0,4, 0,05, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 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 или 2 нМ, по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, связывает моноциты 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 по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления антитело связывает моноциты человека с EC50 между около 0,2-1,4, 0,2-0,3, 0,3-0,5, 0,5-0,7, 0,7-1, 1-1,2 или 1,2-1,4 нМ по данным проточной цитометрии.

[0345] В некоторых вариантах осуществления антитело связывает нейтрофилы человека с EC50 около 0,1, 0,15, 0,2, 0,22, 0,25, 0,27, 0,3, 0,32, 0,35, 0,37, 0,4, 0,05, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 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 или 2 нМ по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, связывает нейтрофилы с EC50 меньше или равным около 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 по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления антитело связывает нейтрофилы человека с EC50 между около 0,15-1, 0,15-0,3, 0,3-0,5, 0,5-0,7, 0,7-1, 1-1,5 или 1,5-2 нМ по данным проточной цитометрии.

[0346] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, не связывает нейтрофилы человека с EC50, превышающим или равным 3 нМ или более по данным проточной цитометрии.

Функция

[0347] «Эффекторные функции» относятся к тем видам биологической активности, присущей области Fc антитела, которые могут изменяться в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание C1q для активации комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), связывание с Fc-рецептором для активации антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (АЗКФ), блокирование рецепторного лиганда, агонизм или антагонизм.

[0348] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ). АЗКЦ может возникать, когда антитела связываются с антигенами на поверхности патогенных или онкогенных клеток-мишеней. Эффекторные клетки, несущие Fc-гамма-рецепторы (FcγR или FCGR) на своей клеточной поверхности, включая цитотоксические Т-клетки, природные клетки-киллеры (NK), макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, дендритные клетки или моноциты, распознают и связывают область Fc антител, связанных с клетками-мишенями. Такое связывание может запускать активацию внутриклеточных сигнальных путей, ведущих к гибели клеток. В конкретных вариантах осуществления подтипы (изотипы) области Fc иммуноглобулина антитела включают IgG1 и IgG3 человека. В контексте данного документа АЗКЦ относится к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (FcR) (например, Природные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги) распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени. Первичные клетки, опосредующие АЗКЦ, естественные клетки-киллеры, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках приведена в таблице 3 на странице 464 в Ravetch and Kinet,

Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Для оценки активности АЗКЦ представляющей интерес молекулы может быть проведен анализ АЗКЦ *in vitro*, описанный в патенте США № 5500362 или 5821337. Эффекторные клетки, пригодные для такого анализа, включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и природные клетки-киллеры (NK). В качестве альтернативы или дополнения, активность АЗКЦ молекулы, представляющей интерес, можно оценить *in vivo*, например, в животной модели, например, согласно описанию в публикации Clynes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998).

[0349] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ). Индуцированная антителами КЗЦ опосредуется через белки классического каскада комплемента и запускается связыванием белка комплемента C1q с антителом. Связывание области Fc антитела с C1q может вызывать активацию каскада комплемента. В конкретных вариантах осуществления подтипы (изотипы) области Fc иммуноглобулина антитела включают IgG1 и IgG3 человека. В контексте данного документа КЗЦ относится к способности молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, полипептидом (например, антителом)), образующей комплекс с распознаваемым антигеном. Для оценки активации комплемента, может быть выполнен анализ КЗЦ, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

[0350] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность антителозависимого клеточно-опосредованного фагоцитоза (АЗКФ). АЗКФ может возникать, когда антитела связываются с антигенами на поверхности патогенных или онкогенных клеток-мишеней. Фагоцитарные клетки, несущие Fc-рецепторы на своей клеточной поверхности, включая моноциты и макрофаги, распознают и связывают область Fc антител, связанных с клетками-мишенями. После связывания Fc-рецептора с клеткой-мишенью, связанной с антителом, может начаться фагоцитоз клетки-мишени. АЗКФ можно рассматривать как форму АЗКЦ.

[0351] В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM1 индуцирует перепрограммирование нестимулирующей миелоидной клетки в стимулирующую миелоидную клетку. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM1 индуцирует экспрессию провоспалительного цитокина или хемокина и/или индукцию экспрессии костимулирующих молекул. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая молекула представляет собой CD40 или HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления провоспалительный цитокин или хемокин представляет собой ИФН- γ , ИЛ-1 α , ИЛ-12, ИЛ-2, TNFSF9, TNFSF10, CXCL9, CXCL10, CCL17, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL11, CXCL15, CCL3, CCL4, CCL2, FasL, CD274, CRTAM, гранзим А (GzmA), или гранзим В (GzmB).

[0352] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой агонистическое антитело. Агонистическое антитело может индуцировать (например, увеличивать) одну или более активностей или функций НМК после того, как антитело связывает белок TREM1, экспрессируемый в клетке. Агонистическое антитело может связываться с НМК и активировать их, вызывая изменения пролиферации клетки или изменяя способность презентации антигена. Агонистическое антитело может связываться с НМК и активировать их, запуская внутриклеточные сигнальные пути, которые приводят к измененному росту клеток или апоптозу. Агонистическое антитело может связываться с TREM1 и индуцировать сигналинг ниже TREM1. В некоторых вариантах осуществления сигналинг TREM1 увеличивает иммунный ответ в клетке. В

некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой активацию, секрецию цитокинов или хемокинов или экспрессию миелоидных костимулирующих белков.

[0353] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антагонистическое антитело. Антагонистическое антитело может блокировать (например, снижать) одну или более активностей или функций НМК после того, как антитело связывает белок TREM1, экспрессируемый на клетке. Например, антагонистическое антитело может связываться и блокировать связывание лиганда с одним или более белками НМК, предотвращая дифференцировку и пролиферацию клетки или изменяя способность презентации антигена. Антагонистическое антитело может связываться с белком TREM1 его лигандом и предотвращать его активацию, изменяя внутриклеточные сигнальные пути, которые способствуют росту и выживаемости клеток.

[0354] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой истощающее антитело. Истощающие антитела представляет собой антитела, которые убивают нестимулирующие миелоидные клетки при контакте посредством взаимодействия антитела с другими иммунными клетками или молекулами. Например, антитела, связываясь с клетками, несущими белки TREM1, могут вовлекать белки комплемента и вызывать комплемент-зависимый лизис клеток. Антитела, когда они связываются с клетками, несущими белки TREM1, могут также вызывать гибель соседних клеток, несущих Fc-рецепторы, посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ).

[0355] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой нейтрализующее антитело, и антитело нейтрализует одну или более биологических активностей НМК. В некоторых вариантах осуществления белок TREM1 экспрессируется на поверхности нестимулирующих миелоидных клеток, и антитело распознает внеклеточный домен белка TREM1.

[0356] В некоторых вариантах осуществления антитело является селективным в отношении НМК (предпочтительно связывается с TREM1). В определенных вариантах осуществления антитело, которое селективно связывается с НМК, имеет константу диссоциации (K_d) в диапазоне от 0,0001 нМ до 1 мкМ. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывается с эпитопом на белке TREM1, который является консервативным среди белков разных видов. В еще одном варианте осуществления селективное связывание включает, но не требует, исключительное связывание.

[0357] В одном варианте осуществления антитело к TREM1, связанное со своей мишенью, вызывает *in vivo* истощение нестимулирующих миелоидных клеток, с которыми оно связано. В некоторых вариантах осуществления эффекторные белки, индуцированные кластерными антителами, могут запускать различные ответы, включая высвобождение воспалительных цитокинов, регуляцию продукции антигена, эндоцитоз или уничтожение клеток. В одном варианте осуществления антитело способно рекрутировать и активировать комплемент или опосредовать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) *in vivo*, или опосредовать фагоцитоз путем связывания Fc-рецепторов *in vivo*. Антитело может также истощать нестимулирующие миелоидные клетки путем индукции апоптоза или некроза нестимулирующих миелоидных клеток при связывании.

[0358] В некоторых вариантах осуществления антитела способны образовывать иммунный комплекс. Например, иммунный комплекс может быть опухолевой клеткой, покрытой антителами.

[0359] В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM1 по существу не связывает миелоидные клетки, присутствующие вне раковой ткани. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM1 по существу не связывает стимулирующие миелоидные клетки, присутствующие в раковой ткани.

[0360] В некоторых вариантах осуществления инактивация нестимулирующих миелоидных клеток происходит *in vitro* и достигается путем: а) уничтожения нестимулирующих миелоидных клеток; b) истощения нестимулирующих миелоидных клеток с помощью магнитных гранул; или с) сортировки нестимулирующих миелоидных клеток при помощи проточной цитометрии (FACS).

[0361] «Иммуноконъюгат» представляет собой антитело, конъюгированное с одной или более гетерологичными молекулами, такими как эффекторная молекула, или терапевтический (например, цитокин) или диагностический агент.

[0362] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгируют с лекарственным средством, например, токсином, химиотерапевтическим агентом, иммуномодулятором или радиоактивным изотопом. Существует несколько способов получения ADC (конъюгаты антитело-лекарственное средство), известных в данной области техники и описанных в патентах США, например, 8624003 (метод колпака), 8163888 (одноэтапный метод) и 5208020 (двухэтапный метод). Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно конъюгировать по меньшей мере с одним агентом, включая радионуклид, цитотоксин, химиотерапевтический агент, лекарственное средство, пролекарство, токсин, фермент, иммуномодулятор, антиангиогенный агент, проапоптотический агент, цитокин, гормон, олигонуклеотид, антисмысловая молекула, кРНК, второе антитело и второй фрагмент антитела, который связывается с антигеном.

Нестимулирующие миелоидные клетки (НМК)

[0363] В данном документе представлены способы и композиции для инактивации и/или обнаружения нестимулирующих миелоидных клеток (НМК), включающие применение антитела к TREM1. В данном документе также представлены способы и композиции для нацеливания и/или обнаружения нестимулирующих миелоидных клеток, экспрессирующих белок НМК.

[0364] В данном документе также представлены способы и композиции для инактивации и/или обнаружения нестимулирующих миелоидных клеток, включающие применение антитела, направленного на нечеловеческий гомолог человеческого белка НМК, у этого отличного от человека субъекта.

[0365] В контексте данного документе нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой миелоидные клетки, которые недостаточно эффективны для стимуляции иммунного ответа (например, не так эффективны при стимуляции противоопухолевого ответа в микроокружении опухоли по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками). В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки не так эффективны при презентации антигена (например, опухолевого антигена) Т-клеткам или не так эффективны при стимуляции опухолеспецифических Т-клеточных ответов по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки могут проявлять пониженную способность захватывать, процессировать и/или презентировать опухолеассоциированные антигены Т-клетке по сравнению со стимулирующей миелоидной клеткой. Нестимулирующие миелоидные клетки могут иметь пониженную способность или не иметь способности повторно примировать цитотоксические Т-лимфоциты или в некоторых случаях не могут

стимулировать эффективное уничтожение опухолевых клеток. Нестимулирующие миелоидные клетки могут демонстрировать более низкую экспрессию генов и маркеров клеточной поверхности, участвующих в процессинге антигена, презентации антигена и/или костимуляции антигена, включая, без ограничения, CD80, CD86, ГКГС I и ГКГС II по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками.

[0366] Нестимулирующие миелоидные клетки по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками могут демонстрировать более низкую экспрессию генов, связанных с перекрестной презентацией, костимуляцией и/или стимулирующими цитокинами, включая, без ограничения, любой один или более из TAP1, TAP2, PSMB8, PSMB9, TAPBP, PSME2, CD24a, CD274, BTLA, CD40, CD244, ICOSL, ICAM1, TIM3, PDL2, RANK, FLT3, CSF2RB, CSF2RB2, CSF2RA, IL12b, XCR1, CCR7, CCR2, CCL22, CXCL9, и CCL5, и повышенную экспрессию противовоспалительного цитокина ИЛ-10. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки зависят от фактора транскрипции IRF4 и цитокинов ГМ-КСФ или КСФ-1 в отношении дифференцировки и выживаемости. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки могут вносить вклад в опухолевый ангиогенез за счет секреции фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС) и синтазы оксида азота (NOS) и поддерживать рост опухоли за счет секреции эпидермального фактора роста (ЭФР).

[0367] В некоторых вариантах осуществлению нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) или дендритные клетки (ДК). В некоторых вариантах осуществления нестимулирующая миелоидная клетка не представляет собой дендритную клетку (ДК).

[0368] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ). ОАМ представляют собой макрофаги, присутствующие рядом с раковыми опухолями или внутри них, и получены из циркулирующих моноцитов или резидентных тканевых макрофагов.

[0369] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой опухолеассоциированные нейтрофилы (ОАН). ОАН представляют собой нейтрофилы, присутствующие рядом с раковыми опухолями или внутри них.

[0370] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки различают на основе маркеров, которые они экспрессируют, или маркеров, которые они избирательно экспрессируют. Экспрессия маркеров клеточной поверхности может быть описана как «+» или «положительная». Отсутствие маркера клеточной поверхности можно описать как «-» или «отрицательный». Экспрессия маркера клеточной поверхности может быть далее описана как «высокая» (клетки, экспрессирующие высокие уровни маркеров) или «низкая» (клетки, экспрессирующие низкие уровни маркеров), что указывает на относительную экспрессию каждого маркера на клеточной поверхности. Уровень маркеров может быть определен различными способами, известными в данной области техники, например иммуноокрашивание и анализ методом проточной цитометрии или гель-электрофорез и вестерн-блоттинг.

[0371] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой дендритные клетки (ДК). В некоторых вариантах осуществления дендритные клетки можно отличить по шипастой или дендритной морфологии. В одном варианте осуществления нестимулирующая дендритная клетка является по меньшей мере CD45+, HLA-DR+, CD14-, CD11c+ и BDCA1+ (также называемые

клетками ДК1). В одном варианте осуществления нестимулирующая дендритная клетка не является CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺ и BDCA3⁺ (также называемые клетками ДК2). В одном варианте осуществления дендритная клетка, которая является CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD11c⁺ и BDCA3⁺, представляет собой стимулирующую миелоидную клетку.

[0372] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ). В некоторых вариантах осуществления, например, у людей, нестимулирующие опухолеассоциированные макрофаги являются по меньшей мере CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие опухолеассоциированные макрофаги являются по меньшей мере CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b⁺. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие опухолеассоциированные макрофаги являются по меньшей мере CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11c⁺. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие опухолеассоциированные макрофаги являются по меньшей мере CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, BDCA3⁻. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие опухолеассоциированные макрофаги являются по меньшей мере CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, BDCA3⁻, CD11b⁺. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие опухолеассоциированные макрофаги являются по меньшей мере CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, BDCA3⁻, CD11c⁺. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие опухолеассоциированные макрофаги являются по меньшей мере CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b⁺, и CD11c⁺. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие опухолеассоциированные макрофаги являются по меньшей мере CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, BDCA3⁻, CD11b⁺, и CD11c⁺.

[0373] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции по настоящему изобретению полезны для воздействия на ОАМ и ДК у других млекопитающих, например, у мышей. В таких вариантах осуществления мышинные ОАМ и ДК приводят в контакт с антителом TREM1. В одном варианте осуществления, например, у мышей, опухолеассоциированный макрофаг является по меньшей мере CD45⁺, I-A/I-E⁺, CD14⁺, CD11b^{высок}, и CD11c^{низк} (также называемый ОАМ1). В одном варианте осуществления, например, у мышей, опухолеассоциированные макрофаги являются по меньшей мере CD45⁺, I-A/I-E⁺, CD14⁺, CD11b^{низк}, и CD11c^{высок} (также называемые ОАМ2). В контексте данного документа термин «CD11b^{высок} макрофаги» относится к макрофагам, экспрессирующим высокие уровни CD11b. В контексте данного документа термин «CD11b^{низк} макрофаги» относится к макрофагам, которые экспрессируют на своей поверхности уровень CD11b, который существенно ниже, чем у макрофагов CD11b^{высок}. В контексте данного документа термин «CD11c^{высок}» относится к макрофагам, экспрессирующим высокие уровни CD11c. В контексте данного документа термин «CD11c^{низк} макрофаги» относится к макрофагам, которые экспрессируют на своей поверхности уровень CD11c, который существенно ниже, чем у макрофагов CD11c^{высок}.

[0374] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки по изобретению включают одну или более клеток ОАМ и ДК1.

[0375] В некоторых вариантах осуществления, например у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки по изобретению включают одну или более клеток из ОАМ1, ОАМ2 и ДК1. В таких вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки по изобретению приводят в контакт с антителом к TREM1.

[0376] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой миелоидные супрессорные клетки (МСК). В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой опухлеассоциированные нейтрофилы (ОАН).

[0377] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки локализуются на краях опухолевых поражений или в трансформированных опухолевых протоках, где они вступают в контакт с родственными Т-клетками. В одном варианте осуществления локализация нестимулирующей миелоидной клетки изменена, так что клетки больше не локализуются на краю опухоли или больше не контактируют с Т-клетками.

[0378] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, включающей стимулирующие миелоидные клетки и нестимулирующие миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, содержащей только нестимулирующие миелоидные клетки. Популяции иммунных клеток по настоящему изобретению могут быть чистыми, гомогенными, гетерогенными, полученными из различных источников (например, из пораженной ткани, опухолевой ткани, нормальной ткани, банков клеток), могут поддерживаться в первичных культурах клеток, поддерживаться в immortalized культурах, и/или поддерживаться в культурах *ex vivo*.

[0379] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой опухлеассоциированные макрофаги.

[0380] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой дендритные клетки.

[0381] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11c⁺, и BDCA1⁺. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки включают клетки, которые являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11c⁺, и BDCA1⁺. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки состоят из клеток, которые являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11c⁺, и BDCA1⁺. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки состоят в основном из клеток, которые являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11c⁺, и BDCA1⁺.

[0382] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, BDCA3⁻. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки включают клетки, которые являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, BDCA3⁻. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки состоят из клеток, которые являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, BDCA3⁻. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки состоят в основном из клеток, которые являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, BDCA3⁻.

[0383] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b⁺. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки включают клетки, которые являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b⁺. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки состоят из клеток, которые являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b⁺. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки состоят в основном из клеток, которые являются CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11b⁺.

у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки включают клетки, которые являются CD45⁺, I-A/I-E⁺, CD14⁺, CD11b^{высок}, и CD11c^{низк}. В некоторых вариантах осуществления, например, у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки состоят из клеток, которые являются CD45⁺, I-A/I-E⁺, CD14⁺, CD11b^{высок}, и CD11c^{низк}. В некоторых вариантах осуществления, например, у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки состоят в основном из клеток, которые являются CD45⁺, I-A/I-E⁺, CD14⁺, CD11b^{высок}, и CD11c^{низк}. В таких вариантах осуществления нестимулирующие мышинные миелоидные клетки приводят в контакт с антителом к TREM1.

[0391] В некоторых вариантах осуществления, например, у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки являются CD45⁺, I-A/I-E⁺, CD14⁺, CD11b^{низк}, и CD11c^{высок}. В некоторых вариантах осуществления, например, у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки включают клетки, которые являются CD45⁺, I-A/I-E⁺, CD14⁺, CD11b^{низк}, и CD11c^{высок}. В некоторых вариантах осуществления, например, у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки состоят из клеток, которые являются CD45⁺, I-A/I-E⁺, CD14⁺, CD11b^{низк}, и CD11c^{высок}. В некоторых вариантах осуществления, например, у мышей, нестимулирующие миелоидные клетки состоят в основном из клеток, которые являются CD45⁺, I-A/I-E⁺, CD14⁺, CD11b^{низк}, и CD11c^{высок}. В таких вариантах осуществления нестимулирующие мышинные миелоидные клетки приводят в контакт с антителом к TREM1.

[0392] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки находятся в раковой ткани.

[0393] В некоторых вариантах осуществления популяция иммунных клеток находится в раковой ткани.

[0394] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие клетки и стимулирующие миелоидные клетки находятся в раковой ткани.

[0395] В некоторых вариантах осуществления биологический образец содержит популяцию иммунных клеток, состоящую из нестимулирующих миелоидных клеток и стимулирующих миелоидных клеток.

[0396] Клетки НМК могут в совокупности относиться к клеткам ДК1, ОАМ1 и ОАМ2, присутствующим в опухолевых тканях, которые можно отличить от других типов клеток по экспрессии маркеров клеток НМК. Например, гены и связанные с ними белки, которые экспрессируются или транслируются в большем количестве в клетках НМК, чем в СДК, могут выступать в качестве маркеров НМК. Иллюстративный маркер НМК представляет собой CD11b. Дополнительные иллюстративные маркеры НМК перечислены в таблице А. Клетки НМК могут экспрессировать TREM1, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK, и TMEM119 на их клеточной поверхности. В некоторых аспектах клетки НМК не экспрессируют по меньшей мере один из KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, CLEC9A, BDCA3, и XCR1.

[0397] В одном варианте осуществления, клетки НМК экспрессируют один или более маркерных генов НМК, перечисленных в таблице D. В еще одном варианте осуществления клетки НМК экспрессируют 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или более маркеров НМК, перечисленных в таблице А. В еще одном варианте осуществления изобретения клетки НМК экспрессируют большинство или все маркеры НМК, перечисленные в таблице А. В еще одном варианте осуществления клетки НМК идентифицируют как экспрессирующие MRC1, MS4A7, C1QC, APOE, C1QB, C1QA, и C5AR1.

Таблица D

Таблица D	
Маркеры СДК	Маркеры НМК
KIT	C5AR1
CCR7	LYVE1
BATF3	ABCC3
FLT3	MRC1
ZBTB46	SIGLEC1
IRF8	STAB1
BTLA	C1QB
MYCL1	C1QA
CLEC9A	TMEM37
BDCA3	MERTK
XCR1	C1QC
	TMEM119
	MS4A7
	APOE
	CYP4F18
	TREM1
	TREM2
	TLR7
	LILRB4

Стимулирующие миелоидные клетки

[0398] Как используется в данном документе, стимулирующие миелоидные клетки (также называемые СДК в определенных аспектах) представляют собой миелоидные клетки, которые эффективны для стимулирования иммунного ответа (например, более эффективно стимулируют противоопухолевый ответ в опухолевом микроокружении по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками). В некоторых вариантах осуществления стимулирующие миелоидные клетки эффективны при презентации антигена (например, опухолевого антигена) Т-клеткам или эффективны при стимуляции опухолеспецифических Т-клеточных ответов по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками. В некоторых вариантах осуществления стимулирующие миелоидные клетки могут проявлять повышенную способность захватывать, процессировать и/или презентировать опухолеассоциированные антигены Т-клеткам по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками. Стимулирующие миелоидные клетки могут иметь повышенную способность повторно примировать цитотоксические Т-лимфоциты или в некоторых случаях стимулировать эффективное уничтожение опухолевых клеток по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками. Стимулирующие миелоидные клетки могут демонстрировать более высокую экспрессию генов и маркеров клеточной поверхности, участвующих в процессинге антигена, презентации антигена и/или костимуляции антигена, включая, без ограничения, CD80, CD86, ГКГС I и ГКГС II по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками.

[0399] Иллюстративные маркеры стимулирующих миелоидных клеток перечислены в таблице А. Например, в СДК человека экспрессия Xcr1, Clec9a и BDCA3 (CD141) является маркером идентичности СДК. Следует отметить, что у мышей CD103 также может быть использован в качестве сильного маркера идентичности СДК, хотя он не экспрессируется в СДК человека.

[0400] В одном варианте осуществления СДК представляют собой инфильтрирующие опухоль миелоидные клетки, имеющие идентичность с дендритными клетками, которые также экспрессируют один или более маркеров СДК, перечисленных в таблице А. В еще одном варианте осуществления СДК представляют собой инфильтрирующие опухоль миелоидные клетки, имеющие идентичность с дендритными клетками, которые также экспрессируют два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или все маркеры СДК, перечисленные в таблице А. В еще одном варианте осуществления СДК идентифицируются как инфильтрирующие опухоль миелоидные дендритные клетки, экспрессирующие BDCA3, KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, XCR1 и CLEC9A. Клетки СДК могут экспрессировать по меньшей мере один из KIT, CCR7, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, CLEC9A, BDCA3, и XCR1. В некоторых вариантах осуществления СДК по существу не экспрессируют TREM1, MS4A7, C5AR1, LYVE1, ABCC3, LILRB4, MRC1/CD206, SIGLEC1, STAB1, TMEM37, MERTK, и/или TMEM119 на их клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления СДК по существу не экспрессируют C5AR1, LYVE1, ABCC3, MRC1, SIGLEC1, STAB1, C1QB, C1QA, TMEM37, MERTK, C1QC, TMEM119, MS4A7, APOE, CYP4F18, TREM1, TLR7 и/или LILRB4. Для оценки экспрессии маркера, описанного в данном документе, могут быть использованы проточная цитометрия и ПЦР, а также другие признанные в данной области техники анализы.

[0401] Стимулирующие миелоидные клетки могут представлять собой CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, CD11c⁺, и BDCA3⁺. Стимулирующие миелоидные клетки могут представлять собой CD45⁺, HLA-DR⁺, и BDCA3⁺. Стимулирующие миелоидные клетки могут представлять собой CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺, и BDCA3⁺. Стимулирующие миелоидные клетки могут представлять собой CD45⁺, HLA-DR⁺, CD11c⁺, и BDCA3⁺.

Фармацевтические композиции

[0402] В настоящей заявке представлены композиции, содержащие антитела, в том числе фармацевтические композиции, содержащие любое одно или более описанных в данном документе антител с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами. В некоторых вариантах осуществления композиция является стерильной. Фармацевтические композиции, как правило, включают эффективное количество антитела.

[0403] Эти композиции могут содержать, в дополнение к одному или более антителам, описанным в данном документе, фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны препятствовать эффективности активного ингредиента. Точная природа носителя или другого материала может зависеть от способа введения, например, пероральный, внутривенный, кожный или подкожный, назальный, внутримышечный, внутрибрюшинный пути.

[0404] Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в форме таблеток, капсул, порошка или жидкости. Таблетка может содержать твердый носитель, такой как желатин или адъювант.

Жидкие фармацевтические композиции, как правило, содержат жидкий носитель, такой как вода, нефть, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

[0405] Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в место поражения активный ингредиент будет в форме парентерально приемлемого водного раствора, не содержащего пирогенов и имеющего подходящие pH, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области техники могут хорошо приготовить подходящие растворы, используя, например, изотонические носители, такие как хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, лактатный раствор Рингера для инъекций. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

[0406] Будь то полипептид, антитело (например, антитело к TREM1), нуклеиновая кислота, малая молекула или другое фармацевтически полезное соединение согласно настоящему изобретению, которое следует вводить индивидууму, введение предпочтительно осуществляется в «терапевтически эффективном количестве» или «профилактически эффективном количестве» (в зависимости от обстоятельств, хотя профилактика может считаться терапией), что является достаточным для проявления пользы для человека. Фактическое количество вводимого препарата, а также скорость и время введения будут зависеть от характера и степени тяжести заболевания, связанного с агрегацией белков, которое лечат. Назначение лечения, например, принятие решений о дозировке и т.д. входит в обязанности врачей общей практики и других врачей, и, как правило, учитывает нарушение, подлежащее лечению, состояние конкретного пациента, место доставки, способ применения и другие факторы, известные практикующим врачам. Примеры вышеупомянутых техник и протоколов можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980.

[0407] Композиция может назначаться отдельно или в комбинации с другими видами лечения, одновременно или последовательно, в зависимости от патологического состояния, подлежащего лечению.

Способы

Способы получения

[0408] Антитела, описанные в данном документе, могут быть получены с использованием рекомбинантных методов и композиций, например, как описано в патенте США № 4816567.

[0409] В одном варианте осуществления представлена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, описанное в данном документе. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела), или аминокислотную последовательность, содержащую VHH однодоменного антитела. В дополнительном варианте осуществления предложен один или более векторов (например, векторов экспрессии), содержащих такую нуклеиновую кислоту. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота представлена в мультицистронном векторе. В дополнительном варианте осуществления предложена клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном из

таких вариантов осуществления клетка-хозяин содержит (например, трансформированную): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антигенсвязывающей полипептидной конструкции, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антигенсвязывающей полипептидной конструкции, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VH антигенсвязывающей полипептидной конструкции. В одном варианте осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичника китайского хомяка (CHO) или эмбриональной клеткой почки человека (HEK), или лимфоидной клеткой (например, клеткой Y0, NS0, Sp20). В одном варианте осуществления предложен способ получения антитела, причем способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующей антитело, как указано выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и, в некоторых случаях, выделение антитела из клетки-хозяина (или из среды для культивирования клетки-хозяина).

[0410] Для получения рекомбинантного антитела нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и вставляют в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такая нуклеиновая кислота может быть легко выделена и секвенирована с использованием общепринятых способов (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, которые кодируют тяжелые и легкие цепи антитела).

[0411] Термин «существенно очищенный» относится к конструкции, описанной в данном документе, или ее варианту, который может быть по существу или практически свободен от компонентов, которые, как правило, сопровождают или взаимодействуют с белком в его естественном окружении, т.е. нативная клетка или клетка-хозяин в случае рекомбинантно полученного гетеромультимера, которая в определенных вариантах осуществления по существу свободна от клеточного материала, включает препараты белка, имеющие менее около 30%, менее около 25%, менее около 20%, менее около 15%, менее около 10%, менее около 5%, менее около 4%, менее около 3%, менее около 2% или менее около 1% (по сухой массе) загрязняющего белка. Если гетеромультимер или его вариант рекомбинантно продуцируется клетками-хозяевами, то в некоторых вариантах осуществления белок составляет около 30%, около 25%, около 20%, около 15%, около 10%, около 5%, около 4%, около 3%, около 2%, или около 1% или меньше сухой массы клеток. Если гетеромультимер или его вариант рекомбинантно продуцируется клетками-хозяевами, то в определенных вариантах осуществления белок присутствует в культуральной среде в количестве около 5 г/л, около 4 г/л, около 3 г/л, около 2 г/л, около 1 г/л, около 750 мг/л, около 500 мг/л, около 250 мг/л, около 100 мг/л, около 50 мг/л, около 10 мг/л или около 1 мг/л или менее от сухой массы клеток. В определенных вариантах осуществления «существенно очищенный» гетеромультимер, полученный описанными в данном документе методами, имеет уровень чистоты по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, конкретно, уровень чистоты по меньшей мере около 75%, 80%, 85%, и более конкретно, уровень чистоты по меньшей мере около 90%, уровень чистоты по меньшей мере около 95%, уровень чистоты по меньшей мере около 99% или выше, при определении соответствующими методами, такими как анализ методом ДСН/ПААГ-электрофореза, ОФ-ВЭЖХ, ЭХ и капиллярный электрофорез.

[0412] Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в данном документе.

[0413] Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» или «клетка-хозяин» относится к клетке, которая включает экзогенный полинуклеотид, независимо от примененного для вставки метода, например, прямое поглощение, трансдукция, половой процесс с f-плазмидами или другие методы, известные в данной области техники для создания рекомбинантных клеток-хозяев. Экзогенный полинуклеотид может поддерживаться в виде неинтегрированного вектора, например плазмиды, или альтернативно может интегрироваться в геном хозяина. Клетки-хозяева могут включать CHO, производные CHO, NS0, Sp2O, CV-1, VERO-76, HeLa, HepG2, Per.C6, или BHK.

[0414] В контексте данного документа термин «эукариот» относится к организмам, принадлежащим к филогенетическому домену Eucarya, таким как животные (включая, помимо прочего, млекопитающих, насекомых, рептилий, птиц и т. д.), инфузории, растения (включая, но не ограничиваясь ими, однодольные, двудольные, водоросли и др.), грибы, дрожжи, жгутиконосцы, микроспоридии, протисты и др.

[0415] В контексте данного документа термин «прокариот» относится к прокариотическим организмам. Например, неэукариотический организм может принадлежать филогенетическому домену Eubacteria (включая, но ограничиваясь *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, и т. п.) или филогенетическому домену Archaea (включая, но ограничиваясь, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, такой как *Haloferax volcanii* и *Halobacterium species NRC-1*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeropyrum pernix*, и т. п.).

[0416] Например, антитело может продуцироваться в бактериях, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не нужны. Для экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, патенты США № 5648237, 5789199 и 5840523. (См. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254, описывающую экспрессию фрагментов антител в *E. coli*). После экспрессии антитело может быть выделено из биомассы бактериальных клеток в растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

[0417] Помимо прокариот, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, являются эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, чьи метаболические пути гликозилирования были «гуманизированы», что приводит к продукции антител с частично или полностью человеческим профилем гликозилирования. См. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), и Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

[0418] Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированных антител также получены из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, которые можно использовать в комбинации с клетками насекомых, в частности для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

[0419] В качестве хозяев также можно использовать культуры растительных клеток. См., например, патент США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описывающих технологию PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях).

[0420] Клетки позвоночных могут также использоваться в качестве хозяев. Например, можно использовать линии клеток млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии. Другими примерами полезных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7); линия эмбриональных почечек человека (клетки 293 или 293, как описано, например, в Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (BHK); клетки почки новорожденного хомяка (клетки TM4, описанные, например, в Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK; клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, как описано, например, в Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клетки MRC 5; и клетки FS4. Другие полезные линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR-CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Для обзора некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продукции антител, см., например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003).

[0421] В одном варианте осуществления описанные в данном документе антитела продуцируются в стабильных клетках млекопитающих способом, включающим: трансфекцию по меньшей мере одной стабильной клетки млекопитающего: нуклеиновой кислотой, кодирующей антитело, в заранее определенном соотношении; и экспрессию нуклеиновой кислоты по меньшей мере в одной клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления предварительно заданное соотношение нуклеиновой кислоты определяют в экспериментах по транзientной трансфекции для определения относительного соотношения входящих нуклеиновых кислот, которое приводит к наибольшему процентному содержанию антитела в экспрессированном продукте.

[0422] В некоторых вариантах осуществления представлен способ получения антитела в стабильных клетках млекопитающих, как описано в данном документе, причем продукт экспрессии по меньшей мере одной стабильной клетки млекопитающего содержит больший процент желаемого гликозилированного антитела по сравнению с мономерными полипептидами тяжелой или легкой цепи, или других антител.

[0423] В некоторых вариантах осуществления описан способ получения гликозилированного антитела в стабильных клетках млекопитающих, причем указанный способ включает идентификацию и очистку желаемого гликозилированного антитела. В некоторых вариантах осуществления указанную идентификацию выполняют одним или обоими методами жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии.

[0424] При необходимости антитела можно очистить или выделить после экспрессии. Белки можно выделять или очищать различными способами, известными специалистам в данной области техники. Стандартные методы очистки включают хроматографические методики, включая ионный обмен, гидрофобное взаимодействие, аффинность, разделение по размерам или гель-фильтрацию и обращение фаз, выполняемые при атмосферном давлении или при высоком давлении с использованием таких систем, как

ЖХБР и ВЭЖХ. Методы очистки также включают электрофоретические, иммунологические методики, методики осаждения, диализа и хроматофокусирования. Применимы также методики ультрафильтрации и диафильтрации в сочетании с концентрированием белков. Как хорошо известно в данной области техники, множество природных белков связывают Fc и антитела, 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 областью Fab некоторых антител. Очистка часто становится возможной с помощью конкретного партнера по слиянию. Например, антитела можно очищать, используя смолу с глутатионом, если применяется GST-гибридизация, аффинную хроматографию с Ni²⁺, если применяется His-метка, или иммобилизованное антитело к flag, если применяется flag-метка. Общие рекомендации по подходящим методам очистки см., например, Protein Purification: Principles and Practice, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994, которая полностью включена посредством ссылки. Необходимая степень очистки будет варьироваться в зависимости от применения антител. В некоторых случаях очистка не требуется.

[0425] В некоторых вариантах осуществления антитела очищают с помощью анионообменной хроматографии, включая, но не ограничиваясь этим, хроматографию на колонках с Q-сефарозой, DEAE-сефарозой, poros HQ, poros DEAF, Toyopearl Q, Toyopearl QAE, Toyopearl DEAE, Resource/Source Q и DEAE, Fractogel Q и DEAE.

[0426] В конкретных вариантах осуществления описанные в данном документе белки очищают с помощью катионообменной хроматографии, включая, но не ограничиваясь этим, хроматографию 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 эквиваленты и аналоги.

[0427] Кроме того, описанные в данном документе антитела могут быть химически синтезированы с использованием методов, известных в данной области техники (например, см. Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N.Y and Hunkapiller et al., Nature, 310:105-111 (1984)). Например, полипептид, соответствующий фрагменту полипептида, можно синтезировать применяя пептидный синтез. Кроме того, при желании, в полипептидную последовательность в качестве замены или добавления можно вводить неклассические аминокислоты или химические аналоги аминокислот. Неклассические аминокислоты включают, но не ограничиваются ими, D-изомеры обычных аминокислот, 2,4-диаминомасляную кислоту, альфа-аминоизомасляную кислоту, 4-аминомасляную кислоту, Abu, 2-аминомасляную кислоту, g-Abu, e-Ahx, 6-аминогексановую кислоту, Aib, 2-аминоизомасляную кислоту, 3-аминопропионовую кислоту, орнитин, норлейцин, норвалин, гидроксипролин, саркозин, цитруллин, гомоцитруллин, цистеиновую кислоту, т-бутилглицин, т-бутилаланин, фенилглицин, циклогексилаланин, аланин, фтораминокислоты, сконструированные аминокислоты, такие как α -метиламинокислоты, C-метиламинокислоты, N-метиламинокислоты и в целом аналоги аминокислот. Кроме того, аминокислота может быть D (правовращающей) или L (левовращающей).

Способы иммунной модуляции миелоидных клеток

[0428] Способы введения антитела TREM1, как описано в данном документе, могут приводить к индукции провоспалительных молекул, таких как цитокины, хемокины, или экспрессии миелоидных активирующих рецепторов миелоидными клетками. Как правило, индуцированные провоспалительные молекулы

присутствуют на уровнях, превышающих уровень, достигнутый при использовании изотипического контроля. В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки представляют собой нестимулирующие миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки представляют собой экспрессирующие TREM1 клетки (TREM1+). В некоторых вариантах осуществления миелоидная клетка представляет собой миелоидную супрессорную клетку или опухолеассоциированный нейтрофил. В некоторых вариантах осуществления TREM1+ клетка представляет собой миелоидную супрессорную клетку или опухолеассоциированный нейтрофил. Такие провоспалительные молекулы в свою очередь приводят к активации противоопухолевого иммунитета, включая, но не ограничиваясь этим, активацию Т-клеток, активацию M1-подобных макрофагов и активацию NK-клеток. Таким образом, введение антитела к TREM1 может вызвать множественные противоопухолевые иммунные механизмы, которые приводят к разрушению опухоли.

[0429] В другом аспекте изобретение представлены способы повышения иммунного ответа у человека, включающие введение человеку эффективного количества композиции, содержащей антитело к TREM1 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления способ повышения иммунного ответа у субъекта включает введение субъекту антитела, конкурирующего за связывание с TREM1 человека (SEQ ID NO: 1) с эталонным антителом. В некоторых вариантах осуществления способ повышения иммунного ответа у субъекта включает введение субъекту антитела, конкурирующего за связывание с TREM1 человека (SEQ ID NO: 1), причем антитело связывается с остатками 21–34 (SEQ ID NO: 42), 103–109 (SEQ ID NO: 43), и 128–136 (SEQ ID NO: 44) TREM1 человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления способ повышения иммунного ответа у субъекта включает введение субъекту антитела, конкурирующего за связывание с TREM1 человека (SEQ ID NO: 1), где антитело i) связывается с остатками 21–34 (SEQ ID NO: 42), 103–109 (SEQ ID NO: 43), и 128–136 (SEQ ID NO: 44) TREM1 человека (SEQ ID NO: 1); и ii) необязательно содержит область Fc человека. В некоторых вариантах осуществления антитело присутствует в фармацевтической композиции, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0430] В любом и всех аспектах усиления иммунного ответа, как описано в данном документе, любое увеличение или уменьшение или изменение аспекта характеристик(-и) или функции(-й) сравнивается с клеткой, которую не приводили в контакт с антителом к TREM1.

[0431] Повышение иммунного ответа может быть как усилением иммунного ответа, так и индуцированием иммунного ответа. Например, усиление иммунного ответа включает в себя как начало или инициацию иммунного ответа, так и наращивание или усиление текущего или существующего иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления лечение индуцирует иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления индуцированный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления индуцированный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления лечение усиливает иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления лечение усиливает иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления повышенный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ. В

некоторых вариантах осуществления повышенный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ запускается или инициируется введением антитела к TREM1. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ усиливается при введении антитела к TREM1.

[0432] В другом аспекте, в настоящей заявке представлены способы приведения в контакт клетки с антителом к TREM1, что приводит к модуляции иммунной функции клетки. Модуляция может заключаться в усилении иммунного ответа или перепрограммировании нестимулирующих миелоидных клеток в стимулирующие миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления модуляция представляет собой повышение иммунной функции. В некоторых вариантах осуществления модуляция представляет собой перепрограммирование нестимулирующих миелоидных клеток в стимулирующие миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления модуляция функции приводит к активации нестимулирующих миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения модуляция функции приводит к перепрограммированию экспрессирующих TREM1 миелоидных клеток.

[0433] В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой нестимулирующие миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой экспрессирующие TREM1 клетки (TREM1+ клетки). В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие клетки представляют собой TREM1+ клетки. В некоторых вариантах осуществления TREM1+ клетки представляют собой одну или более из клеток ДК1, клеток OAM1, клеток OAM2, миелоидных супрессорных клеток (МСК), нейтрофилов и опухолеассоциированных нейтрофилов (ОАН). В некоторых вариантах осуществления TREM1+ клетка представляет собой миелоидную супрессорную клетку. В некоторых вариантах осуществления TREM1+ клетка представляет собой опухолеассоциированный нейтрофил (ОАН). В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт нестимулирующей миелоидной клетки с антителом к TREM1 индуцирует превращение нестимулирующей клетки в стимулирующую миелоидную клетку (СДК).

[0434] В некоторых вариантах осуществления модуляция функции нестимулирующих миелоидных клеток или TREM1+ клеток приводит к увеличению способности клеток стимулировать как нативные, так и активированные CD8+ Т-клетки, например, путем увеличения способности нестимулирующих клеток перекрестно презентировать опухолевый антиген на молекулах ГКГС I наивным CD8+ Т-клеткам или путем увеличения секреции цитокинов или хемокинов нестимулирующими миелоидными клетками. В некоторых вариантах осуществления модуляция функции нестимулирующих миелоидных клеток или TREM1+ клеток приводит к увеличению способности клеток стимулировать как нативные, так и активированные CD4+ Т-клетки, например, путем увеличения способности нестимулирующих клеток или TREM1+ перекрестно презентировать опухолевый антиген на молекулах ГКГС II наивным CD4+ Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления модуляция функции усиливает или увеличивает способность клеток продуцировать цитокины, хемокины, костимулирующие или активирующие рецепторы. В некоторых вариантах осуществления модуляция повышает стимулирующую в отношении Т-клеток функцию миелоидных клеток или TREM1+ клеток, включая, например, способность клеток запускать сигналинг Т-клеточного рецептора (TCR), пролиферацию Т-клеток или продукцию Т-клеточных цитокинов.

[0435] В некоторых вариантах осуществления повышенный иммунный ответ представляет собой секрецию цитокинов и хемокинов. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет агонистическую активность.

В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один цитокин или хемокин выбран из группы, состоящей из: ИФН- γ , ИЛ-1 α , ИЛ-12, ИЛ-2, TNFSF9, TNFSF10, CXCL9, CXCL10, CCL17, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL11, CXCL15, CCL3, CCL4, CCL2, CCL8, CCL20, ИЛ-6, CCL2, CCL7, CSF-1, CCL13, CCL19, ФНО- α , GZMH, PD-L1, MMP7, CCL23, CD70, CD8 α , FasL, CD274, CRTAM, гранзима А (GzmA), или гранзима В (GzmB). В некоторых вариантах осуществления цитокин или хемокин представляет собой CXCL10. В некоторых вариантах осуществления цитокин или хемокин представляет собой ИФН- γ . В некоторых вариантах осуществления секреция цитокинов или хемокинов увеличивается в 1–100 раз, в 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 1–10, 10–20, 20–30, 30–40, 40–50, 50–60, 60–70, 70–80, 80–90 или 90–100 раз по сравнению с необработанной клеткой или клеткой, обработанной антителом изотипического контроля. В некоторых вариантах осуществления хемокин представляет собой CXCL10, и секреция увеличивается в около 1–100 раз, 1 раз, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 1–10 раз, 10–20 раз, 20–30 раз, 30–40 раз, 40–50 раз, 50–60 раз, 60–70 раз, 70–80 раз, 80–90 раз или 90–100 раз по сравнению с необработанной клеткой или клеткой, обработанной антителом изотипического контроля. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой ИФН- γ , и секреция увеличивается в около 1–100 раз, 1 раз, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 1–10 раз, 10–20 раз, 20–30 раз, 30–40 раз, 40–50 раз, 50–60 раз, 60–70 раз, 70–80 раз, 80–90 раз или 90–100 раз по сравнению с необработанной клеткой или клеткой, обработанной антителом изотипического контроля.

[0436] В некоторых вариантах осуществления модуляция увеличивает экспрессию по меньшей мере одного миелоидного костимулирующего белка по сравнению с антителом изотипического контроля. В некоторых вариантах осуществления миелоидный костимулирующий белок представляет собой HLA-DR, CD40, CD80 или CD86 в клетке. HLA-DR представляет собой рецептор ГКГС класса II на клеточной поверхности, который в основном функционирует для презентации пептидных антигенов Т-клеткам, чтобы вызвать иммунный ответ. HLA-DR представляет собой гетеродимер, состоящий из α -единицы и β -единицы. HLA-DR экспрессируется антигенпрезентирующими клетками, такими как макрофаги, В-клетки и дендритные клетки. CD40 представляет собой костимулирующий белок, который находится на антигенпрезентирующих клетках и необходим для активации антигенпрезентирующей клетки. CD80 представляет собой рецептор, экспрессируемый в основном иммунными клетками, такими как дендритные клетки, В-клетки, моноциты и антигенпрезентирующие клетки, и тесно связан с CD86. CD80 взаимодействует с CD28 и CTLA4 на Т-клетках и действует в тандеме с CD86, обеспечивая активацию, пролиферацию и дифференцировку Т-клеток и В-клеток, включая передачу сигналов Т-клеткам для дифференцировки в цитотоксические Т-клетки. CD80 также может стимулировать дендритные клетки и усиливать выработку цитокинов. Для того чтобы антигенпрезентирующая клетка полностью активировала Т-клетки, наряду с первичным антигенспецифическим сигналом необходимы костимулирующие белки. Костимуляция Т-клеток необходима для пролиферации, дифференцировки и выживаемости Т-клеток. Т-клетки, активированные без костимуляции, могут привести к анергии или делеции Т-клеток.

[0437] В некоторых вариантах осуществления лечение увеличивает экспрессию HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления лечение увеличивает экспрессию CD40. В некоторых вариантах осуществления лечение увеличивает экспрессию CD80. В некоторых вариантах осуществления лечение увеличивает

экспрессию CD86. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая молекула увеличивается в около 1–100 раз, 1 раз, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 1–10 раз, 10–20 раз, 20–30 раз, 30–40 раз, 40–50 раз, 50–60 раз, 60–70 раз, 70–80 раз, 80–90 раз или 90–100 раз или более по сравнению с необработанной клеткой или клеткой, обработанной антителом изотипического контроля.

[0438] В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой рекрутинг и активацию противоопухолевых иммунных клеток.

[0439] В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует повышенную активацию внутриклеточных сигнальных путей ERK и/или JAK-STAT в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля. В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует повышенную активацию STAT3 в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля. В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует повышенную активацию внутриклеточного сигнального пути ERK в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля. В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует повышенную активацию внутриклеточного сигнального пути JAK-STAT в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля. Путь ERK участвует в пролиферации клеток. STAT3 представляет собой фактор транскрипции и член сигнального пути JAK-STAT. STAT3 опосредует транскрипцию генов, участвующих в клеточном росте, и необходим для дифференцировки Т-хелперов Т_H17. Потеря STAT3 *in vivo* также была связана с неспособностью поддерживать иммунитет на основе антител.

[0440] В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует вторичный иммунный ответ по сравнению с антителом изотипического контроля. В целом, вторичный иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ при последующем воздействии патогенов или антигенов, с которыми иммунная система сталкивалась ранее. Иллюстративные вторичные иммунные ответы включают иммунный ответ после инфекции или вакцинации антигеном. В целом, вторичные иммунные ответы опосредуются лимфоцитами, такими как Т-клетки или В-клетки. В некоторых вариантах осуществления вторичный иммунный ответ является защитным иммунным ответом на рак, включая рост, пролиферацию или метастазирование раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления вторичный иммунный ответ ингибирует, предотвращает или уменьшает рост, пролиферацию или метастазирование раковых клеток.

[0441] В некоторых вариантах осуществления антитело перекрестно связывает TREM1 с TREM1 на поверхности TREM1+ клетки. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляют *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляют *in vivo* в организме человека. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляют *in vivo* в организме человека. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляет путем введения антитела к TREM1. В некоторых вариантах осуществления индивидуум, получающий антитело (например, человек), болен раком.

Методы инактивации, уничтожения или истощения нестимулирующих миелоидных клеток

[0442] В одном аспекте, в настоящей заявке представлены способы приведения в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом к TREM1, таким как человеческое или гуманизированное антитело, что приводит к инактивации нестимулирующих миелоидных клеток.

[0443] В другом аспекте, в настоящей заявке представлены способы приведения в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом к TREM1, что приводит к инактивации нестимулирующих миелоидных клеток.

[0444] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие клетки представляют собой одну или более из клеток ДК1 и клеток ОАМ. В некоторых вариантах реализации нестимулирующие клетки представляют собой одну или более из клеток ОАМ, миелоидных супрессорных клеток (МСК) и опухолеассоциированных нейтрофилов (ОАН).

[0445] В некоторых вариантах осуществления, настоящая заявка обеспечивает способы инактивации нестимулирующих миелоидных клеток, включающие приведение в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом к TREM1, тем самым уничтожая нестимулирующие миелоидные клетки. Инактивация означает частичную или полную нефункциональность клетки. В некоторых вариантах осуществления инактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к индуцированию остановки роста клеток. В некоторых вариантах осуществления инактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к апоптозу в клетках. В некоторых вариантах осуществления инактивация нестимулирующих клеток приводит к лизису клеток, например, посредством комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) или антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). В некоторых вариантах осуществления инактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к некрозу в клетках. В некоторых вариантах осуществления инактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к индуцированию остановки роста клеток. В некоторых вариантах осуществления инактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к инактивации клеток. В некоторых вариантах осуществления инактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к нейтрализации активности белка TREM1 в клетках. В некоторых вариантах осуществления инактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к снижению пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления инактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к дифференцировке клеток. В некоторых вариантах осуществления инактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к снижению способности клеток действовать как ингибирующие антигенпрезентирующие клетки или приводит к повышению способности клеток действовать как активирующие антигенпрезентирующие клетки. В некоторых вариантах осуществления инактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к неправильной локализации клеток в опухолевой ткани или опухолевом микроокружении (ТМЕ). В некоторых вариантах осуществления инактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к изменению пространственной организации клеток в опухолевой ткани или опухолевом микроокружении. В некоторых вариантах осуществления инактивация нестимулирующих миелоидных клеток приводит к изменению транзиснтной экспрессии клеток в опухолевой ткани или ТМЕ. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает удаление нестимулирующих миелоидных клеток.

[0446] В любом и всех аспектах инактивации нестимулирующих миелоидных клеток, как описано в данном документе, любое увеличение или уменьшение или изменение аспекта характеристик(-и) или функции(-й) сравнивают по сравнению с клеткой, которую не приводили в контакт с антителом к TREM1.

[0447] В еще одном аспекте, в настоящей заявке представлены способы приведения в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом к TREM1, что приводит к модуляции функции нестимулирующих миелоидных клеток. Модуляция может представлять собой любое одно или более из следующего. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие клетки представляют собой одну или более из клеток ДК1, клеток OAM1, клеток OAM2, MCK и OAH. В некоторых вариантах осуществления модуляция функции приводит к инактивации нестимулирующих миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления модуляция функции нестимулирующих миелоидных клеток приводит к повышению способности клеток стимулировать как нативные, так и активированные CD8+ Т-клетки, например, путем повышения способности нестимулирующих клеток перекрестно презентировать опухолевый антиген на молекулах ГКГС I наивным CD8+ Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления модуляция функции нестимулирующих миелоидных клеток приводит к повышению способности клеток стимулировать как нативные, так и активированные CD4+ Т-клетки, например, путем повышения способности нестимулирующих клеток перекрестно презентировать опухолевый антиген на молекулах ГКГС II наивным CD4+ Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления модуляция повышает стимулирующую в отношении Т-клеток функцию миелоидных клеток, включая, например, способность клеток запускать сигналинг Т-клеточного рецептора (TCR), пролиферацию Т-клеток или продукцию Т-клеточных цитокинов. В некоторых вариантах осуществления модуляция функции усиливает или увеличивает способность клеток продуцировать цитокины, хемокины, костимулирующие или активирующие рецепторы. В одном варианте осуществления выживаемость нестимулирующей клетки снижается или пролиферация нестимулирующей клетки снижается. В одном варианте осуществления соотношение стимулирующих миелоидных клеток и нестимулирующих миелоидных клеток увеличивается.

[0448] В любом и всех аспектах снижения функции нестимулирующих миелоидных клеток, как описано в данном документе, любое увеличение или уменьшение или изменение аспекта характеристик(-и) или функций(-и) сравнивают по сравнению с клеткой, которую не приводили в контакт с антителом к TREM1.

[0449] В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке представлены способы уничтожения (также называемого индуцированием гибели клеток) нестимулирующих миелоидных клеток, включающие приведение в контакт нестимулирующих миелоидных клеток с антителом к TREM1, что приводит к уничтожению нестимулирующих миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления уничтожение увеличивается по сравнению с нестимулирующими миелоидными клетками, которые не приводили в контакт с антителом к TREM1. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт вызывает апоптоз в нестимулирующих миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, включающей нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает удаление нестимулирующих миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления погибает от 10% до 100% клеток. В некоторых вариантах осуществления, погибает по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% клеток.

[0450] В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке представлены способы увеличения соотношения стимулирующих миелоидных клеток и нестимулирующих миелоидных клеток в популяции иммунных клеток, включающей стимулирующие миелоидные клетки и нестимулирующие миелоидные клетки, включающие приведение в контакт популяции иммунных клеток с антителом к TREM1. В некоторых вариантах осуществления соотношение увеличивается по отношению к популяции клеток, которые не приводили в контакт с антителом к TREM1. В некоторых вариантах осуществления отношение клеток ДК2 к клеткам ДК1 увеличивается. В некоторых вариантах осуществления отношение клеток ДК2 к клеткам ОАМ1 увеличивается. В некоторых вариантах осуществления отношение клеток ДК2 к клеткам ОАМ2 увеличивается. В некоторых вариантах осуществления отношение клеток ДК2 к клеткам ОАМ1 + ОАМ2 увеличивается. В некоторых вариантах осуществления отношение клеток ДК2 к клеткам ОАМ1 + ДК1 увеличивается. В некоторых вариантах осуществления отношение клеток ДК2 к клеткам ДК1 + ОАМ2 увеличивается. В некоторых вариантах осуществления отношение клеток ДК2 к клеткам ДК1 + ОАМ1 + ОАМ2 увеличивается. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере отношение увеличивается на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%.

[0451] В некоторых вариантах осуществления отношение стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам до приведения в контакт составляет от 0,001:1 - 0,1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение стимулирующих миелоидных клеток к нестимулирующим миелоидным клеткам после приведения в контакт составляет от 0,1:1-100:1.

[0452] В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки уменьшаются в количестве. В некоторых вариантах осуществления стимулирующие миелоидные клетки представляют собой клетки ДК2. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки уничтожают, например, путем некроза или апоптоза. В некоторых вариантах осуществления индуцируют остановку роста нестимулирующих миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления нестимулирующие миелоидные клетки больше не пролиферируют. В некоторых вариантах осуществления пространственная локализация нестимулирующих миелоидных клеток изменяется, а их соотношение увеличивается в определенной области ТМЕ. В некоторых вариантах осуществления временная экспрессия нестимулирующих миелоидных клеток изменяется, и соотношение увеличивается в определенное время во время развития опухоли.

[0453] В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляют *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт происходит *in vivo*. В некоторых конкретных вариантах осуществления приведение в контакт осуществляют *in vivo* в организме человека. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляет путем введения антитела к TREM1. В некоторых вариантах осуществления индивидуум, получающий антитело (например, человек), болен раком.

Способы лечения рака

[0454] В еще одном аспекте изобретение обеспечивает способы лечения связанного с иммунной системой патологического состояния (например, способы усиления иммунного ответа или инактивации нестимулирующих миелоидных клеток) у человека, включающие введение человеку эффективного количества композиции, содержащей антитело к TREM1. В некоторых вариантах осуществления способы,

предложенные в данном документе, полезны для лечения рака, и, как таковой, индивидуум, получающий антитело к TREM1 или антитело к TREM1, болен раком.

[0455] Любой подходящий рак можно лечить с помощью антител, предложенных в данном документе. Рак может быть, но не ограничивается этим, любой карциномой, аденокарциномой, мягкими тканями, саркомой, тератомой, меланомой, лейкозом, лимфомой Ходжкина, неходжкинской лимфомой или раком мозга, или любым другим раком, известным в области медицины. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления рак ускользает от иммунологического надзора. В некоторых вариантах осуществления рак является иммунореактивным.

[0456] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой меланому, рак почки, гепатобилиарную карциному, плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ), рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак мочевого пузыря, рак уротелия, глиобластому, рак предстательной железы, рак легкого, рак молочной железы (груди), рак яичников, рак желудка, рак пищевода, рак почек, рак эндометрия, рак шейки матки, рак яичек, меланому, лейкоз, лимфому или мезотелиому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак толстой кишки, рак поджелудочной железы или рак молочной железы.

[0457] В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к уменьшению объема или размера злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления лечение эффективно для уменьшения объема злокачественной опухоли по сравнению с объемом злокачественной опухоли до введения антитела. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к снижению скорости роста злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления лечение эффективно для снижения скорости роста злокачественной опухоли по сравнению со скоростью роста злокачественной опухоли до введения антитела. В некоторых вариантах осуществления лечение эффективно для устранения злокачественной опухоли.

[0458] В некоторых вариантах осуществления связанное с иммунной системой патологическое состояние представляет собой связанное с иммунной системой патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией белка TREM1 на нестимулирующих миелоидных клетках (у человека) или экспрессией гомолога белка TREM1 у отличного от человека вида. В некоторых вариантах осуществления связанное с иммунной системой патологическое состояние представляет собой связанное с иммунной системой патологическое состояние, ассоциированное со сверхэкспрессией белка TREM1 на нестимулирующих миелоидных клетках по сравнению со стимулирующими миелоидными клетками. В некоторых вариантах осуществления сверхэкспрессия мРНК TREM1 или белка TREM1 в около 2 раза, 5 раз, 10 раз, 25 раз, 50 раз или 100 раз выше относительно стимулирующих миелоидных клеток.

[0459] В некоторых вариантах осуществления эти способы дополнительно представлены в комбинации с другими видами сопутствующей терапии, такими как терапия с блокадой PD-1/PD-L1/PD-L2, антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к PD-L2, терапия с блокадой CTLA4, антитела к CTLA-4, терапия с блокадой контрольных точек, при которой блокируются ингибирующие молекулы на Т-клетках, адаптивная Т-клеточная терапия, CAR-Т-клеточная терапия, терапия дендритными клетками или другие клеточные терапии, а также обычные химиотерапии.

[0460] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня экспрессии белка TREM1 в биологическом образце, полученном от индивидуума. В некоторых вариантах осуществления биологический образец включает, но не ограничивается этим, жидкость организма, образец ткани, образец органа, мочу, кал, кровь, слюну, CSF и любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления биологический образец получен из опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии включает уровень экспрессии мРНК, кодирующей белок TREM1. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии белка TREM1 включает уровень экспрессии белка НК. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии белка TREM1 определяют в образце с помощью метода, выбранного из группы, состоящей из проточной цитометрии, вестерн-блота, ИФА, иммунопреципитации, иммуногистохимии, иммунофлуоресценции, радиоиммуноанализа, дот-блоттинга, методов иммунодетекции, ВЭЖХ, поверхностного плазмонного резонанса, оптической спектроскопии, масс-спектрометрии, ВЭЖХ, кПЦР, ОТ-кПЦР, мультиплексной кПЦР или ОТ-кПЦР, РНК-секвенирования, микроматричного анализа, серийного анализа геной экспрессии, метода MassARRAY, флуоресцентной гибридизации *in situ* и их комбинаций.

[0461] В еще одном аспекте, в настоящей заявке представлены способы определения наличия или отсутствия нестимулирующих миелоидных клеток в целом или определения наличия или отсутствия конкретных нестимулирующих миелоидных клеток (например, клеток ДК1, клеток ОАМ1 и/или клеток ОАМ2), включающие: приведение в контакт популяции клеток, включающей нестимулирующие миелоидные клетки, с антителом к TREM1; и количественное определение числа нестимулирующих миелоидных клеток. В другом аспекте, в настоящей заявке представлены способы определения наличия или отсутствия нестимулирующих миелоидных клеток, включающие: приведение в контакт популяции иммунных клеток, включающей нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки, с антителом к TREM1; обнаружение комплекса или молекулы, указывающей на связывание антитела с клеткой, и необязательно количественное определение количества нестимулирующих миелоидных клеток в популяции. В еще одном аспекте представлены способы определения относительного отношения нестимулирующих миелоидных клеток к стимулирующим миелоидным клеткам, включающие: приведение в контакт популяции иммунных клеток, включающей нестимулирующие миелоидные клетки и стимулирующие миелоидные клетки, с антителом к TREM1; количественное определение числа стимулирующих миелоидных клеток и нестимулирующих миелоидных клеток; и определение относительного отношения нестимулирующих миелоидных клеток к стимулирующим миелоидным клеткам.

[0462] В описанных в вариантах осуществления для обнаружения и/или количественного определения, антитело к TREM1 связывается с белком TREM1, но необязательно должно влиять на биологический ответ, такой как АЗКЦ, хотя оно может влиять на биологический ответ.

[0463] В еще одном аспекте настоящее изобретение предоставляет способы идентификации индивидуума, который может ответить на иммунотерапию (например, антителом к TREM1) для лечения связанного с иммунной системой патологического состояния (например, рака), включающий: определение уровня экспрессии белка TREM1 в биологическом образце, полученном от человека; и определение на основании уровня экспрессии белка TREM1, может ли индивидуум ответить на иммунотерапию, где повышенный уровень белка TREM1 у индивидуума по сравнению с уровнем у здорового индивидуума указывает на то,

что индивидуум может ответить на иммунотерапию. В некоторых вариантах осуществления эти способы также могут быть использованы для диагностики связанного с иммунной системой патологического состояния (например, рака) у индивидуума и основаны на уровне экспрессии белка TREM1, где повышенный уровень белка TREM1 у индивидуума по сравнению с таковым у здорового индивидуума указывает на то, что индивидуум страдает от рака. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии включает уровень экспрессии мРНК, кодирующей белок TREM1. В других вариантах осуществления уровень экспрессии белка TREM1 включает уровень экспрессии белка TREM1. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии белка TREM1 определяют в образце с помощью метода, выбранного из группы, состоящей из проточной цитометрии, вестерн-блота, ИФА, иммунопреципитации, иммуногистохимии, иммунофлуоресценции, радиоиммуноанализа, дот-блоттинга, методов иммунодетекции, ВЭЖХ, поверхностного плазмонного резонанса, оптической спектроскопии, масс-спектрометрии, ВЭЖХ, кПЦР, ОТ-кПЦР, мультиплексной кПЦР или ОТ-кПЦР, РНК-секвенирования, микроматричного анализа, серийного анализа геной экспрессии, метода MassARRAY, флуоресцентной гибридизации in situ и их комбинаций. В этих вариантах осуществления антитело к TREM1 связывается с белком TREM1, но не обязательно должно влиять на биологический ответ, такой как АЗКЦ. В некоторых вариантах осуществления биологический образец получен из опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления биологический образец включает, но не ограничивается этим, жидкость организма, образец ткани, образец органа, мочу, кал, кровь, слюну, CSF и любую их комбинацию.

[0464] Также в данном документе описан способ усиления иммунного ответа субъекта на опухоли или повышения эффективности иммунотерапии. В целом, лечение, которое увеличивает количество СДК, улучшит исход для пациента, например, время безрецидивной выживаемости, и повысит эффективность противораковой иммунотерапии. Лечение может увеличить относительное или абсолютное количество клеток СДК в опухоли субъекта. Лечение может снизить относительное или абсолютное количество клеток НМК в опухоли субъекта.

[0465] Иллюстративные способы общей стратегии лечения включают увеличение количества СДК путем системного введения Flt3L. Еще один способ заключается в лечении аутологичного костного мозга или клеток крови субъекта Flt3L при одновременном блокировании CSF1. Экспрессия, например, при помощи ретровируса, факторов транскрипции СДК, таких как IRF8, Myc11 или BATF3 или ZBTB46 в популяциях клеток-предшественников костного мозга или крови также может быть использована для стимулирования развития СДК. Еще одна стратегия лечения включает систематическую элиминацию уничтожение клеток НМК при селективном сохранении СДК. Это может привести к общему благоприятному изменению соотношения этих популяций. Элиминация клеток НМК может быть достигнуто любым способом, включая введение (системное или локализованное в опухоли) антител против поверхностных белков TREM1.

[0466] В некоторых вариантах осуществления методы лечения, усиливающие СДК, применяются в качестве терапевтического лечения, чтобы лучше задействовать собственную иммунную систему субъекта в борьбе с раком или его устранении. В еще одном варианте осуществления методы лечения, усиливающие СДК, по данному изобретению применяются в сочетании с терапевтическим лечением, таким как иммунотерапия (такое применение проводится до, одновременно с или после иммунотерапии), при этом

методы лечения, усиливающие СДК, действуют как вспомогательное или адъювантное лечение для повышения эффективности терапевтического лечения.

Способы введения

[0467] В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе способы полезны для лечения связанного с иммунной системой патологического состояния у человека. В одном варианте осуществления индивидуум представляет собой человека, а антитело представляет собой антитело к TREM1. В еще одном варианте осуществления индивидуум представляет собой мышь, а антитело представляет собой антитело к TREM1.

[0468] В некоторых вариантах осуществления антитело вводят внутривенно, внутримышечно, подкожно, местно, перорально, трансдермально, интраперитонеально, интраорбитально, путем имплантации, путем ингаляции, интратекально, интравентрикулярно или интраназально. Для лечения рака может быть введено эффективное количество антитела к TREM1. Подходящая доза антитела к TREM1 может быть определена на основании типа рака, подлежащего лечению, типа антитела к TREM1, степени тяжести и течения рака, клинического состояния человека, истории болезни и ответа человека на лечение, а также по усмотрению лечащего врача.

Комбинированные терапии

[0469] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, вводится по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом. Любой подходящий дополнительный терапевтический или иммунотерапевтический агент может быть введен вместе с антителом, представленным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия выбрана из ингибитора контрольной точки; ингибитора контрольной точки Т-клеток; антитела к PD1; антитела к PDL1; антитела к CTLA4; адаптивной клеточной терапии; адаптивной Т-клеточной терапии; CAR-Т-клеточной терапии; вакцины из дендритных клеток; агониста STING; моноцитарной вакцины; вакцины бацилл Кальметта-Герена; антигенсвязывающего белка, который связывает как Т-клетку, так и антигенпрезентирующую клетку; двойного антигенсвязывающего белка BiTE; лиганда толл-подобного рецептора; цитокина; цитотоксической терапии; химиотерапии; лучевой терапии; низкомолекулярного ингибитора; низкомолекулярного агониста; иммуномодулятора; онколитического вируса; и эпигенетического модулятора, а также их комбинаций.

[0470] В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело, которое связывает белок или белки на поверхности опухолевой клетки.

[0471] Для лечения рака антитело к TREM1 может быть комбинировано с одним или более антителами, которые ингибируют белки иммунных контрольных точек. Особый интерес представляют белки иммунных контрольных точек, которые экспонируются на поверхности опухолевой клетки. Рецепторы иммунных контрольных точек, которые наиболее активно изучались в контексте клинической противораковой иммунотерапии, цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 4 (CTLA4; также известный как CD152) и белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD1; также известный как CD279), являются

ингибирующими рецепторами. Клиническая активность антител, которые блокируют любой из этих рецепторов, предполагает, что противоопухолевый иммунитет может быть усилен на нескольких уровнях и что комбинаторные стратегии могут быть разумно разработаны, руководствуясь механистическими соображениями и доклиническими моделями.

[0472] 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, связываясь со своим рецептором PD-1 на Т-клетках, ингибирует активацию/функцию Т-клеток. Ингибиторы, которые блокируют взаимодействие PD-1 с его когнатными лигандами на раковых клетках, PD-L1 и PD-L2, могут привести как к повышению активации и функции Т-клеток, так и к предотвращению уклонения раковых клеток от иммунной системы.

[0473] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия представляет собой агент, который препятствует связыванию PD-1 и PD-L1 или PD-L2. В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия представляет собой антитело к PD1. В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия представляет собой антитело к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия представляет собой антитело к PD-L2.

[0474] Различные антитела PD-1, PD-L1 и PD-L2 известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой по меньшей мере одно из: атезолизумаба (PD-L1), авелумаба (PD-L1), дурвалумаба (PD-L1), ниволумаба (PD-1), пембролизумаба (PD-1), цемиплимаба (PD-1), ипилимумаба (CTLA-4), тремелиумаба (CTLA-4) или любой их комбинации.

[0475] Дополнительный терапевтический агент может быть введен любым подходящим способом. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, и дополнительный терапевтический агент включены в одну и ту же фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, и дополнительный терапевтический агент включены в различные фармацевтические композиции.

[0476] В вариантах осуществления, когда антитело, представленное в данном документе, и дополнительный терапевтический агент включен в различные фармацевтические композиции, введение антитела может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления введение антитела, представленного в данном документе, и дополнительного терапевтического агента происходит в течение около одного месяца друг после друга. В некоторых вариантах осуществления введение антитела, представленного в данном документе, и дополнительного терапевтического агента происходит в течение около одной недели друг после друга. В некоторых вариантах осуществления введение антитела, представленного в данном документе, и дополнительного терапевтического агента происходит в течение около одного дня друг после друга. В некоторых вариантах осуществления введение антитела, представленного в данном документе, и дополнительного терапевтического агента происходит в течение около двенадцати часов друг после друга. В некоторых вариантах осуществления введение антитела, представленного в данном документе, и дополнительного терапевтического агента происходит в течение около одного часа друг после друга.

Наборы и изделия

[0477] В настоящей заявке представлены наборы, содержащие любую одну или более композиций антител, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно содержат компонент, выбранный из любого из вторичных антител, реагентов для иммуногистохимического анализа, фармацевтически приемлемого эксципиента и инструкции по применению, а также любой их комбинации. В одном конкретном осуществлении набор содержит фармацевтическую композицию, содержащую любую одну или более композиций антител, описанных в данном документе, с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

[0478] В настоящей заявке также представлены изделия, содержащие любую из композиций антител или наборов, описанных в данном документе. Примеры изделий включают флаконы (в том числе герметичные флаконы).

Дополнительные варианты осуществления

[0479] Ниже приведены абзацы, перечисляющие конкретные варианты осуществления изобретения.

[0480] Выделенное антитело, которое связывается с TREM1 человека (SEQ ID NO: 1), содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность варибельной области тяжелой цепи (VH), состоящую из трех последовательностей CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и легкую цепь, содержащую последовательность варибельной области легкой цепи (VL), состоящую из трех последовательностей CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где:

- a. CDR-H1 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23,
- b. CDR-H2 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24,
- c. CDR-H3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33,
- d. CDR-L1 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26,
- e. CDR-L2 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27, и
- f. CDR-L3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28.

[0481] Выделенное антитело по п. 1, в котором последовательность цепи VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 17, а последовательность цепи VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.

[0482] Выделенное антитело по п. 1, в котором последовательность цепи VH включает последовательность VH, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 16, 17 или 18; и последовательность цепи VL включает последовательность VL, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 20, 21 или 22.

[0483] Выделенное антитело по п. 1, в котором антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 34 и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 35.

[0484] Выделенное антитело по п. 1, в котором последовательность цепи VH состоит из последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 17; и последовательности цепи VL состоит из последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 20.

[0485] Выделенное антитело по п. 1, в котором последовательность цепи VH состоит из последовательности VH, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 16, 17 или 18; и

последовательности цепи VL состоит из последовательности VL, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 20, 21 или 22.

[0486] Выделенное антитело по п. 1, в котором антитело состоит из последовательности тяжелой цепи, указанной в SEQ ID NO: 34 и последовательности легкой цепи, указанной в SEQ ID NO: 35.

[0487] Выделенное антитело по п. 1, в котором антитело является афукозилированным, и где последовательность цепи VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 17, а последовательность цепи VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.

[0488] Выделенное антитело по п. 1, в котором антитело является афукозилированным, и где последовательность цепи VH включает последовательность VH, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 16, 17 или 18; и последовательность цепи VL включает последовательность VL, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 20, 21 или 22.

[0489] Выделенное антитело по п. 1, в котором антитело является афукозилированным, и антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 34 и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 35.

[0490] Выделенное антитело по п. 1, в котором антитело является афукозилированным, и где последовательность цепи VH состоит из последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 17, а последовательность цепи VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.

[0491] Выделенное антитело по п. 1, в котором антитело является афукозилированным, и где последовательность цепи VH состоит из последовательности VH, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 16, 17 или 18; и последовательность цепи VL включает последовательность VL, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 20, 21 или 22.

[0492] Выделенное антитело по п. 1, в котором антитело является афукозилированным, и антитело состоит из последовательности тяжелой цепи, указанной в SEQ ID NO: 34 и последовательности легкой цепи, указанной в SEQ ID NO: 35.

[0493] Выделенное антитело по п. 1, в котором антитело является афукозилированным.

[0494] Выделенное антитело по п. 1, в котором антитело включает активный человеческий Fc.

[0495] Выделенное антитело по п. 15, в котором человеческий Fc представляет собой Fc человеческого IgG1 дикого типа.

[0496] Выделенное антитело по п. 1, в котором антитело является афукозилированным и содержит Fc человеческого IgG1 дикого типа, и где последовательность цепи VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 17, а последовательность цепи VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.

[0497] Выделенное антитело по п. 1, в котором антитело связывается с человеческим TREM1 с KD меньше или равной около 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7×10^{-9} М по данным анализа методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

[0498] Выделенное антитело по п. 1, в котором антитело является гуманизированным.

[0499] Способ получения антитела, включающий проведение экспрессии антитела по п. 1 с использованием клетки-хозяина и выделение экспрессированного антитела.

[0500] Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по п. 1 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0501] Набор, содержащий антитело по п. 1 и инструкции по применению.

[0502] Выделенное антитело, которое связывается с TREM1 человека (SEQ ID NO: 1), содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), состоящую из трех последовательностей CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и легкую цепь, содержащую последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), состоящую из трех последовательностей CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где:

- a. CDR-H1 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23,
- b. CDR-H2 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24,
- c. CDR-H3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 32,
- d. CDR-L1 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26,
- e. CDR-L2 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27, и
- f. CDR-L3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28.

[0503] Выделенное антитело по п. 23, в котором последовательность цепи VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 13, а последовательность цепи VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.

[0504] Выделенное антитело по п. 23, в котором антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 36 и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 37.

[0505] Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по п. 23 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0506] Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту антитела, конкурирующего за связывание с TREM1 человека (SEQ ID NO: 1) с эталонным антителом, содержащим тяжелую цепь, содержащую последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и легкую цепь, содержащую последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где:

- a. CDR-H1 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23,
- b. CDR-H2 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24,
- c. CDR-H3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33,
- d. CDR-L1 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26,
- e. CDR-L2 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27, и
- f. CDR-L3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28.

[0507] Способ по п. 27, в котором субъект ранее получал, получает или будет получать иммунотерапию, где иммунотерапия представляет собой по меньшей мере одно из: ингибитора контрольной точки; ингибитора контрольной точки Т-клеток; антитела к PD1; антитела к PDL1; антитела к CTLA4; адаптивной Т-клеточной терапии; CAR-Т-клеточной терапии; вакцины из дендритных клеток; монокитарной вакцины; антигенсвязывающего белка, который связывает как Т-клетку, так и антигенпрезентирующую клетку; двойного антигенсвязывающего белка BiTE; лиганда толл-подобного рецептора; цитокина; цитотоксической

терапии; химиотерапии; лучевой терапии; низкомолекулярного ингибитора; низкомолекулярного агониста; иммуномодулятора; и эпигенетического модулятора.

[0508] Способ по п. 28, в котором иммунотерапия представляет собой антитело к PD1, антитело к PDL1 или антитело к CTLA4.

[0509] Способ повышения иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту антитела, конкурирующего за связывание с TREM1 человека (SEQ ID NO: 1) с эталонным антителом, содержащим тяжелую цепь, содержащую последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и легкую цепь, содержащую последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где:

- a. CDR-H1 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23,
- b. CDR-H2 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24,
- c. CDR-H3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33
- d. CDR-L1 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26,
- e. CDR-L2 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27, и
- f. CDR-L3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28.

Примеры

[0510] Ниже приведены примеры конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения. Примеры являются исключительно иллюстративными и никоим образом не подразумевают ограничения объема данного изобретения. Были приняты меры для того, чтобы сохранить точность в отношении используемых чисел (например, количеств, значений температуры и т.д.), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения.

[0511] В практике по настоящему изобретению будут использоваться, если не указано иное, стандартные методы химии белков, биохимии белков, методы рекомбинантной ДНК и фармакологии, доступные специалистам в данной области техники. Такие методы подробно описаны в литературе. См., например, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry 3rd Ed.* (Plenum Press) Vols A and B(1992).

Пример 1. Секвенирование и гуманизация антитела к TREM1

[0512] Моноклональный мышинный клон IgG1 TREM-26, специфичный для TREM1 человека, был получен и использован для определения последовательности и гуманизации. Вкратце, дисульфидные связи в антителе восстанавливали дитиотреитолом (ДТТ), а свободные сульфгидрильные группы алкилировали йодоацетамидом. Алкилированное антитело расщепляли эндопротеиназами пригодной для секвенирования степени чистоты, очищали с помощью спин-колонок и определяли последовательность с помощью анализа методом ЖХ-МС/МС (см. ниже).

[0513] Химерное антитело (PI-4026) было сконструировано путем встраивания областей VL и VH мышиного антитела к константным областям IgG1 человека. Химера была дополнительно гуманизирована путем клонирования CDR антитела в каркас переменного домена человека, и было получено десять дополнительных гуманизированных вариантов с различными каркасными мутациями, 4 варианта VH и 4 варианта VL (PI-4026-1-10).

[0514] Последовательности VH и VL сравнивались с библиотеками известных последовательностей зародышевой линии человека на сайте NCBI (ncbi.nlm.nih.gov/igblast/; Ye, J. et al. Nucleic Acids Research 41:W34-W40 (2013)). Использовали базы данных IMGT генов VH человека (F+ORF, 273 последовательности зародышевой линии) и IMGT генов VLкаппа человека (F+ORF, 74 последовательности зародышевой линии).

[0515] Для VH гуманизированного PI-4026 человеческая зародышевая линия IGHV1-46 (аллель 1) была выбрана в качестве акцепторной последовательности, а область присоединения человеческой тяжелой цепи IGHJ4 (аллель 1) (J-сегмент гена) была выбрана из человеческих последовательностей области присоединения, собранных на IMGT®, международная информационная система ImMunoGeneTics® www.imgt.org (основатель и директор: Мари-Поль Лефранк, Монпелье, Франция).

[0516] Для VL гуманизированного PI-4026 человеческая зародышевая линия IGKV1-39 (аллель 1) была выбрана в качестве акцепторной последовательности, а область присоединения человеческой легкой цепи IGKJ2 (аллель 1) (ген J) была выбрана из последовательностей присоединяющейся области человека, собранных на IMGT®, международная информационная система ImMunoGeneTics® www.imgt.org (основатель и директор: Мари-Поль Лефранк, Монпелье, Франция).

[0517] CDR были определены в соответствии с определением AbM (см. сайт Dr. Andrew C. R. Martin www.bioinf.org.uk/abs/ для таблицы, в которой сравниваются определения CDR). Изменение положений каркаса зародышевой линии человека (т.е. отличных от CDR остатков в VH и VL) до соответствующей исходной мышиной последовательности использовали, например, для оптимизации связывания гуманизированного антитела.

[0518] В таблице 1А показаны последовательности VH и VL созданных гуманизированных версий мкАт PI-4026. VH-1 4026 и VL-1 4026 являются исходными, гуманизированными клонами VH и VL, из которых были созданы другие гуманизированные версии посредством дополнительных каркасных мутаций. Были созданы три гуманизированных клон областей VH (VH-2, VH-3, VH-4 4026) и VL (VL-2, VL-3, VL-4 4026). В таблице 1В представлены последовательности CDR.

Таблица 1А			
SEQ ID NO	Название	Последовательность	
	4026 VH-1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYVINWVRQAPGQGLEWMGEI YPGSGSTFYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARRMAAM DYWGQGTLVTVSS	
	4026 VH-2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYVINWVRQAPGQGLEWMGEI YPGSGSTFYAQKFQGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTRRMAAM DYWGQGTLVTVSS	

	4026 VH-3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWVRQAPGQGLEWIGEIY PGSGSTFYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCTRRMAAMD YWGQGTLLTVSS
	4026 VH-4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWVRQAPGQGLEWIGEIY PGSGSTFYAQKFQGRATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCTRRMAAMD YWGQGTLLTVSS
	VL-1 4026	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMHWYQQKPGKAPKLLIYTTSNLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQWSGYPTFGQGGTKLEIK
	VL-2 4026	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMHWYQQKPGKAPKLLIYTTSNLA SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCHQWSGYPTFGQGGTKLEIK
	VL-3 4026	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMHWYQQKPGKAPKLLIYTTSNLA SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISVQPEDFATYYCHQWSGYPTFGQGGTKLEIK
	VL-4 4026	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMHWYQQKPGKAPKLLIYTTSNLA SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISVQPEDAATYYCHQWSGYPTFGQGGTKLEIK

Таблица 1С – CDR гуманизированных антител

Таблица 1В		
SEQ ID NO	Название	Последовательность
	CDR H1	GYTFTDYVIN
	CDR H2	EIYPGSGSTF
	CDR H3	RMAAMDY
	CDR L1	SASSSVSYMH
	CDR L2	TTSNLAS
	CDR L3	HQWSGYPT

[0519] Десять гуманизированных вариантов антитела к TREM1 были созданы с использованием различных каркасных мутаций. В **таблице 1С** показано количество каркасных мутаций и пары тяжелых и легких цепей, использованные в каждом гуманизированном варианте.

Таблица 1С			
мкАт	Число каркасных мутаций (VH +VL)	Используемые VH	Используемые VL
PI-4026 (химерное)	Н/Д	Н/Д	Н/Д

PI-4026-1	0 (Только замена CDR)	1	1
PI-4026-2	5	2	2
PI-4026-3	8	2	3
PI-4026-4	9	2	4
PI-4026-5	11	3	2
PI-4026-6	14	3	3
PI-4026-7	15	3	4
PI-4026-8	12	4	2
PI-4026-9	15	4	3
PI-4026-10	16	4	4

Пример 2. Получение и определение характеристик антител к TREM1

Получение и определение характеристик антител

[0520] Векторы экспрессии тяжелых и легких цепей были трансфицированы в клетки expi293 с использованием стандартных методов. Клетки выращивали до 7 дней, после чего для очистки от антител собирали супернатанты. В дополнение к expi293, антитела также были получены в клетках expi293, которые были лишены α 1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) млекопитающих путем редактирования CRISPR/Cas9 (Александр Вайс, Университет Торонто). pH супернатанта корректировали с помощью 1M HEPES pH 7,4 и добавляли азид натрия для предотвращения роста микроорганизмов. Для захвата белков использовали смола KanCar A, а антитела элюировали 50 mM цитрата, pH 3,5, 100 mM NaCl после промывки PBS и PBS, содержащим 1 M NaCl. Сразу после элюирования раствор нейтрализовали 1 M Трис (pH 8), содержащим 0,5 M аргинина. Определение биофизических характеристик проводили на белке, для которого был выполняли замену буфера на PBS с использованием стандартных методик. Количественное определение белка проводили по ОП280, количество и концентрацию определяли по рассчитанному коэффициенту экстинкции. ДСН-ПААГ-электрофорез в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях (Biorad criterion Трис/глицин/ДСН, 4-20%) или систему для капиллярного электрофореза Perkin Elmer GXII использовали для определения чистоты и приблизительной молекулярной массы. Состояние агрегации определяли методом УВЭЖХ с детекцией при 280 нм с использованием колонки для эксклюзионной хроматографии Sepax Zenix-C SEC-300, 3um, 300Å, 4,6*150 мм, и буфера PBS.

Измерение К_д avidности для человека с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР)

[0521] Аффинность связывания TREM1 человека с вариантами PI-4026 измеряли методом ППР на приборе BIAcore T200 (GE Healthcare, Великобритания). Все данные были собраны при температуре 25°C. 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% (v/v) ПАВ P20 использовали в качестве подвижного буфера и для всех разведений мкАт. Антимышиный Fc был иммобилизован на биосенсорном чипе CM4 (GE Healthcare) с помощью стандартной химии сочетания с аминокислотой. Человеческий химерный Fc mIgG к TREM1 фиксировали на одной проточной кювете, а другая проточная кювета (используемая в качестве

контрольной поверхности) оставалась пустой. Диапазон концентраций вариантов PI-4026 (в качестве аналита, все изотипы hIgG1) вводили через обе проточные кюветы в нескольких циклах. После каждого цикла поверхность восстанавливали путем введения глицин-HCl буфера (10 mM, pH 2,0). Для проведения кинетической оценки использовали программное обеспечение BIAevaluation. Кинетическую оценку проводили путем построения сенсограмм, которые были аппроксимировали моделью связывания Ленгмюра 1:1.

Измерение K_D человеческой мономерной формы с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР)

[0522] Аффинность связывания TREM1 человека с вариантами PI-4026 измеряли методом ППР на приборе BIAcore T200 (GE Healthcare, Великобритания). Все данные были собраны при температуре 25°C. 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% (v/v) ПАВ P20 использовали в качестве подвижного буфера и для всех разведений мкАт. Античеловеческий Fc был иммобилизован на биосенсорном чипе CM4 (GE Healthcare) с помощью стандартной химии сочетания с аминогруппой. Варианты PI-4026 (все изотипы hIgG1) захватывали античеловеческим Fc на одной проточной кювете, а другая проточная кювета (используемая в качестве контрольной поверхности) оставалась пустой. Диапазон концентраций TREM1 человека с His-меткой (в качестве аналита) вводили через проточные кюветы с захваченными вариантами PI-4026 и контрольную кювету в нескольких циклах. После каждого цикла поверхность регенерировали путем введения 3M $MgCl_2$. Для проведения кинетической оценки использовали программное обеспечение BIAevaluation. Кинетическую оценку проводили путем построения сенсограмм, которые были аппроксимировали моделью связывания Ленгмюра 1:1.

Дифференциальная сканирующая флуориметрия

[0523] Температуры плавления вариантов PI-4026 были определены с помощью нанодифференциальной сканирующей флуориметрии (ДСФ). Образцы варианта PI-4026 обрабатывали со скоростью изменения в 1,5 °C/мин от 20 °C до 100 °C. Образцы загружали в капилляры класса наноДСФ путем погружения в образец. Чтобы минимизировать испарение во время теплового сканирования, оба конца капилляра были запечатаны инертной уплотняющей пастой из жидкой резины на основе масла.

[0524] T_m рассчитывали по изменению интенсивности флуоресценции триптофана или соотношению эмиссии триптофана при 350 и 330 нм, которые точно отслеживают конформационные изменения при разворачивании белка в зависимости от температуры. T_m представляет собой температуру, при которой белок разворачивается на 50%.

Связывание клеток

[0525] Контрольные клетки HEK293 в логарифмической фазе роста собирали из культуры, промывали и высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном из расчета 1×10^5 клеток/луночка. Титры указанных вариантов PI-4026 и изотипического контроля добавляли в клетки и инкубировали в течение 30 минут на льду. Для выявления связанного первичного антитела использовали конъюгированное с Alexa 647 вторичное антитело к Fc γ человека (Jackson ImmunoResearch), разведенное в соотношении 1:500. Вторичное антитело инкубировали с клетками в течение 30 минут на льду. Затем клетки промывали и окрашивали Zombie NIR (Biolegend) для определения жизнеспособности клеток в течение 15 минут при комнатной температуре.

Флуоресцентный сигнал от связанного антитела оценивали с помощью проточной цитометрии (ThermoFisher Attune NxT).

Результаты

[0526] В таблице 2 приведены результаты авидности антител, аффинности мономерной формы, связывания с клетками и ДСФ для каждого из гуманизированных антител к TREM1.

Таблица 2						
Анти- hTREM1 мкАт	Авидность K_D (нМ)	Мономерная форма, K_D (нМ)	Мономерная форма, « K_{off} » (М)	Фоновое связывание	EC_{50} (нМ), Нейтрофилы	ДСФ ($Tm2$, °C)
Химерное PI-4026	<0,1	1,13	4.92e-4	N	0,46	-
PI-4026-1	Плохое соответствие	Плохое соответствие	Плохое соответствие	Y	3,25	-
PI-4026-2	<0,1	2,65	1.04e-3	N	0,33	-
PI-4026-3	<0,1	2,42	1.11e-3	N	0,30	-
PI-4026-4	<0,1	3,63	1.60e-3	N	0,27	-
PI-4026-5	<0,1	2,01	4.38e-4	N	0,21	82,73
PI-4026-6	<0,1	1,55	6.99e-4	N	0,26	82,47
PI-4026-7	<0,1	2,31	7.84e-4	N	0,19	76,17
PI-4026-8	<0,1	2,51	5.17e-4	Y	0,22	-
PI-4026-9	<0,1	2,83	5.19e-4	Y	0,17	-
PI-4026-10	<0,1	2,77	8.34e-4	Y	0,20	-

[0527] На основании полученных результатов PI-4026-5 был выбран для дальнейшего определения характеристик и тестирования.

[0528] Далее аффинность связывания TREM1 человека с PI-4026-5 была измерена методом ППР на приборе BIAcore T200 (GE Healthcare). Все данные были собраны при температуре 25 °C. 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% (v/v) ПАВ P20 использовали в качестве подвижного буфера и разведений PI-4026-5. Антимышиный Fc был иммобилизован на биосенсорном чипе CM4 (GE Healthcare) с помощью стандартной химии сочетания с аминогруппой. Человеческий химерный Fc mIgG к TREM1 фиксировали на одной проточной кювете, а другая проточная кювета, используемая в качестве контрольной поверхности, оставалась пустой. Диапазон концентраций PI-4026-5 вводили через обе проточные кюветы в нескольких циклах. После каждого цикла поверхность восстанавливали путем введения глицин-HCl буфера (10 mM, pH 2,0). Для проведения кинетической оценки использовали программное обеспечение

BIAevaluation. Кинетическую оценку проводили путем построения сенсограмм, которые были аппроксимировали моделью связывания Ленгмюра 1:1.

[0529] Кинетика связывания PI-4026-5 показана на **Фиг. 1** методом ППР.

Пример 3. Клеточное связывание антитела к TREM1

Видовая специфичность гуманизированных антител к TREM1

Сверхэкспрессирующие hTREM1 клетки

[0530] Контрольные клетки HEK293 или сверхэкспрессирующие человеческий TREM1 клетки в логарифмической фазе роста собирали из культуры, промывали и высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном из расчета 1×10^5 клеток/лунка. Титры неконъюгированного контроля hIgG1 или антител PI-4026-5 в указанных концентрациях добавляли к клеткам и инкубировали в течение 30 мин на льду. Для выявления связанного первичного антитела использовали конъюгированное с Alexa 647 вторичное антитело к Fc γ человека (Jackson ImmunoResearch), разведенное в соотношении 1:500. Вторичное антитело инкубировали с клетками в течение 30 минут на льду. Затем клетки промывали и окрашивали Zombie NIR (Biolegend) для определения жизнеспособности клеток в течение 15 минут при комнатной температуре. Флуоресцентный сигнал от связанного антитела оценивали с помощью проточной цитометрии (ThermoFisher Attune NxT). Значения EC50 были рассчитаны с использованием программного обеспечения Prism (Graphpad).

Сверхэкспрессирующие CynoTREM1 и mTREM1 клетки

[0531] Сверхэкспрессирующие HEK293 яванского макака или TREM1 мыши в логарифмической фазе роста собирали из культуры, промывали и высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном из расчета 1×10^5 клеток/лунка. Титры неконъюгированного контроля hIgG1 или антител PI-4026-5 в указанных концентрациях добавляли к клеткам и инкубировали в течение 30 мин на льду. Для выявления связанного первичного антитела использовали конъюгированное с Alexa 647 вторичное антитело к Fc γ человека (Jackson ImmunoResearch), разведенное в соотношении 1:500. Вторичное антитело инкубировали с клетками в течение 30 минут на льду. Затем клетки промывали и окрашивали Zombie NIR (Biolegend) для определения жизнеспособности клеток в течение 15 минут при комнатной температуре. Флуоресцентный сигнал от связанного антитела оценивали с помощью проточной цитометрии (ThermoFisher Attune NxT). Значения EC50 были рассчитаны с использованием программного обеспечения Prism (Graphpad).

Клеточное связывание

[0532] В свежей крови доноров людей (Стэнфордский центр крови) лизировали эритроциты и промывали ее для обогащения МКПК и гранулоцитами. Клетки высевали, а Fc-рецепторы блокировали с помощью комбинации человеческой сыворотки (Jackson ImmunoResearch), FcX человека (Biolegend) и раствора для блокировки FcR на основе пептидов (Innovex Biosciences). Клетки также окрашивали с помощью Zombie NIR (Biolegend) для определения жизнеспособности клеток. После окрашивания Zombie NIR клетки окрашивали с помощью коктейля для проточной цитометрии, включающего маркеры для основных субпопуляций иммунных клеток, и титрами или контрольного IgG1 человека, или PI-4026-5. Все используемые антитела были непосредственно конъюгированы. Данные были получены с помощью проточной цитометрии

(ThermoFisher Attune NxT). Значения EC50 были рассчитаны с использованием программного обеспечения Prism (Graphpad).

Результаты

[0533] Как показано на **Фиг. 2А** и **2В**, PI-4026-5 связывается с клетками, сверхэкспрессирующими TREM1 человека, с высокой специфичностью, но не связывается с клетками, которые не сверхэкспрессируют TREM1 человека. Кроме того, PI-4026-5 связывается с нейтрофилами и моноцитами в периферической крови человека (**Фиг. 3А** и **3В**).

[0534] Для подтверждения видовой специфичности гуманизированных антител к TREM1 оценивали связывание PI-4026-5 с TREM1 яванского макака и мыши.

[0535] Как показано на **Фиг. 4А** и **4В**, PI-4026-5 связывается клетками, которые сверхэкспрессируют TREM1 яванского макака, но не TREM1 мыши.

Пример 4. Индукция АЗКЦ и АЗКФ при помощи антител к TREM1

Анализ АЗКЦ и АЗКФ

[0536] Клетки-мишени HEK293, сверхэкспрессирующие TREM1 человека, инкубировали с титром PI-4026-5 или изотипического контроля hIgG1 в указанных концентрациях в плоскодонных белых 96-луночных планшетах (ThermoFisher). После 15-минутной инкубации при комнатной температуре экспрессирующие hCD16 или hCD32 клетки Jurkat с NFAT-управляемым репортерным геном люциферазы (Promega, Мэдисон, штат Висконсин), добавляли к смеси целевых клеток и антител в соотношении 3:1. После добавления репортерных клеток для анализа инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 6 ч. Уровень люциферазной активности определяли путем воздействия на субстрат люциферазы (Promega, Мэдисон, штат Вашингтон) и определяли с помощью люминесцентного ридера (EnVision, Perkin Elmer). Значения EC50 были рассчитаны с использованием программного обеспечения Prism (Graphpad).

[0537] ЗФБ-положительные исходные клетки epxi293 или клетки, сверхэкспрессирующие TREM1 человека, инкубировали с титрами неконъюгированного контроля hIgG1 или антител PI-4026-5 в течение 15-30 мин при комнатной температуре. Не отмывая, человеческие макрофаги, поляризованные из CD14+ моноцитов, меченных Cell Trace Violet (ThermoFisher), затем добавляли к смеси epxi293 и антител в соотношении 1:1. Образец инкубировали в течение 6 часов при 37 °C в атмосфере 5% CO₂, после чего образец оценивали с помощью проточной цитометрии (ThermoFisher Attune NxT). АЗКФ измеряли путем подсчета количества ЗФБ-положительных и Cell Trace Violet-положительных макрофагов из синглетного гейта. Значения EC50 были рассчитаны с использованием программного обеспечения Prism (Graphpad).

Результаты

[0538] Как показано на **Фиг. 5А** и **5В**, PI-4026-5 индуцирует опосредованный сигналинг FcγR в дозозависимым, специфичным для TREM1 образом. На **Фиг. 5А** показана индукция сигналинга FcγR с помощью репортерной системы hCD16, а на **Фиг. 5В** показана индукция сигналинга FcγR с помощью системы для анализа гена hCD32.

[0539] Далее была оценена способность гуманизированного антитела к TREM1 индуцировать АЗКФ первичными макрофагами человека.

[0540] Как показано на **Фиг. 6А** и **6В**, PI-4026-5 индуцирует АЗКФ первичными макрофагами человека из клеток eхpі293, сверхэкспрессирующих hTREM1 (**Фиг. 6В**), но не исходными клетками eхpі293 (**Фиг. 6А**).

Пример 5. Кристаллизация химеры Fab PI-4026 с IgV к TREM1 человека

Кристаллизация белков

[0541] Кристалл надлежащего для дифракции качества очищенного при помощи ЭХ комплекса hTREM1 IgV: химера Fab PI-4026 были получены методом диффузии паров в сидячей капле при 20°C. Кристаллы подвергали криозащите, а данные рентгеновской дифракции были собраны на Европейском центре синхротронного излучения (ESRF) в Гренобле, Франция. Структура комплекса IgV к hTREM1: Fab PI-4026 была определена методом молекулярного замещения с помощью программы MOLREP в CCP4. Конечная модель была уточнена до Rwork и Rfree 16,4% и 21,6%, соответственно, при разрешении 1,93 Å. Анализ конечной уточненной структуры показал, что один Fab к PI-4026 взаимодействует с одной молекулой IgV к TREM1.

Результаты

[0542] На **Фиг. 7А-Е** показано взаимодействие конкретных остатков в каждом CDR Fab PI-4026 с конкретными остатками домена IgV к TREM1. На каждой панели темно-серая структура представляет CDR указанного антитела, а светло-серая структура представляет домен IgV к TREM1. Взаимодействующие остатки обозначены однобуквенной аминокислотной номенклатурой с последующим указанием их положения в последовательности TREM1 человека, тяжелой или легкой цепи PI-4026. Пунктирными линиями обозначены водородные связи между остатками CDR и остатками IgV к TREM1. Числа, связанные с пунктирными линиями, представляют собой расстояния между остатками, измеренные в ангстремах (Å). CDRL2 Fab PI-4026 не был критичен для взаимодействия с доменом IgV к TREM1. Все фигуры и взаимодействия были созданы и смоделированы с помощью программного обеспечения PyMOL.

[0543] На **Фиг. 7А** показано взаимодействие остатков в CDRH1 Fab PI-4026 и домена IgV к TREM1. На **Фиг. 7В** показано взаимодействие остатков в CDRH2 Fab PI-4026 и домена IgV к TREM1. На **Фиг. 7С** показано взаимодействие остатков в CDRH3 Fab PI-4026 и домена IgV к TREM1. На **Фиг. 7D** показано взаимодействие остатков в CDRL1 Fab PI-4026 и домена IgV к TREM1. На **Фиг. 7Е** показано взаимодействие остатков в CDRL3 Fab PI-4026 и домена IgV к TREM1.

[0544] Эпитопная последовательность химерного антитела PI-4026 представляет собой несмежные остатки, охватывающие аминокислоты 21–34 (SEQ ID NO: 42), 103–109 (SEQ ID NO: 43), и 128–136 (SEQ ID NO: 44) TREM1 человека.

Пример 6. Мутация CDRH3 для снижения риска окисления и определения характеристик мкАт с вариантной CDRH3

Оценка окисления H₂O₂ с помощью эксклюзионной хроматографии (ЭХ)

[0545] Анализ окисления проводили путем инкубации вариантов PI-4026-5 и PI-4026-7 в указанных концентрациях H₂O₂ в течение 1 ч при 40 °С при конечной концентрации антител 1 мг/мл. Образцы анализировали методом ЭХ в различных концентрациях и временных точках с использованием аналитической системы УВЭЖХ ThermoFisher на колонке Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare).

В качестве буфера подвижной фазы использовали PBS pH 7,4, скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Данные анализировали и интегрировали AUC пиков на уровне A280 с помощью программного обеспечения Chromeleon 7 (ThermoFisher).

Авидность для яванского макака, KD

[0546] Аффинность связывания TREM1 яванского макака с вариантами PI-4026-5 измеряли методом ППР на приборе BIAcore T200 (GE Healthcare). Все данные были собраны при температуре 25°C. 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% (v/v) ПАВ P20 использовали в качестве подвижного буфера и для всех разведений мкАт. Антимышиный Fc был иммобилизован на биосенсорном чипе CM4 (GE Healthcare) с помощью стандартной химии сочетания с аминогруппой. Химерная Fc mIgG к TREM1 яванского макака фиксировали на одной проточной кювете, а другая проточная кювета (используемая в качестве контрольной поверхности) оставалась пустой. Диапазон концентраций вариантов PI-4026-5 (в качестве аналитов, изотип hIgG1) вводили через проточные кюветы с захваченным Fc mIgG к TREM1 яванского макака и контрольную ячейку. После каждого цикла поверхность восстанавливали путем введения глицин-HCl буфера (10 mM, pH 2,0). Для проведения кинетической оценки использовали программное обеспечение BIAevaluation. Кинетическую оценку проводили путем построения сенсограмм, которые были аппроксимировали моделью связывания Ленгмюра 1:1.

Получение афукозилированных антител

[0547] Афукозилированные антитела были получены путем трансфекции плазмид тяжелой и легкой цепи представляющего интерес антитела (например, PI-4026-5) в клетки expi293, которые были сделаны дефицитными по α 1,6-фукозилтрансферазе млекопитающих (FUT8) с помощью редактирования CRISPR/Cas9 (Александр Вайс, Университет Торонто). После трансфекции клеток их расширяли до 7 дней, после чего собирали среду и очищали антитела с помощью одностадийной очистки на колонке с протеином A (HiTrap MabSelect SuRe, GE Healthcare). Затем для антител заменяли буфер в PBS и оценивали на наличие эндотоксина (тест на определение эндотоксинов с использованием лизата амёбоцитов Limulus, Charles River Laboratories), концентрацию (Nanodrop, ThermoFisher Scientific) и любую агрегацию с помощью УВЭЖХ (ThermoFisher Scientific). Антитела очищаются при помощи ЭХ до мономеров в зависимости от их агрегационных свойств (мономерность менее 95%). Афукозилирование подтверждается при помощи вестерн-блоттинга с антителом к антигену агглютинина Lens Culinaris (LCA) (L-1040-10, Vector Biolabs) или оценкой полного гликанового профиля представляющего интерес антитела (Bionova Scientific).

Результаты

[0548] Как показано на **Фиг. 8**, PI-4026-5 имеет риск окисления в Met100 в CDRH3 (RMAAMDY) по оценке при помощи ЭХ. Процент гетерогенности антитела увеличивается, а процент мономера уменьшается в зависимости от дозы H₂O₂. На это указывают двойные пики, наблюдаемые в профилях ЭХ образцов, обработанных 0,3%, 0,1% и 0,01% H₂O₂. В **таблице 3** представлена количественная оценка результатов ЭХ.

Таблица 3		
%H ₂ O ₂	% мономера	% гетерогенности
0	100	0
0,3	60,43	39,57
0,1	67,57	32,43

0,01	86,63	13,37
0,001	96,73	3,27
0,0001	100	0

[0549] Для решения этой проблемы метионин в остатке 100 в PI-4026-7 был мутирован в изолейцин, и мутантное антитело было протестировано, как описано выше. Как показано в **таблице 4**, мутация остатка метионина (RMAAMDY) на изолейцин (RIAAMDY) устраняла риск окисления. Инкубация антитела PI-4026-7M100I с H₂O₂ не привела к увеличению гетерогенности белка.

Таблица 4				
	PI-4026-7-M100		PI-4026-7-M100I	
% H₂O₂	% мономера	% гетерогенности	% мономера	% гетерогенности
0	100	0	100	0
0,3	54,37	45,63	100	0
0,1	71,74	28,26	100	0
0,01	86,81	13,19	100	0
0,001	100	0	100	0
0,0001	100	0	100	0

[0550] Далее были проведены дополнительные мутации в PI-4026-5, чтобы определить одну или более предпочтительных мутаций в этом положении остатка для клинической разработки. M100 был мутирован в изолейцин (M100I), глутаминовую кислоту (M100E), лейцин (M100L) или глутамин (M100Q). Эти мутации были рационально подобраны на основе анализа раскрытой кристаллической структуры взаимодействия между Fab PI-4026 и доменом IgV к TREM1 (**Пример 5**). В **таблице 5** показана сводка замен и последовательностей CDR-H3.

Таблица 5		
Замена M100x	Мутация CDRH3	Последовательность CDRH3
PI-4026-5-M100	Нет	RMAAMDY
PI-4026-5-M100I	M→I	RIAAMDY
PI-4026-5-M100E	M→E	REAAMDY
PI-4026-5-M100L	M→L	RLAAMDY
PI-4026-5-M100Q	M→Q	RQAAMDY

[0551] Каждый мутант по CDRH3 PI-4026-5 был охарактеризован, как описано ранее в **Примерах 2, 3 и 4**, на аффинность связывания с TREM1 человека и яванского макака, ЭХ, клеточное связывание и EC₅₀ с моноцитами человека, ДСФ и сигналинг FcγR с использованием системы для анализа репортерного гена hCD16.

[0552] Кроме того, оценивали связывание антител с клетками, сверхэкспрессирующими TREM1 яванского макака. Результаты для мутантов по CDRH3 PI-4026-5 обобщены в **таблице 6**.

Таблица 6

Анти- hTREM1 мкАт (фукозилиро ванное)	Авидност ь для человека K _D (нМ)	Авидност для яванског о макака, K _D (нМ)	% моном ера ЭХ	Человеч еская мономер ная форма K _D (нМ)	Человеч еская мономер ная форма, «K _{off} » (М)	Фоново е связыв ание	ЕС ₅₀ (нМ), Моноц иты (Челов ек)	ЕС ₅₀ (нМ), Клетки с TREM1 яванско го макака	Анали з АЗКЦ hCD16 , ЕС ₅₀ (нМ)	ДСФ (Tm2, °C)
PI-4026-5- M100 (исходное)	0,68	1,76	>95	4,81	6.67e-4	N	0,3	4,61	2,54	77,4
PI-4026-5- M100I	0,88	11,8	>95	10,2	1.31e-3	N	0,94	28,62	6,92	76,7
PI-4026-5- M100E	0,19	6,19	>95	3,33	4.76e-4	Y	0,45	57,99	3,18	77,6
PI-4026-5- M100L	0,27	1,43	>95	4,93	6.33e-4	N	0,67	4,85	5,86	77,3
PI-4026-5- M100Q	0,37	0,66	>95	5,61	9.06e-4	N	0,65	6,04	8,60	78,1

[0553] Далее аналогичным образом были охарактеризованы афукозилированные мутантные по CDRH3 антитела PI-4026-5.

[0554] Результаты для афукозилированных мутантов по CDRH3 PI-4026-5 обобщены в таблице 7.

Таблица 7

Анти-hTREM1 мкАт (афукозилированн ое)	Авидно сть для человек а K _D (нМ)	Авиднос ть для яванско го макака, K _D (нМ)	% моном ера ЭХ	Человеч еская мономер ная форма K _D (нМ)	Человеческ ая мономерна я форма, «K _{off} » (М)	Фоново е связыв ание	ЕС ₅₀ (нМ), Моноц иты (челове к)	ЕС50 (нМ) Клетки с TREM1 яванско го макака	Анализ АЗКЦ hCD16, ЕС ₅₀ (нМ)	ДСФ (Tm2, °C)
PI-4026-5-M100 (исходное)	0,55	2,99	>95	6,21	9.26e-4	N	0,60	6,61	0,36	77,5
PI-4026-5-M100I	0,88	13,4	>95	10,1	1.31e-3	N	1,06	22,02	0,39	76,7
PI-4026-5-M100E	<0,1	8,66	>95	3,74	5.05e-4	Y	0,3	55,97	0,33	77,2
PI-4026-5-M100L	0,15	1,41	>95	4,34	7.46e-4	N	0,75	3,62	0,28	76,7

PI-4026-5-M100Q	0,39	0,45	>95	6,32	9.68e-4	N	1,32	2,07	0,29	77,2
-----------------	------	------	-----	------	---------	---	------	------	------	------

[0555] PI-4026-5-M100I и PI-4026-5-M100E показали более высокое неспецифическое связывание с клетками, не экспрессирующими TREM1, и потеряли способность связываться с клетками, экспрессирующими TREM1 яванского макака. PI-4026-5-M100L и PI-4026-5-M100Q были выбраны для дальнейшей разработки, поскольку они сохранили качества PI-4026-5-M100 (исходного антитела), такие как связывание с TREM1 человека и яванского макака, специфичность, биофизические характеристики и функциональность. Важно отметить, что афукозилированные PI-4026-5-M100L и PI-4026-5-M100Q демонстрировали сходные биофизические и связывающие характеристики по сравнению с фукозилированными аналогами, за исключением значительного усиления сигналинга FcγR в анализе репортерного гена hCD16.

Пример 7. Клеточное связывание и индукция сигналинга АЗКЦ и АЗКФ фукозилированными и афукозилированными антителами PI-4026-5 с вариантами CDRH3

Анализ связывания с человеческими клетками

[0556] В свежей крови доноров людей (Стэнфордский центр крови) лизировали эритроциты и промывали ее для обогащения МКПК и гранулоцитами. Клетки высевали, а Fc-рецепторы блокировали с помощью комбинации человеческой сыворотки (Jackson ImmunoResearch), FcX человека (Biolegend) и раствора для блокировки FcR на основе пептидов (Innovex Biosciences). Клетки также окрашивали с помощью Zombie NIR (Biolegend) для определения жизнеспособности клеток. После Zombie NIR клетки окрашивали с помощью коктейля для проточной цитометрии с маркерами для основных субпопуляций иммунных клеток и титрами либо контрольного IgG1 человека, либо PI-4170, PI-4026-5, либо мутантов PI-4026-5, содержащих специфические мутации в остатке 100 тяжелой цепи. PI-4026-5 и мутанты PI-4026-5 были либо полностью фукозилированы, либо афукозилированы. Все используемые антитела были непосредственно конъюгированы, а данные были получены с помощью проточной цитометрии (ThermoFisher Attune NxT). Значения EC50 были рассчитаны с использованием программного обеспечения Prism (Graphpad).

Анализ связывания с клетками яванского макака

[0557] В свежей крови яванских обезьян (Worldwide Primates Inc) лизировали эритроциты и промывали ее для обогащения МКПК и гранулоцитами. Клетки высевали, а Fc-рецепторы блокировали с помощью комбинации человеческой сыворотки (Jackson ImmunoResearch) и раствора для блокировки FcR на основе пептидов (Innovex Biosciences). Клетки также окрашивали с помощью Zombie NIR (Biolegend) для определения жизнеспособности клеток. После Zombie NIR клетки окрашивали с помощью коктейля для проточной цитометрии с маркерами для основных субпопуляций иммунных клеток и титрами либо контрольного IgG1 человека, либо PI-4170, PI-4026-5, либо мутантов PI-4026-5, содержащих специфические мутации в остатке 100 тяжелой цепи. PI-4026-5 и мутанты PI-4026-5 были либо полностью фукозилированы, либо афукозилированы. Все используемые антитела были непосредственно конъюгированы, а данные были получены с помощью проточной цитометрии (ThermoFisher Attune NxT). Значения EC50 были рассчитаны с использованием программного обеспечения Prism (Graphpad).

Анализы АЗКЦ и АЗКФ

[0558] Клетки-мишени НЕК293, сверхэкспрессирующие TREM1 человека, инкубировали с титром PI-4170, PI-4026-5, мутантов PI-4026-5 или изотипического контроля hIgG1 в фукозилированном или афукозилированном формате в указанных концентрациях в плоскодонных белых 96-луночных планшетах (ThermoFisher). После 15-минутной инкубации при комнатной температуре экспрессирующие hCD16 клетки Jurkat с NFAT-управляемым репортерным геном люциферазы (Promega, Мэдисон, штат Висконсин), добавляли к смеси целевых клеток и антител в соотношении 3:1. После добавления репортерных клеток для анализа инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 6 ч. Уровень люциферазной активности определяли путем воздействия на субстрат люциферазы (Promega, Мэдисон, штат Вашингтон) и определяли с помощью люминесцентного ридера (Envision, Perkin Elmer). Значения EC50 были рассчитаны с использованием программного обеспечения Prism (Graphpad).

Результаты

[0559] Как показано на **Фиг. 9А** и **9В** фукозилированное антитело PI-4026-5 и афукозилированное антитело PI-4026-5 связываются с моноцитами периферической крови человека. На **Фиг. 9А** показано связывание фукозилированных антител, а на **Фиг. 9В** показано связывание афукозилированных антител. Аналогично, фукозилированные антитела PI-4026-5 и афукозилированные антитела PI-4026-5 связываются с моноцитами яванского макака (**Фиг. 10А** и **10В**). PI-4026-5-M100L и PI-4026-5-M100Q с вариантными CDRH3 показали наилучшее связывание с моноцитами яванского макака.

[0560] Кроме того, афукозилирование антител приводило к усилению сигналинга FcγR через hCD16 по сравнению с фукозилированными антителами (**Фиг. 11А** и **11В**). На **Фиг. 11А** показана активность сигналинга FcγR фукозилированных антител, а на **Фиг. 11В** показана активность сигналинга FcγR афукозилированных антител.

Пример 8. Биохимическая характеристика антител PI-4026-5-M100L и PI-4026-5-M100Q

[0561] На основании предыдущих данных два афукозилированных мутантных по CDRH3 антитела были дополнительно охарактеризованы с помощью различных биохимических анализов. Это было афукозилированное PI-4026-5-M100L, переименованное в PI64052, и афукозилированное PI-4026-5-M100Q, переименованное в PI64062.

[0562] K_D антител для клеток человека и яванского макака определяли, как описано ранее.

Агрегация/стабильность (эксклюзионная хроматография/ЭХ)

[0563] Афукозилированное PI-4026-5 M100L (PI64052) и афукозилированное PI-4026-5 M100Q (PI64062) в различных концентрациях и временных точках анализировали методом ЭХ с использованием аналитической системы УВЭЖХ ThermoFisher на колонке Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare). В качестве буфера подвижной фазы использовали PBS pH 7,4, скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Данные анализировали и интегрировали AUC пиков на уровне A280 с помощью программного обеспечения Chromeleon 7 (ThermoFisher).

[0564] Агрегация/стабильность (динамическое рассеяние света «ДРС»)

[0565] Данные для афукозилированного PI-4026-5-M100L (PI64052) и афукозилированного PI-4026-5-M100Q (PI64062) в указанных концентрациях и временных точках были получены при 37°C с помощью термостатируемого ридера DynaPro Plate Reader (Wyatt), оснащенного лазером с длиной волны 830 нм. Образцы загружались в 384-луночный планшет для автоматизированного сбора данных с высокой пропускной способностью. Рассеянный свет наблюдали при температуре 169°C. Для анализа и расчета гидродинамического диаметра, а также индекса полидисперсности использовали программное обеспечение DYNAMICS.

Различающиеся соединения и относительная гидрофобность (хроматография гидрофобных взаимодействий/ХГВ)

[0566] Афукозилированное PI-4026-5-M100L (PI64052) и афукозилированное PI-4026-5-M100Q (PI64062) были проанализированы методом ХГВ с использованием аналитической системы УВЭЖХ на аналитической колонке MAbPac HIC-10, 5 мкм, 4,6 x 100 мм (ThermoFisher). 0,1 М фосфата натрия pH 6,0, 1 М сульфата аммония использовали в качестве подвижной фазы 1, а 0,1 М фосфата натрия pH 6,0 использовали в качестве подвижной фазы 2 для создания градиента при скорости потока 1 мл/мин. Образцы, элюированные в градиенте, контролировали с помощью A280. Данные анализировали и интегрировали AUC пиков с помощью программного обеспечения Chromeleon 7 (ThermoFisher) и программного обеспечения Prism (Graphpad).

Тепловой стресс (динамическое рассеяние света «ДРС»)

[0567] Данные для афукозилированного PI-4026-5-M100L (PI64052) и афукозилированного PI-4026-5-M100Q (PI64062) в указанных концентрациях и временных точках были получены при 37°C с помощью термостатируемого ридера DynaPro Plate Reader (Wyatt), оснащенного лазером с длиной волны 830 нм. Образцы загружались в 384-луночный планшет для автоматизированного сбора данных с высокой пропускной способностью. Рассеянный свет наблюдали при температуре 169°C. Для анализа и расчета гидродинамического диаметра, а также индекса полидисперсности использовали программное обеспечение DYNAMICS.

Тепловой стресс (дифференциальная сканирующая флуориметрия «ДСФ»)

[0568] Температуры плавления афукозилированного PI-4026-5-M100L (PI64052) и афукозилированного PI-4026-5-M100Q (PI64062) были определены с помощью нанодифференциальной сканирующей флуориметрии (ДСФ). Образцы обрабатывали со скоростью изменения 1,5°C/мин от 20°C до 100°C. Образцы загружали в капилляры класса наноДСФ путем погружения в образец. Чтобы минимизировать испарение во время теплового сканирования, оба конца капилляра были запечатаны инертной уплотняющей пастой из жидкой резины на основе масла.

[0569] T_m рассчитывали по изменению интенсивности флуоресценции триптофана или соотношению эмиссии триптофана при 350 и 330 нм, которые точно отслеживают конформационные изменения при разворачивании белка в зависимости от температуры. T_m представляет собой температуру, при которой белок разворачивается на 50%.

Тепловой стресс (ЭХ)

[0570] Данные для афукозилированного PI-4026-5-M100L (PI64052) и афукозилированного PI-4026-5-M100Q (PI64062) при указанных концентрациях, температуре (37°C) и временных точках были собраны с

помощью аналитической системы для УВЭЖХ ThermoFisher на колонке Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare). В качестве буфера подвижной фазы использовали PBS pH 7,4, скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Данные анализировали и интегрировали AUC пиков на уровне A280 с помощью программного обеспечения Chromeleon 7 (ThermoFisher) и программного обеспечения Prism (Graphpad).

Окислительный стресс (ХГВ)

[0571] Анализ окисления проводили путем инкубации афукозилированного PI-4026-5-M100L (PI64052) и афукозилированного PI-4026-5-M100Q (PI64062) в указанных концентрациях H_2O_2 в течение 1 ч при 40°C при конечной концентрации антител 1 мг/мл. Образцы анализировали методом ХГВ в указанные временные точки с помощью аналитической системы для УВЭЖХ ThermoFisher на аналитической колонке MAbPac HIC-10, 5 мкм, 4,6 x 100 мм (ThermoFisher). 0,1 М фосфата натрия pH 6,0, 1 М сульфата аммония использовали в качестве подвижной фазы 1, а 0,1 М фосфата натрия pH 6,0 использовали в качестве подвижной фазы 2 для создания градиента при скорости потока 1 мл/мин. Образцы, элюированные в градиенте, контролировали с помощью A280. Данные анализировали и интегрировали AUC пиков с помощью программного обеспечения Chromeleon 7 (ThermoFisher) и программного обеспечения Prism (Graphpad).

Окислительный стресс (SEC)

[0572] Анализ окисления проводили путем инкубации афукозилированного PI-4026-5-M100L (PI64052) и афукозилированного PI-4026-5-M100Q (PI64062) в указанных концентрациях H_2O_2 в течение 1 ч при 40°C при конечной концентрации антител 1 мг/мл. Образцы анализировали методом ЭХ в указанные временные точки с использованием аналитической системы для УВЭЖХ ThermoFisher на колонке Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare). В качестве буфера подвижной фазы использовали PBS pH 7,4, скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Данные анализировали и интегрировали AUC пиков на уровне A280 с помощью программного обеспечения Chromeleon 7 (ThermoFisher).

Риск деамидирования (анализ зарядовых вариантов методом капиллярного изоэлектрического фокусирования «КИЭФ»)

[0573] Афукозилированное PI-4026-5-M100L (PI64052) и афукозилированное PI-4026-5-M100Q (PI64062) инкубировали в течение 12 ч при конечной концентрации антител 1 мг/мл в указанных буферах (PBS pH 7,4, Tris pH 8 или цитрат pH 4,5) при указанных значениях pH и указанных температурах (4°C или 40°C). Через 12 ч образцы были подготовлены в соответствии с набором зарядовых вариантов (Perkin Elmer), образцы были обработаны и проанализированы на приборе LabChipII GX и программном обеспечении LabChip GX (Perkin Elmer).

Результаты

[0574] В таблице 8 представлены результаты связывания PI64052 и PI64062 с белком TREM1 человека и яванского макака. PI64052 имело лучшую авидность для человека и связывание с мономерным человеческим TREM1, но PI64062 имело лучшую авидность для яванского макака.

Таблица 8

Анти-hTREM1 мкАт	Авидность для человека K _D (нМ)	Авидность для яванского макака, K _D (нМ)	Человеческая мономерная форма K _D (нМ)
PI64052 (PI-4026-5 M100L)	0,15	1,41	4,34
PI64062(PI-4026-5 M100Q)	0,39	0,45	6,32

[0575] Кинетика стабильности антител PI64052 и PI64062 в ответ на тепловой стресс (37°C), определенная с помощью ДРС, показана на **Фиг. 12А** и **12В**. На **Фиг. 12А** показан средний радиус каждого антитела с течением времени (столбики слева направо: 0 ч, 24 ч, 48 ч, 14 д, 28 д и 35 д), в то время как на **Фиг. 12В** показан % полидисперсности с течением времени (столбики слева направо: 0 ч, 24 ч, 48 ч, 14 д, 28 д и 35 д). Оба антитела показали увеличение полидисперсности в более поздних временных точках, но это значительно ниже принятого в отрасли определения монодисперсности (<20% полидисперсности). Результаты проиллюстрированы ниже в **таблице 9**.

Таблица 9													
		0 ч		24 ч		48 ч		14 д		28д		35д	
ДК	Конц.	Радиус (нм)	% Поли дисперсности	Радиус (нм)	% поли дисперсности	Радиус (нм)	% Поли дисперсности	Радиус (нм)	% Поли дисперсности	Радиус (нм)	% Поли дисперсности	Радиус (нм)	% Поли дисперсности
PI64052	50 мг/мл	7,5	2,7	7,5	2,4	7,7	7,5	7,3	10,5	7,4	7,1	7,1	10,6
PI64062	50 мг/мл	6,5	1,1	6,5	0	6,8	8	6,2	8,9	6,3	8,4	6,2	9,3

[0576] Кинетика стабильности антител PI64052 и PI64062, определенная методом ЭХ, показана на **Фиг. 13А** и **13В**. На **Фиг. 13А** показан % мономера (столбики слева направо: 0 ч, 24 ч, 48 ч, 7 д, 14 д и 28 д), в то время как на **Фиг. 13В** показан % агрегации с течением времени (столбики слева направо: 0 ч, 24 ч, 48 ч, 7 д, 14 д и 28 д). Оба антитела имели очень минимальное увеличение % агрегации с течением времени, но сохраняли мономерность >98%. Результаты проиллюстрированы ниже в **таблице 10**.

Таблица 10													
		0 ч		24 ч		48 ч		7 д		14 д		28 д	
ДК	Конц.	% мономер	% агрегации	% мономер	% агрегации	% мономер	% агрегации	% мономер	% агрегации	% мономер	% агрегации	% мономер	% агрегации

PI64052	50 мг/мл	99,32	0,68	99,23	0,77	99,31	0,69	98,87	1,13	98,67	1,33	98,59	1,41
PI64062	50 мг/мл	98,84	1,16	98,83	1,17	98,93	1,07	98,53	1,47	98,33	1,67	98,34	1,66

[0577] Чувствительность антител PI64052 и PI64062 к окислительному стрессу показана на **Фиг. 14А** и **14В** (24 ч, столбики слева направо 0, 0,3, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001), **Фиг. 15А** и **15В** (14 дней, столбики слева направо 0, 0,3, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001), и на **Фиг. 16А** и **16В** (28 дней, столбики слева направо 0, 0,3, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001), как измерено с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий (ХГВ). Количественные результаты также представлены в **таблицах 11, 12 и 13**, ниже. Инкубация с H_2O_2 не привела к значительному увеличению окисленных видов ни одного из антител через 24 часа или 14 дней после обработки H_2O_2 . Однако через 28 дней после воздействия H_2O_2 PI64052 показал большую гетерогенность, чем PI64062, в зависимости от концентрации H_2O_2 .

Таблица 11				
24 ч	PI64052		PI64062	
% H_2O_2	Основные соединения	Гидрофильные соединения	Основные соединения	Гидрофильные соединения
0	91,520	8,480	97,42	2,58
0,3	92,900	7,100	95,74	4,26
0,1	91,440	8,560	95,04	4,96
0,01	92,500	7,500	97,57	2,43
0,001	92,300	7,700	97,59	2,41
0,0001	91,520	8,480	97,63	2,37

Таблица 12				
14 день	PI64052		PI64062	
% H_2O_2	Основные соединения	Гидрофильные соединения	Основные соединения	Гидрофильные соединения
0	99,17	0,83	97,34	2,66
0,3	94,75	5,25	93,91	6,09
0,1	94,31	5,69	97,93	2,07
0,01	99,31	0,69	94,54	5,46
0,001	98,92	1,08	96,93	3,07
0,0001	98,91	1,09	98,05	1,95

Таблица 13		
28 день	PI64052	PI64062

% H ₂ O ₂	Основные соединения	Гидрофильные соединения	Основные соединения	Гидрофильные соединения
0	89,63	10,37	96,71	3,29
0,3	87,71	12,29	89,42	10,58
0,1	88,12	11,88	98,55	1,45
0,01	88,12	11,88	98,75	1,25
0,001	99,08	0,92	96,72	3,28
0,0001	93,63	6,37	95,71	4,29

[0578] Результаты анализа на деамидирование антител PI64052 и PI64062 показаны на **Фиг. 17A-17D**. Ни PI64052 (**Фиг. 17A** и **17B**) или PI64062 (**Фиг. 17C** и **17D**) показали риск деамидирования с помощью анализа методом КИЭФ. На **Фиг. 17A** и **17C** представлены гели для капиллярного электрофореза, которые выявляют любые зарядовые варианты белка, которые могут возникать в зависимости от условий деамидирования. На **Фиг. 17B** и **17D** показаны данные гелей для капиллярного электрофореза, представленные в виде интенсивности обнаруженных полос белка.

[0579] Краткая биофизическая характеристика антител PI64052 и PI64062 приведена в **таблице 14**. Превосходство одного антитела над другим по каждому критерию обозначено знаком (+). Критерии, в которых ни одно из антител не превосходит другое, отмечены знаком (-). В целом, PI64062, содержащее мутацию M100Q в области CDR-H3, имело лучшие биофизические свойства, чем PI64052.

Таблица 14		
Критерии/тест	PI64052 (M100L)	PI64062 (M100Q)
K _D для человека (авидность)	+	-
K _D для яванского макака (авидность)	-	+
K _D для человека (мономер)	+	-
Агрегация (ЭХ, ДРС)	-	-
Различающиеся соединения (ХГВ)	-	+
Тепловой стресс (ДРС, ДСФ)	-	-
Окислительный стресс (ХГВ, ЭХ)	-	+
Стабильность с течением времени (ДРС, ЭХ)	-	-

Относительная гидрофильность (ХГВ)	-	+
Риск деамидирования (зарядовые варианты)	-	-

Пример 9. Клеточное связывание и индукция сигналинга АЗКЦ и АЗКФ при помощи антител PI64052 и PI64062

[0580] Далее PI64052 и PI64062 были охарактеризованы с помощью различных функциональных анализов, включая связывание с клетками и индукцию АЗКЦ и АЗКФ.

Фоновое связывание

[0581] ЗФБ контрольные клетки НЕК293 в логарифмической фазе роста собирали из культуры, промывали и высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном из расчета 1×10^5 клеток/лунка. Титры афукозилированного PI-4026-5-M100L (PI64052) и афукозилированного PI-4026-5-M100Q (PI64062), а также изотипического контроля добавляли к клеткам и инкубировали в течение 30 минут на льду. Для выявления связанного первичного антитела использовали конъюгированное с Alexa 647 вторичное антитело к Fc γ человека (Jackson ImmunoResearch), разведенное в соотношении 1:500. Вторичное антитело инкубировали с клетками в течение 30 минут на льду. Затем клетки промывали и окрашивали Zombie NIR (Biolegend) для определения жизнеспособности клеток в течение 15 минут при комнатной температуре. Флуоресцентный сигнал от связанного антитела оценивали с помощью проточной цитометрии (ThermoFisher Attune NxT).

Связывание лимфоцитов

[0582] В свежей крови доноров людей (Стэнфордский центр крови) лизировали эритроциты и промывали ее для обогащения МПКК и гранулоцитами. Клетки высевали, а Fc-рецепторы блокировали с помощью комбинации человеческой сыворотки (Jackson ImmunoResearch), FcX человека (Biolegend) и раствора для блокировки FcR на основе пептидов (Innovex Biosciences). Клетки также окрашивали с помощью Zombie NIR (Biolegend) для определения жизнеспособности клеток. После Zombie NIR клетки окрашивали с помощью коктейля для проточной цитометрии, включающего маркеры для основных субпопуляций иммунных клеток, и титрами либо контрольного IgG1 человека, либо афукозилированного PI-4026-5-M100L (PI64052), либо афукозилированного PI-4026-5-M100Q (PI64062). Все используемые антитела были непосредственно конъюгированы, а данные были получены с помощью проточной цитометрии (ThermoFisher Attune NxT).

ЕС50 связывания с клетками, сверхэкспрессирующими hTREM1

[0583] Клетки НЕК293, сверхэкспрессирующие TREM1 человека, в логарифмической фазе роста собирали из культуры, промывали и высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном в количестве 1×10^5 клеток/лунка. В клетки добавляли титры неконъюгированного контроля hIgG1, афукозилированного PI-4026-5-M100L (PI64052) или афукозилированного PI-4026-5-M100Q (PI64062) в указанных концентрациях и инкубировали в течение 30 мин на льду. Для выявления связанного первичного антитела использовали конъюгированное с Alexa 647 вторичное антитело к Fc γ человека (Jackson ImmunoResearch), разведенное в соотношении 1:500. Вторичное антитело инкубировали с клетками в течение 30 минут на льду. Затем клетки

промывали и окрашивали Zombie NIR (Biolegend) для определения жизнеспособности клеток в течение 15 минут при комнатной температуре. Флуоресцентный сигнал от связанного антитела оценивали с помощью проточной цитометрии (ThermoFisher Attune NxT). Значения EC50 были рассчитаны с использованием программного обеспечения Prism (Graphpad).

EC50 связывания с клетками, сверхэкспрессирующими супоTREM1

[0584] Клетки HEK293, сверхэкспрессирующие TREM1 яванского макака, в логарифмической фазе роста собирали из культуры, промывали и высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном в количестве 1×10^5 клеток/лунка. В клетки добавляли титры неконъюгированного контроля hIgG1, афукозилированного PI-4026-5-M100L (PI64052) или афукозилированного PI-4026-5-M100Q (PI64062) в указанных концентрациях и инкубировали в течение 30 мин на льду. Для выявления связанного первичного антитела использовали конъюгированное с Alexa 647 вторичное антитело к Fc γ человека (Jackson Immunoresearch), разведенное в соотношении 1:500. Вторичное антитело инкубировали с клетками в течение 30 минут на льду. Затем клетки промывали и окрашивали Zombie NIR (Biolegend) для определения жизнеспособности клеток в течение 15 минут при комнатной температуре. Флуоресцентный сигнал от связанного антитела оценивали с помощью проточной цитометрии (ThermoFisher Attune NxT). Значения EC50 были рассчитаны с использованием программного обеспечения Prism (Graphpad).

EC50 связывания с моноцитами человека

[0585] В свежей крови доноров людей (Стэнфордский центр крови) лизировали эритроциты и промывали ее для обогащения МКПК и гранулоцитами. Клетки высевали, а Fc-рецепторы блокировали с помощью комбинации человеческой сыворотки (Jackson Immunoresearch), FcX человека (Biolegend) и раствора для блокировки FcR на основе пептидов (Innovex Biosciences). Клетки также окрашивали с помощью Zombie NIR (Biolegend) для определения жизнеспособности клеток. После Zombie NIR клетки окрашивали с помощью коктейля для проточной цитометрии, включающего маркеры для основных субпопуляций иммунных клеток, и титрами либо контрольного IgG1 человека, либо афукозилированного PI-4026-5-M100L (PI64052), либо афукозилированного PI-4026-5-M100Q (PI64062). Все используемые антитела были непосредственно конъюгированы, а данные были получены с помощью проточной цитометрии (ThermoFisher Attune NxT). Значения EC50 были рассчитаны с использованием программного обеспечения Prism (Graphpad).

EC50 связывания с моноцитами яванского макака

[0586] В свежей крови яванских обезьян (Worldwide Primates Inc) лизировали эритроциты и промывали ее для обогащения МКПК и гранулоцитами. Клетки высевали, а Fc-рецепторы блокировали с помощью комбинации человеческой сыворотки (Jackson Immunoresearch) и раствора для блокировки FcR на основе пептидов (Innovex Biosciences). Клетки также окрашивали с помощью Zombie NIR (Biolegend) для определения жизнеспособности клеток. После Zombie NIR клетки окрашивали с помощью коктейля для проточной цитометрии, включающего маркеры для основных субпопуляций иммунных клеток, и титрами либо контрольного IgG1 человека, либо афукозилированного PI-4026-5-M100L (PI64052), либо афукозилированного PI-4026-5-M100Q (PI64062). Все используемые антитела были непосредственно конъюгированы, а данные были получены с помощью проточной цитометрии (ThermoFisher Attune NxT). Значения EC50 были рассчитаны с использованием программного обеспечения Prism (Graphpad).

Анализ АЗКЦ для репортерного гена hCD16

[0587] Клетки-мишени HEK293, сверхэкспрессирующие TREM1 человека, инкубировали с титрами афукозилированного PI-4026-5-M100L (PI64052), афукозилированного PI-4026-5-M100Q (PI64062) или изотипического контроля hIgG1 в указанных концентрациях в плоскодонных белых 96-луночных планшетах (ThermoFisher). После 15-минутной инкубации при комнатной температуре экспрессирующие hCD16 клетки Jurkat с NFAT-управляемым репортерным геном люциферазы (Promega, Мэдисон, штат Висконсин), добавляли к смеси целевых клеток и антител в соотношении 3:1. После добавления репортерных клеток для анализа инкубировали при 37°С в атмосфере 5% CO₂ в течение 6 ч. Уровень люциферазной активности определяли путем воздействия на субстрат люциферазы (Promega, Мэдисон, штат Вашингтон) и определяли с помощью люминесцентного ридера (Envision, Perkin Elmer). Значения EC₅₀ были рассчитаны с использованием программного обеспечения Prism (Graphpad).

Анализ АЗКФ первичных макрофагов

[0588] ЗФБ-положительные клетки eхpi293, сверхэкспрессирующие TREM1 человека, инкубировали с титрами неконъюгированного контроля hIgG1, афукозилированного PI-4026-5-M100L (PI64052) или афукозилированного PI-4026-5-M100Q (PI64062) в течение 15-30 минут при комнатной температуре. Не отмывая, человеческие макрофаги, поляризованные из CD14⁺ моноцитов от двух доноров, меченных Cell Trace Violet (ThermoFisher), затем добавляли к смеси eхpi293 и антител в соотношении 1:1. Образец инкубировали в течение 6 часов при 37 °С в атмосфере 5% CO₂, после чего образец оценивали с помощью проточной цитометрии (ThermoFisher Attune NxT). АЗКФ измеряли путем подсчета количества ЗФБ-положительных и Cell Trace Violet-положительных макрофагов, гейтированных по отдельным клеткам. Значения EC₅₀ были рассчитаны с использованием программного обеспечения Prism (Graphpad).

Связывание FcγR

1 мкг/мл указанных рекомбинантных человеческих His-меченных белков FcγR (Sino Biologicals) были нанесены на планшеты MaxiSorp на ночь при 4°С. На следующий день планшеты промывали, и в покрытые планшеты добавляли титры фукозилированного или афукозилированного PI-4026-5-M100L и PI-4026-5-M100Q, или изотипического контроля hIgG4 (Biolegend) в указанных концентрациях. Fc-опосредованное связывание антител с покрытыми белками FcγR было обнаружено с помощью ПХ-конъюгированного фрагмента Fab'2 против части Fab'2 IgG человека (Jackson ImmunoResearch). Субстрат TMB (ThermoFisher) использовали для количественного определения количества ПХ-конъюгированного вторичного реагента, связанного с первичными антителами, а H₃PO₄ использовали для остановки реакции. Поглощение при 450 нм измеряли с использованием планшет-ридера Spectramax (Life Technologies).

Результаты

[0589] Отдельные экспериментальные повторности для связывания исходных клеток HEK293 показаны на **Фиг. 18А, 18В и 18С**. Не было обнаружено связывания PI64052 и PI64062 с клетками HEK293 относительно изотипического контроля.

[0590] Как показано на **Фиг. 19А-Е**, не было обнаружено связывания PI64052 и PI64062 с лимфоцитами человека (Т-клетки или В-клетки) относительно изотипического контроля. Каждый анализ повторяли три раза, и на каждом графике показаны результаты отдельных экспериментов. На **Фиг. 19А, 19В и 19С** показаны отдельные эксперименты с гейтированием по Т-клеткам, а на **Фиг. 19D, 19Е и 19F** показаны отдельные эксперименты с гейтированием по В-клеткам.

[0591] Также не было разницы в EC₅₀ двух афукозилированных антител к клеткам, сверхэкспрессирующим TREM1 человека (**Фиг. 20А, 20В и 20С**). Эксперимент повторяли три раза, и на каждом графике показан результат каждого отдельного эксперимента. Данные приведены в **таблице 15** ниже.

Таблица 15		
Антитело	Эксперимент	EC₅₀ (нМ)
PI64052	1	3,26
PI64062	1	2,32
PI64052	2	3,97
PI64062	2	3,88
PI64052	3	5,34
PI64062	3	4,88

[0592] PI64062 продемонстрировал стабильно лучшее связывание с клетками, сверхэкспрессирующими TREM1 (**Фиг. 21А, 21В, 21С**). Эксперимент повторяли три раза, и на каждом графике показан результат каждого отдельного эксперимента. Данные приведены в **таблице 16** ниже.

Таблица 16		
Антитело	Эксперимент	EC₅₀ (нМ)
PI64052	1	3,62
PI64062	1	2,07
PI64052	2	4,67
PI64062	2	3,25
PI64052	3	42,75
PI64062	3	7,89

[0593] Не было никакой разницы в EC₅₀ двух афукозилированных антител в отношении моноцитов человека (**Фиг. 22А, 22В и 22С**). Эксперимент повторяли три раза, и на каждом графике показан результат каждого отдельного эксперимента. Данные приведены в **таблице 17** ниже.

Таблица 17		
Антитело	Эксперимент	EC₅₀ (нМ)
PI64052	1	0,75
PI64062	1	1,32
PI64052	2	1,40
PI64062	2	1,27
PI64052	3	0,73
PI64062	3	0,57

[0594] Не было никакой разницы в EC₅₀ двух афукозилированных антител в отношении моноцитов яванского макака (**Фиг. 23А** и **23В**). Анализ повторяли дважды, и на каждом графике показан результат каждого отдельного эксперимента. Данные приведены в **таблице 18** ниже.

Таблица 18		
Антитело	Эксперимент	EC₅₀ (нМ)
PI64052	1	7,84
PI64062	1	7,94
PI64052	2	7,16
PI64062	2	7,84

[0595] Как показано на **Фиг. 24**, в системе для анализа репортерного гена hCD16 не было обнаружено существенной разницы в сигналинге FcγR, опосредованного PI64052 и PI64062. Анализ повторяли три раза, и на каждом графике показан результат каждого отдельного эксперимента. Данные приведены в **таблице 19** ниже. На **Фиг. 24** показан третий эксперимент и является репрезентативным для трех отдельных экспериментов.

Таблица 19		
Антитело	Эксперимент	EC₅₀ (нМ)
PI64052	1	0,09
PI64062	1	0,08
PI64052	2	0,28
PI64062	2	0,29
PI64052	3	0,11
PI64062	3	0,09

[0596] Как показано на **Фиг. 25А, 25В, 25С** и **25D** не было существенной разницы в способности PI64052 и PI64062 индуцировать АЗКЦ клеток, экспрессирующих hTREM1, первичными макрофагами человека. Анализ проводили с использованием двух доноров. На **Фиг. 25А** и **25В** показаны результаты по донору 1, а на **Фиг. 25С** и **25D** показаны результаты по донору 2. Количественные данные приведены в **таблице 20** ниже.

Таблица 20		
Антитело	Донор	EC₅₀ (нМ)
PI64052	1	6,86
PI64062	1	8,69
PI64052	2	0,86
PI64062	2	0,96

[0597] Как показано на **Фиг. 26А-Е**, не было обнаружено существенной разницы в связывании FcγR между PI64052 и PI64062. PI64052 и PI64062 показали усиленное связывание с определенными FcγR, такими как

FcγRIIIa (V), FcγRIIIa (F), и FcγRIIIb, по сравнению с их фукозилированными аналогами, PI-4026-5-M100L и PI-4026-5-M100Q, соответственно. На **Фиг. 26А** показано связывание с FcγRI, на **Фиг. 26В** показано связывание с FcγRIIa, на **Фиг. 26С** показано связывание с FcγRIIb, на **Фиг. 26D** показано связывание с FcγRIIIa (CD16a-V), на **Фиг. 26Е** показано связывание с FcγRIIIa (CD16a-F), а на **Фиг. 26F** показано связывание с FcγRIIIb.

[0598] Сводная информация о связывании и функциональной характеристике антител PI64052 и PI64062 представлена в **таблице 21**. Превосходство одного антитела над другим по каждому критерию обозначено знаком (+). Критерии, в которых ни одно из антител не превосходит другое, отмечены знаком (-). В целом, PI64062, содержащее мутацию M100Q в области CDRH3, имело лучшие свойства связывания с TREM1 яванского макака, чем PI64052, в то время как другие свойства существенно не отличались.

Таблица 21		
Критерии/тест	PI64052 (M100L)	PI64062 (M100Q)
Отсутствие фона (клетки НЕК293)	-	-
Отсутствие связывания лимфоцитов	-	-
EC ₅₀ для человека (сверхэкспрессия)	-	-
EC ₅₀ для яванского макака (сверхэкспрессия)	-	+
EC ₅₀ для моноцитов человека	-	-
EC ₅₀ моноцитов яванского макака	-	-
Анализ АЗКЦ для репортерного гена CD16	-	-
Анализ АЗКФ первичных макрофагов	-	-
Связывание FcγR	-	-

Пример 10: Занятость рецепторов и высвобождение цитокинов антителами PI-4026-5-M100Q и афукозилированным PI-4026-5-M100Q (PI64062)

Занятость рецепторов

[0599] Цельную кровь получали от нескольких человеческих доноров (Стэнфордский центр крови), эритроциты удаляли. Оставшиеся лейкоциты высевали из расчета 5×10^6 клеток на лунку в 96-луночный планшет. После посева клетки инкубировали с неконъюгированным изотипом hIgG1, афукозилированным изотипом hIgG1, PI-4026-5-M100Q или афукозилированным PI-4026-5-M100Q (PI64062) в течение 24 часов в зависимости от титра.

[0600] Через 24 часа клетки промывали один раз в PBS и окрашивали Zombie NIR (Biolegend) для определения жизнеспособности клеток. Fc-рецепторы (FcγR) также блокировали комбинацией человеческой сыворотки (Jackson ImmunoResearch), человеческого FcX (Biolegend) и раствора для блокировки FcγR на основе пептидов (Innovex Biosciences). После инкубации с блокирующими FcγR реагентами поверхностные рецепторы, представляющие интерес, окрашивали с помощью коктейля для проточной цитометрии, включающего маркеры основных субпопуляций внутриопухолевых иммунных клеток, а также изотип mIgG1 или мышиное антитело к TREM1 человека (клон TREM26, Biolegend). Все антитела, использованные для фенотипирования методом проточной цитометрии, были непосредственно конъюгированы. Данные получали с помощью анализатора Attune NxT (ThermoFisher) и анализировали с помощью FlowJo (BD Biosciences), Prism (Graphpad) и Excel (Microsoft).

[0601] Занятость рецепторов определяли путем оценки потери специфического сигнала от связывания конъюгированного антитела к TREM1 с соответствующими субпопуляциями клеток (моноцитами и нейтрофилами) в зависимости от концентрации неконъюгированного антитела.

[0602] Значения IC_{50} рассчитывали на основе кривых титрования, построенных в Prism (Graphpad), и нормализовали к наномолярным концентрациям.

Обнаружение цитокинов и хемокинов in vitro

[0603] Цельную кровь получали от нескольких человеческих доноров (Стэнфордский центр крови), эритроциты удаляли. Оставшиеся лейкоциты высевали из расчета 5×10^6 клеток на лунку в 96-луночный планшет. После посева клетки инкубировали с неконъюгированным изотипом hIgG1, афукозилированным изотипом hIgG1, PI-4026-5-M100Q или афукозилированным PI-4026-5-M100Q (PI64062) в течение 24 часов в зависимости от титра.

[0604] Через 24 часа супернатанты собирали и оценивали уровни указанных цитокинов и хемокинов в каждом условии с помощью набора Human Proinflammatory and Chemokine Kit (панель 1, Meso Scale Diagnostics). Данные были получены с помощью технологии Meso Scale Diagnostics Technology и проанализированы в Excel (Microsoft) и Prism (Graphpad).

[0605] Значения EC_{50} рассчитывали на основе кривых титрования, построенных в Prism (Graphpad), и нормализовали к наномолярным концентрациям.

Результаты

[0606] PI-4026-5-M100Q и афукозилированное PI-4026-5-M100Q (PI64062) не показали существенной разницы в дозозависимой занятости рецепторов (RO) на моноцитах (**Фиг. 27А**) или нейтрофилах (**Фиг. 27В**).

[0607] В **таблице 22** приведена количественная оценка IC_{50} RO на моноцитах для PI-4026-5-M100Q и афукозилированного PI-4026-5-M100Q.

Таблица 22

мкАт	IC ₅₀ (нМ)
PI-4026-5-M100Q	0,05
Афук-PI-4026-5-M100Q	0,06

[0608] В таблице 23 приведена количественная оценка IC₅₀ RO на нейтрофилах для PI-4026-5-M100Q и афукозилированного PI-4026-5-M100Q.

Таблица 23	
мкАт	IC ₅₀ (нМ)
PI-4026-5-M100Q	0,13
Афук-PI-4026-5-M100Q	0,09

[0609] PI-4026-5-M100Q и афукозилированное PI-4026-5-M100Q (PI64062) также индуцировали профиль цитокинов из лейкоцитов человека дозозависимым образом. Индукция ИФН- γ показана на **Фиг. 28А**, индукция ИЛ-8 показана на **Фиг. 28В**, индукция ИЛ-2 показана на **Фиг. 28С**, а индукция IP-10 показана на **Фиг. 28D**. Другие цитокины, включая ИЛ-6, ФНО- α и ИЛ-1 β , были обнаружены на уровне <10 пг/мл. EC₅₀ каждого цитокинового ответа показаны в **таблице 24**.

Таблица 24		
Цитокины	мкАт	EC ₅₀ (нМ)
ИФН- γ	PI-4026-5-M100Q	0,74
	Афук-PI-4026-5-M100Q	0,02
ИЛ-8	PI-4026-5-M100Q	0,32
	Афук-PI-4026-5-M100Q	0,10
ИЛ-2	PI-4026-5-M100Q	0,28
	Афук-PI-4026-5-M100Q	0,009
IP-10	PI-4026-5-M100Q	0,71
	Афук-PI-4026-5-M100Q	0,03

Пример 11. Цитокиновый профиль комбинированной терапии *in vivo* анти-TREM1 и анти-PD-1

Обнаружение цитокинов *in vivo*

[0610] Линию карциномы молочной железы Py8119 (ATCC, Манассас, штат Вирджиния) собирали в логарифмической фазе и вводили подкожно в правый вентральный бок самок мышей C57BL/6 (Jackson Laboratories) в дозе 2×10^6 клеток/мышь, смешанных с равным объемом матригеля. После того как опухоли у большинства мышей достигали 70-130 мм³, мышей подвергали рандомизации и им начинали вводить указанные антитела. Антитела вводили 2 раза внутрибрюшинно в дозе 15 мг/кг для анти-TREM1 и изотипа mIgG2a, и 5 мг/кг для анти-PD-1 и изотипа mIgG1 с частотой один раз в 5 дней. Анти-TREM1 и изотип mIgG2a были оба афукозилированы, а в качестве анти-TREM1 использовали антитело PI-4928.

[0611] Через 48 часов после введения второй дозы антител кровь мышей собирали и фракционировали для анализа сыворотки. Цитокины, ИФН- γ и ФНО- α , в сыворотке крови оценивали в каждой группе с помощью технологии Meso Scale Diagnostics (мышинная провоспалительная панель 1). Данные были получены с помощью технологии Meso Scale Diagnostics Technology и проанализированы в Excel (Microsoft) и Prism (Graphpad). В качестве статистического теста использовали обычный односторонний дисперсионный анализ с поправкой на множественные сравнения Тьюки.

[0612] PI-4928 был ранее описано в PCT/US2018/045680, включенном в данный документ посредством ссылки, и было показано, что оно связывается с TREM1 мыши на нейтрофилах (см., например, Пример 10) и клетках, сверхэкспрессирующих TREM1 мыши, (см., например, Пример 11). Афукозилированное PI-4928 также связывало Fc γ R и индуцировало Fc γ R -опосредованный сигналинг и АЗКЦ (см., например, Пример 11). Кроме того, терапевтическая эффективность афукозилированного PI-4928 в комбинации с анти-PD-1 также оценивали в мышинной модели Py8119. Комбинированная терапия привела к уменьшению объема опухоли по сравнению с контрольными группами (см., например, Пример 15), что указывает на то, что основанное на АЗКЦ истощение TREM1+ клеток может привести к противоопухолевой активности.

[0613] В этом примере PI-4928 использовали в качестве *in vivo* заменителя антител, описанных выше, поскольку оно связывает TREM1 мыши, оно также индуцирует сигналинг Fc γ R в репортерных клетках Jurkat, сверхэкспрессирующих mFc γ RIV, и, как было показано, обеспечивает противораковый терапевтический эффект *in vivo*.

Результаты

[0614] Комбинация антитела к TREM1 (афукозилированное PI-4928) и PD-1 индуцировала цитокиновый ответ как для ИФН- γ (Фиг. 29А), так и для ФНО- α (Фиг. 29В) *in vivo*. ** указывает на $p < 0,01$, **** указывает на $p < 0,0001$.

Пример 12: Эффективность комбинированной терапии *in vivo* анти-TREM1 и анти-PD-1

Исследование эффективности в отношении Panc02

[0615] Линию клеток аденокарциномы протоков поджелудочной железы Panc02 (банк клеток NCI) собирали в логарифмической фазе и вводили подкожно в правый бок самкам мышей C57BL/6 (Charles River Laboratories) в дозе 2×10^6 клеток/мышь. После того как опухоли у большинства мышей достигали 80-100 мм³, мышей подвергали рандомизации и им начинали вводить указанные антитела. Антитела вводили 4 раза внутрибрюшинно в дозе 15 мг/кг для анти-TREM1 и изотипа mIgG2a, и 10 мг/кг для анти-PD-1 и изотипа mIgG1 с частотой один раз каждые 3 или 5 дней. Анти-TREM1 и изотип mIgG2a были оба афукозилированы,

а в качестве анти-TREM1 использовали антитело PI-9067L. Размер опухоли оценивали по формуле $V \text{ (мм}^3\text{)} = (L \times W \times W) \div 2$, где V=объем, L=длина и W=ширина. Опухоли измеряли с помощью штангенциркуля, и мышей подвергали эвтаназии, когда объем опухоли достигал 2000 мм³.

[0616] Рост опухоли отображали как среднее значение по группе с течением времени, количество мышей в группе с течением времени и объем опухоли в группе на 28-й день. Используемый статистический критерий представлял собой стандартный односторонний дисперсионный анализ с поправкой на множественные сравнения Холма-Сidak.

[0617] PI-9067L был ранее описан в PCT/US2018/045680, включенном в данный документ посредством ссылки, и было показано, что оно связывается с TREM1 мыши на нейтрофилах (см., например, Пример 10) и клетках, сверхэкспрессирующих TREM1 мыши, (см., например, Пример 11). Афукозилированное PI-9067L также связывало FcγR и индуцировало FcγR-опосредованный сигналинг и АЗКЦ (см., например, Пример 11). Кроме того, оценивали терапевтическую эффективность фукозилированного и афукозилированного PI-9067L отдельно или в комбинации с анти-PD-1 в мышинных моделях MC38 и CT26. Моно- или комбинированная терапия с PI-9067L приводила к уменьшению объема опухоли по сравнению с контрольными группами в моделях MC38 и CT26, соответственно, (см., например, Примеры 13 и 14), что указывает на то, что основанное на АЗКЦ истощение TREM1+ клеток может привести к противоопухолевой активности.

[0618] В этом примере PI-9067L использовали в качестве *in vivo* заменителя антител, описанных выше, поскольку оно связывается с TREM1 мыши, оно также индуцирует сигналинг FcγR в репортерных клетках Jurkat, сверхэкспрессирующих mFcγRIV, и, как было показано, обеспечивает противораковый терапевтический эффект *in vivo*.

Результаты

[0619] Кроме того, терапия антителами к TREM1 обладает монотерапевтической активностью в модели опухоли Panc02. Введение афукозилированного антитела к TREM1 PI-9067L в монотерапии приводило к уменьшению объема опухоли *in vivo*, также как и в комбинации с антителом к PD1 (**Фиг. 30**). Отдельные группы лечения показаны на **Фиг. 31A-D**. Лечение изотипами показано на **Фиг. 31A**, лечение только анти-PD-1 показано на **Фиг. 31B**, лечение анти-TREM1 показано на **Фиг. 31C**, а комбинированное лечение анти-TREM1 и анти-PD-1 показано на **Фиг. 31D**. Количественная оценка объемов опухолей мышей в каждой группе лечения на 28-й день представлена на **Фиг. 32**.

Пример 13. TREM1 экспрессируется при различных онкологических показаниях

Материалы и способы

Проточная цитометрия

[0620] Экспрессию TREM1 оценивали в микроокружении опухолей человека с различными показаниями с помощью проточной цитометрии. Полученная опухолевая ткань была либо свежееиссеченной хирургическим путем (Cooperative Human Tissue Network, CHTN), либо предварительно диссоциированной и моментально замороженной (Folio Conversant). Свежие хирургически резецированные опухоли диссоциировали (Human Tumor Dissociation Kit, Miltenyi Biotec) в течение 24 часов после иссечения у пациента.

[0621] После диссоциации опухолей и удаления эритроцитов суспензии отдельных клеток разводили в PBS (Gibco), промывали один раз и окрашивали Zombie NIR (Biolegend) для определения жизнеспособности

клеток. Fc-рецепторы также блокировали с помощью комбинации человеческой сыворотки (Jackson Immunoresearch), человеческого FcX (Biolegend) и раствора для блокировки FcR на основе пептидов (Innovex Biosciences). После инкубации с блокирующими FcR реагентами поверхностные рецепторы на клетках окрашивали с помощью коктейля для проточной цитометрии, включающего маркеры основных субпопуляций внутриопухолевых иммунных клеток, а также изотип mIgG1 или мышиное антитело к TREM1 человека (клон TREM26, Biolegend). В некоторых случаях клетки также фиксировали и пермеабилizировали (True-Nuclear Transcription Buffer Set, Biolegend) для определения внутриклеточной экспрессии CD68. Все антитела, использованные для фенотипирования, были непосредственно конъюгированы. Данные получали с помощью анализатора Attune NxT (ThermoFisher) и анализировали с помощью FlowJo (BD Biosciences), Prism (Graphpad), Excel (Microsoft) и вычислительной среды R.

[0622] АКЛ = аденокарцинома легкого, КЯ = карцинома яичников, ПМК = почечно-клеточная карцинома, АКП = аденокарцинома предстательной железы, АКПЖ = аденокарцинома поджелудочной железы, АКМП = аденокарцинома мочевого пузыря, КАК = колоректальная аденокарцинома, КМЖ = карцинома молочной железы, АКЖ = аденокарцинома желудка, МК = меланома кожи, ПКГШ = карцинома головы и шеи, ОАМ = опухолеассоциированные макрофаги, Обыч. Моноциты = обычные моноциты.

Гибридизация РНК In Situ

[0623] Эксперименты RNAscope проводили в Advanced Cell Diagnostics (ACD). Advanced Cell Diagnostics (ACD) выполнила определение TREM1 с помощью RNAscope® в наборе патентованных ТМА, содержащих ткани из мочевого пузыря, предстательной железы, меланомы, головы и шеи, поджелудочной железы, толстой кишки, почек, легких, яичников и молочной железы. Качество образцов оценивали путем окрашивания срезов положительным контрольным зондом против PPIB (конститутивного гена) и отрицательным контрольным зондом против бактериального гена dapB. Условия окрашивания были оптимизированы для каждого зонда, чтобы максимизировать сигнал положительного контроля и минимизировать сигнал отрицательного контроля. Последовательность зонда к TREM1 была отобрана ACD для минимальной перекрестной гибридизации с нецелевыми участками генома. Гибридизацию РНК *in situ* для мРНК TREM1, TREM2, CD163, CD8A и NCAM1 проводили на автоматизированной платформе с использованием набора RNAscope®LS Duplex Reagent Kit (Advanced Cell Diagnostics, Inc., Ньюарк, штат Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя. Перед гибридизацией с целевыми олигонуклеотидами срезы тканей размером 5 мкм, фиксированные формалином и заключенные в парафин (FFPE), подвергали предварительной термической обработке и обработке протеазой. Затем последовательно гибридизовали предусилитель, усилитель и меченные HRP/AP олигонуклеотиды, после чего проводили хромогенную преципитацию. Качество каждого образца контролировали в отношении целостности РНК с помощью зонда RNAscope®, специфичного для РНК PPIB/POLR2A, и фона с помощью зонда, специфичного для бактериальной dapB RNA. Специфический сигнал окрашивания РНК был идентифицирован как зеленые/красные, точечные точки. Образцы подвергали контрокрашиванию с помощью гематоксилина Гилла. Были использованы РНК-зонды против TREM1 человека (кат. № 431508, против 24-1063 нт), TREM2 человека (кат. № 420498, против 5-1069 нт), CD163 человека (кат. № 417068-C2, против 210-1565 нт), NCAM-1 человека (кат. № 421468, против 832-1751 нт) и CD8a человека (кат. № 560398, против 871-2342 нт). Полуколичественные оценки (0-4) для каждого зонда были определены для всех образцов научным

сотрудником ACD на основании количества окрашенных точек на клетку по всему срезу. Критерии оценки были следующими: 0 баллов: отсутствие окрашивания или <1 точки/10 клеток; 1 балл: 1-3 точки/клетку; 2 балла: 4-9 точек/клетку и отсутствие или очень малое количество скоплений точек; 3 балла: 10-15 точек/клетку и/или <10% точек находятся в скоплениях; 4 балла: >15 точек/клетку и/или >10% точек находятся в скоплениях. Чтобы пройти контроль качества, для количественного определения TREM1 были отобраны образцы с сигналом положительного контроля 2-4 (от умеренного до высокого) и сигналом отрицательного контроля 0 (необнаруженный). TREM1-положительные показания определяли как показания, прошедшие контроль качества и имеющие оценку TREM1 1 или более.

Экспрессия TREM1 в одной клетке

[0624] Диссоциированные опухолевые клетки (ДОК), полученные от одного пациента с яичниками человека, были приобретены у компании Discovery Life Sciences. Клетки сортировали при помощи проточной цитометрии на наличие CD45 для обогащения иммунных клеток и инкапсулированы для секвенирования РНК одиночных клеток с использованием Chromium Controller от 10X Genomics. Полученные исходные данные последовательно обрабатывали с помощью программы CellRanger от 10X и модуля Seurat на языке программирования R. Популяции клеток в результате снижения размерности с помощью метода нелинейного снижения размерности и визуализации многомерных переменных (tSNE) были вручную аннотированы с использованием маркерных генов, специфических для клеточного типа, а экспрессию TREM1 наносили на график.

[0625] Данные секвенирования одиночных клеток от одного пациента с аденокарциномой легкого были загружены из Gene Expression Omnibus от NCBI (№ доступа: GSE97168). Необработанные данные обрабатывали с помощью модуля Seurat на языке программирования R. Популяции клеток в результате снижения размерности с помощью метода нелинейного снижения размерности и визуализации многомерных переменных (tSNE) были вручную аннотированы с использованием маркерных генов, специфических для клеточного типа, а экспрессию TREM1 наносили на график.

Результаты

[0626] Экспрессия TREM1 была обнаружена исключительно на миелоидных клетках в микроокружении опухоли при различных раковых разновидностях (**Фиг. 33**), включая аденокарциному легкого, карциному яичников, почечно-клеточную карциному, аденокарциному предстательной железы, аденокарциному мочевого пузыря, аденокарциному кишечника, карциному молочной железы и аденокарциному желудка. Экспрессия TREM1 была постоянно положительной на нейтрофилах, ОАМ и/или обычных моноцитах и отрицательной на CD3⁺ клетках.

[0627] В **таблице 25** также приведены количественные показатели для TREM1⁺ опухолей в процентах от общего числа проанализированных опухолей. TREM1 экспрессировался в большинстве проанализированных опухолей, относящихся к различным типам опухолей.

Таблица 25					
Проточная цитометрия	КАК	ПКК	КЯ	ЛУ	АКЖ
% TREM1⁺ опухолей	94%	73%	82%	91%	90%

Общее кол-во проанализированных опухолей	16	11	17	12	10
--	----	----	----	----	----

[0628] Аналогичные результаты были получены при анализе гибридизации РНК in situ, представленном в таблице 26. В большинстве случаев TREM1 экспрессировался более чем в 70% проанализированных опухолей (см., например, опухоли КАК, КЯ, АКЛ, ПКГШ, МК, АКПЖ и АКП). TREM1 также экспрессировался примерно в 40% проанализированных опухолей почек, мочевого пузыря и молочной железы. Таким образом, TREM1 экспрессируется во многих типах опухолей.

Таблица 26										
RNAScope (FISH)	КАК	ПК К	КЯ	LU	АКМ П	КМЖ	ПКГ Ш	МК	АКП Ж	АКП
% TREM1 ⁺ опухолей	80%	40%	71%	100%	38%	40%	100%	80%	86%	83%
Общее кол-во проанализированных опухолей	10	10	7	8	8	10	7	10	7	6

[0629] Дальнейший анализ результатов секвенирования одиночных клеток из CD45⁺ иммунного инфильтрата, отсортированного из диссоциированных клеток опухоли яичников человека, показал, что TREM1 преимущественно экспрессируется на моноцитарных миелоидных супрессорных клетках (мМСК), незрелых моноцитарных миелоидных клетках, которые являются иммуносупрессорными (данные не показаны). Напротив, TREM2 экспрессируется преимущественно на опухолеассоциированных макрофагах (ОАМ). Анализ результатов секвенирования одиночных клеток пациента с аденокарциномой легкого также показал, что TREM1 экспрессируется в популяциях супрессорных миелоидных клетках человека (данные не показаны).

Пример 14. Антитело к TREM1 индуцирует селективный набор противораковых хемокинов и рецепторов клеточной поверхности

Материалы и способы

[0630] Подготовка образцов

[0631] Цельную кровь получали от нескольких человеческих доноров (Стэнфордский центр крови), эритроциты удаляли. Оставшиеся лейкоциты высевали из расчета 5×10^6 клеток на лунку в 96-луночный планшет. После посева клетки инкубировали с афукозилированным изотипом hIgG1 или афукозилированным PI-4026-5-M100Q (PI64062) в течение 24 часов в зависимости от титра. Дополнительные клетки обрабатывали однократными концентрациями афукозилированного изотипа hIgG1 или афукозилированного PI-4026-5-M100Q (PI64062) в течение 24 ч для экспрессии CD80 и CD86 на поверхности клеток. Через 24 часа супернатанты собирали.

[0632] *Обнаружение цитокинов и хемокинов in vitro*

[0633] Для измерения цитокинов и хемокинов образцы оценивали в каждом условии с использованием набора Human Proinflammatory and Chemokine Kit (панель 1, Meso Scale Diagnostics). Данные были получены с помощью технологии Meso Scale Diagnostics Technology и проанализированы в Excel (Microsoft) и Prism (Graphpad). Значения EC₅₀ рассчитывали на основе кривых титрования, построенных в Prism (Graphpad), и нормализовали к наномолярным концентрациям.

[0634] *Проточная цитометрия CD40, HLA-DR, CD80 и CD86*

[0635] Через 24 часа клетки промывали один раз в PBS и окрашивали Zombie NIR (Biolegend) для определения жизнеспособности клеток. Fcγ-рецепторы (FcγR) также блокировали с помощью комбинации человеческой сыворотки (Jackson Immunoresearch), человеческого FcX (Biolegend) и раствора для блокировки FcγR на основе пептидов (Innovex Biosciences). После инкубации с блокирующими FcγR реагентами поверхностные рецепторы, представляющие интерес, окрашивали с помощью коктейля для проточной цитометрии, включающего маркеры внутриопухолевых субпопуляций, а также HLA-DR (клон L243), CD40 (клон 5C3), CD80 (клон 2D10, Biolegend, кат. № 306216) и CD86 (клон BU63, Biolegend, кат. № 374212). Все антитела, использованные для фенотипирования методом проточной цитометрии, были непосредственно конъюгированы. Данные получали с помощью анализатора Attune NxT (ThermoFisher) и анализировали с помощью FlowJo (BD Biosciences), Prism (Graphpad) и Excel (Microsoft). Показаны репрезентативные наложения гистограмм для клеточной поверхности HLA-DR, CD40, CD80 и CD86 на CD14⁺ моноцитах.

[0636] *Секвенирование РНК для сортировки клеток*

[0637] Целую гепаринизированную кровь 5 здоровых человеческих доноров обрабатывали 1 мг/мл (~7нМ) афукозилированного PI-4026-5-M100Q (PI64062) или антитела изотипического контроля, соответственно, в течение 16 часов при 37 °C в 5% CO₂. После инкубационного периода кровь переливали и все последующие стадии проводили на льду. В крови лизировали эритроциты, а лейкоциты затем окрашивали антителами против маркеров, специфичных для конкретной линии дифференцировки. Анти-CD15 (клон W6D3, Biolegend) использовали для идентификации нейтрофилов, анти-CD14 (клон M5E2, Biolegend) использовали для идентификации моноцитов, анти-CD3 (клон UCHT1, Biolegend) использовали для идентификации Т-клеток, а анти-CD56 (клон 5.1H11, Biolegend) использовали для идентификации NK-клеток. Окрашенные клетки были подвергнуты сортировке методом проточной цитометрии, в результате чего были получены чистые популяции CD15⁺ нейтрофилов, CD14⁺ моноцитов, CD3⁺ Т-клеток и CD56⁺ NK-клеток. Из каждого образца, специфичного для каждой субпопуляции клеток, выделяли общую РНК и отправляли на высокопроизводительное секвенирование РНК. Последующие данные были выровнены по геному человека (GRCh38.p12), а значения экспрессии каждого гена были сведены в таблицу для каждого образца. Полученная матрица экспрессии была логарифмически нормализована с помощью пакета R DESeq2, и 1000 генов с наибольшей дисперсией по всем образцам были кластеризованы с использованием евклидова расстояния и полной связи. О чистоте исходной сортировки клеток свидетельствует чистое разделение типов клеток, а также разделение по донорскому признаку. Канонические маркеры для каждого типа клеток указаны справа.

[0638] *Секвенирование РНК для маркеров иммунной активации HLA-DR, CD40, CD80 и CD86*

[0639] Цельная гепаринизированная кровь 5 здоровых человеческих доноров обрабатывали 1 мг/мл (~7нМ) афукозилированного PI-4026-5-M100Q (PI64062) или антитела изотипического контроля, соответственно, в течение 16 часов при 37 °С в 5% CO₂. После инкубационного периода кровь переливали и все последующие стадии проводили на льду. В крови лизировали эритроциты, затем лейкоциты окрашивали антителами против маркеров, специфичных для конкретной линии дифференцировки, и передавали на сортировку методом проточной цитометрии, получая чистые популяции CD15⁺ нейтрофилов, CD14⁺ моноцитов, CD3⁺ Т-клеток и CD56⁺ NK-клеток. Из каждого образца, специфичного для каждой субпопуляции клеток, выделяли общую РНК и отправляли на высокопроизводительное секвенирование РНК. Последующие данные были выровнены по геному человека (GRCh38.p12), а значения экспрессии каждого гена были сведены в таблицу для каждого образца. Полученная матрица экспрессии была сведена к профилям моноцитов и нормализована по количеству на миллион прочтений. Полученные значения экспрессии для HLA-DR, CD40, CD80 и CD86 были построены по всем образцам, полученным из моноцитов. Маркеры активации специфически экспрессировались и дифференциально регулировались только в моноцитах.

Результаты

[0640] Афукозилированное PI-4026-5-M100Q индуцировало селективный набор хемокинов и цитокинов *in vitro*. На **Фиг. 34А** представлены относительные кратные изменения указанного хемокина или цитокина после обработки PI-4026-5-M100Q по сравнению с обработкой изотипическим антителом. Цитокины, показанные на **Фиг. 34А** были обнаружены на уровне более 10 пг/мл и были повышены в экспериментах с несколькими донорами.

[0641] Кроме того, обработка клеток афукозилированным PI-4026-5-M100Q приводила к дозозависимому увеличению поверхностной экспрессии HLA-DR (**Фиг. 34В**) и поверхностной экспрессии CD40 (**Фиг. 34С**) на обычных моноцитах. HLA-DR и CD40 являются костимулирующими белками, которые находятся на антигенпрезентирующих клетках и играют важную роль в презентации антигена. Афукозилированное PI-4026-5-M100Q повышает уровень молекул клеточной поверхности, важных для презентации антигенов и активации лимфоцитов, а также повышают уровень цитокинов, ответственных за активацию и рекрутирование лимфоцитов. Эти результаты позволяют предположить, что антитело к TREM1 может перепрограммировать или активировать супрессорные миелоидные клетки в противоопухолевый, провоспалительный фенотип.

[0642] Чтобы подтвердить эти результаты, гены и пути иммунного сигналинга, индуцированные в клетках после обработки афукозилированным PI-4026-M100Q или изотипическим контролем, были исследованы с помощью секвенирования РНК. Сначала была проведена секвенирование РНК на клетках, обработанных антителом к TREM1 или изотипическим контролем, а экспрессию генов каждого образца кластеризовали. Как показано на **Фиг. 35**, кластеризация Т-клеток, NK-клеток, моноцитов и нейтрофилов на основе данных секвенирования РНК хорошо коррелирует с канонической экспрессией генов каждой из указанных клеточных популяций. Таким образом, иммунные клетки можно было правильно кластеризовать с помощью данных секвенирования РНК, независимо от обработки антителами.

[0643] Далее, индукция антителом к TREM1 специфических маркеров активации иммунных клеток была подтверждена с помощью секвенирования РНК. Экспрессия HLA-DR, CD40, CD80 и CD86 была определена с помощью секвенирования РНК. CD80 и CD86 являются дополнительными костимулирующими белками,

обнаруженными на антигенпрезентирующих клетках. На **Фиг. 36А** показана экспрессия гена HLA-DR в указанных типах клеток после обработки изотипическими антителами (ISO) или антителами к TREM1 (афукозилированное PI64062). На **Фиг. 36В** показана экспрессия гена CD40 в указанных типах клеток после обработки изотипическим антителом (ISO) или антителом к TREM1 (афукозилированным PI64062). На **Фиг. 36С** показана экспрессия гена CD80 в указанных типах клеток после обработки изотипическим антителом (ISO) или антителом к TREM1 (афукозилированным PI64062). На **Фиг. 36D** показана экспрессия гена CD86 в указанных типах клеток после обработки изотипическим антителом (ISO) или антителом к TREM1 (афукозилированным PI64062). Анализ РНК был дополнительно подтвержден анализом методом проточной цитометрии на поверхностную экспрессию CD80 и CD86, а также HLA-DR и CD40 в качестве повторных образцов. Репрезентативные наложения гистограмм для HLA-DR (**Фиг. 37А**), CD40 (**Фиг. 37В**), CD80 (**Фиг. 37С**), и CD86 (**Фиг. 37D**) клеточной поверхности на CD14⁺ моноцитах показаны, совпадая с индуцированным анти-TREM1 профилем, показанным при помощи анализа РНК. Важно отметить, что экспрессия маркеров клеточной поверхности, индуцированные обработкой антителом к TREM1 в образцах для секвенирования РНК, соответствовали с экспрессией HLA-DR и CD40, первоначально определенной с помощью проточной цитометрии.

[0644] Дополнительные изменения в экспрессии генов, индуцированные обработкой антителом к TREM1 в моноцитах, нейтрофилах, NK-клетках и Т-клетках, также оценивали с помощью секвенирования РНК. Гены, связанные с ИФН ответом, сигналингом ФНО- α и воспалительным ответом, индуцировали при помощи обработки антителом к TREM1 в нейтрофилах, моноцитах, NK-клетках и Т-клетках. Антитело к TREM1 индуцировало изменения экспрессии генов в основном в нейтрофилах, моноцитах и NK-клетках.

[0645] В таблице 27 приведена сводка иммунных путей, индуцируемых антителом к TREM1 в различных типах клеток.

Таблица 27				
Количество генов, селективно индуцированных антителом к TREM1				
	Моноцит	Нейтрофил	NK	Т-клетка
После фильтрации низкоэкспрессированных генов (количество на миллион прочтений >2)	53	423	20	3
Характерные пути, индуцируемые антителом к TREM1	ИФН ответ Сигналинг ФНО- α Воспалительный ответ Сигнальные пути	ИФН ответ Сигналинг ФНО- α Воспалительный ответ Сигнальные пути	Сигналинг ФНО- α Воспалительный ответ Сигнальные пути	ИФН ответ Сигналинг ФНО- α

Пример 15. Антитело к TREM1 индуцирует провоспалительный ответ

Материалы и способы

[0646] Количественная оценка фосфорилирования белков

[0647] Клетки, которые использовали для проточной цитометрии для определения фосфорилирования, были получены из цельной крови здоровых доноров людей. В лейкоцитарной пленке лизировали эритроциты с помощью двух раундов инкубации в буфере BD Pharm Lyse при 37 °C в течение 15 минут каждый. После лизиса эритроцитов, полученные лейкоциты в среде X-VIVO 15 были помещены в 96-луночные планшеты с глубокими лунками из расчета 5x10⁶ лейкоцитов на лунку. Клеткам давали восстановиться в течение 2 ч при 37°C, 5% CO₂, чтобы снизить базальный уровень фосфорилирования. После периода восстановления клетки стимулировали PMA (0,1 мкг/мл) и иономицином (1 мкг/мл) в качестве положительного контроля, или 5 мкг/мл афукозилированного PI-4026-5-M100Q или афукозилированного изотипа hIgG1 в течение 0, 2, 10, 30, 60 и 90 минут. Затем клетки фиксировали с помощью предварительно нагретого буфера BD Cyto Fix в течение 10 мин при 37°C. После фиксации образцы дважды промывали буфером для FACS (DPBS с 2% FBS, 2 mM ЭДТА) и пермеабилizировали с помощью 100 мкл/образец BD Perm Buffer III. Затем образцы промывали буфером для FACS, блокировали 50 мкл блока Innovex и TrueStain FcX человека в течение 30 мин на льду и дважды промывали буфером для FACS. Осадок клеток ресуспендировали в коктейле антител против маркеров линий дифференцировки лейкоцитов и разделили на 2 образца для фосфо-белкового окрашивания. Были использованы анти-фосфо-ERK1/2 (Y202/Y204) (Biolegend, клон 4B11B69) и анти-фосфо-STAT3 (S727) (Biolegend, клон A16089B). Образцы инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре с коктейлями антител, включая анти-фосфо антитела. После инкубации образцы дважды промывали буфером для FACS, а затем фиксировали путем инкубации с 2% параформальдегидом в течение 10 мин на льду. Образцы дважды промывали буфером для FACS, ресуспендировали в 200 мкл буфера для FACS и хранили при 4°C до получения данных на проточном цитометре Attune.

Индукция клеточных путей

[0648] Мышей, несущих опухоли MC38 (n=10 на группу), лечили афукозилированным PI-9067L или изотипическим контролем mIgG2a, как описано в Примере 14 из PCT/US2018/045680. Опухоли собирали на 19-й день после имплантации (через 48 часов после 2-го лечения). РНК выделяли и секвенировали. Дифференциально индуцированные пути, связанные с обработкой антителами, оценивали с помощью инструмента для анализа представленности групп генов (GSEA) от Института Брода, используя коллекцию наборов генов c5 из MSigDB. Значительно активированные пути (FDR < 0,1) были визуализированы с помощью модуля Enrichment Map в Cytoscape с использованием параметров по умолчанию.

[0649] *Валидация при помощи секвенирования РНК*

[0650] Цельную гепаринизированную кровь 5 здоровых доноров людей обрабатывали 1 мг/мл (~7nM) антитела PY159 и антитела изотипического антитела, соответственно, в течение 16 часов при 37 градусах Цельсия в 5% CO₂. После инкубационного периода кровь переливали и все последующие стадии проводили на льду. В крови лизировали эритроциты, затем лейкоциты окрашивали антителами против маркеров, специфичных для конкретной линии дифференцировки, и передавали на сортировку методом проточной цитометрии, получая чистые популяции CD15⁺ нейтрофилов, CD14⁺ моноцитов, CD3⁺ Т-клеток и CD56⁺ NK-клеток. Из каждого образца, специфичного для каждой субпопуляции клеток, выделяли общую РНК и отправляли на высокопроизводительное секвенирование РНК. Последующие данные были выровнены по геному человека (GRCh38.p12), а значения экспрессии каждого гена были сведены в таблицу для каждого образца. Нормализацию и последующую дифференциальную экспрессию между образцами, обработанными

PY159 и контролем, проводили для каждого типа клеток с использованием пакета R DESeq2. Полученные данные для каждой субпопуляции клеток были упорядочены по кратному изменению, подмножества включали только гены, кодирующие белок, и были перенесены в программное обеспечение для анализа обогащения набора генов (v4.0.0) (доступно в Институте Брода). Анализ перепредставленности генов проводили с использованием настроек по умолчанию против коллекции геной отнологии Института Брода (MsigDB c5).

Результаты

[0651] PI-4026-5-M100Q индуцировало фосфорилирование ERK и STAT3 в моноцитах и нейтрофилах, но не в Т-клетках (**Фиг. 38А**). Только антитело к TREM1 индуцировало фосфорилирование ERK в нейтрофилах и моноцитах, в клетках, обработанных hIgG1, фосфорилирование ERK не наблюдали. Антитело к TREM1 индуцировало более высокие уровни фосфорилированного STAT3 в нейтрофилах и моноцитах, по сравнению с обработкой hIgG1. В панелях STAT3 на **Фиг. 38А**, образцы TREM1 показаны в виде столбиков справа, а образцы, обработанные hIgG1, показаны в виде столбиков слева.

[0652] На **Фиг. 38В** (* < 0,05, ** < 0,001) показаны результаты анализа путей ERK и STAT методом секвенирования РНК, которые демонстрируют значительное обогащение генов, связанных с этими путями, в моноцитах, но не в нейтрофилах или NK-клетках.

[0653] Активация ERK, также известного как митоген-активируемая протеинкиназа (MAPK), приводит к активации NF-κB и проявлению провоспалительного ответа. STAT3 представляет собой фактор транскрипции, который активируется сигнальными белками семейства JAK и взаимодействует с NF-κB. Активация STAT3 также приводит к провоспалительному ответу. Таким образом, фосфорилирование ERK и STAT3 после обработки антителом к TREM1 служит дополнительным доказательством агонистической активности афукозилированного антитела PI-4026-5-M100Q, демонстрируя, что обработка антителом может сшивать TREM1 и индуцировать сигналинг ниже TREM1 и его адаптерного белка DAP12. Этот сигнал, возможно, играет роль в перепрограммировании TREM1+ миелоидных клеток в провоспалительные клетки.

[0654] Также был проанализирован провоспалительный ответ, вызванный лечением антителом к TREM1 у мышей и людей. Лечение мышей антителом к TREM1 привело к активации путей, связанных с иммунными ответами, транспортом ионов кальция, ремоделированием тканей, метаболизмом и процессингом РНК. Семейства иммунных путей включают процессинг и презентацию антигенов, сигнальные пути рецепторов Т-клеток, ФНО ответы, продукцию цитокинов суперсемейства ФНО, сигналинг NF-κB, продукцию ИФН-γ, регуляцию продукции ИЛ-6, пролиферацию Т-клеток, адаптивный иммунный ответ, опосредованный лимфоцитами иммунитет, клеточную адгезию, активность хемокинов, связывание рецепторов хемокинов, хемотаксис клеток, миграцию лимфоцитов и каскад ERK1 и ERK2. Более того, лечение антителом к TREM1 в мышинной модели Py8119 также продемонстрировало активацию путей, связанных с иммунным ответом, таких как врожденный иммунный ответ, активация клеток и адгезия, а также таксис или амебоидное движение (данные не показаны).

[0655] На **Фиг. 39** показан график генов, экспрессия которых была повышена в мышинной модели опухоли MC38 по сравнению с хемокинами и цитокинами, индуцированными PI-4026-5-M100Q, в анализе крови человека. В данных, полученных *in vivo* на мышах и *in vitro* в крови человека, лечение антителом к TREM1 привело к повышению уровня молекул, связанных с провоспалительным Т-клеточным ответом.

[0656] В таблице 28 приведена сводка конкретных цитокинов и хемокинов, индуцированных в различных клеточных популяциях антителом к TREM1, как определено с помощью анализов белков и секвенирования РНК.

Таблица 28			
Белок (OLink)	Секвенирование РНК	Белок (OLink)	Секвенирование РНК
CCL3 (MIP1 α)	Моноцит, нейтрофил, NK	ФНО- α	Нейтрофил, NK
ИЛ-1a	Моноцит, нейтрофил	GZMH	Без изменений
CCL4 (MIP1 β)	Моноцит, нейтрофил, NK	ИЛ-12	Нейтрофил, Т-клетка
CCL8 (MCP-2)	Без изменений	PD-L1	Нейтрофил
CCL20 (MIP3 α)	Без изменений	TNFRSF9 (CD137;4-1BB)	NK
ИЛ-6	Моноцит	GZMA	Без изменений
CCL2 (MCP-1)	Без изменений	CXCL11	Без изменений
CCL7 (MCP-3)	Без изменений	MMP7	Без изменений
CXCL5 (ENA78)	Сниженная экспрессия в моноцитах	CCL23	Моноцит, нейтрофил
CXCL1 (GRO/KC)	Без изменений	CD70	Без изменений
CSF-1	Моноцит, нейтрофил	CRTAM	NK
CCL13 (MCP-4)	Моноцит, нейтрофил	CD8A	Без изменений
CCL19	NK	GZMB	Без изменений
ИФН- γ	NK	CXCL10	Без изменений

[0657] Таким образом, антитело к TREM1 (афукозилированное PI-4026-5-M100Q) индуцировало множественные противоопухолевые иммунные механизмы в Т-клетках, NK-клетках, M1-подобных макрофагах, которые связаны с разрушением опухоли. В моноцитах обработка антителом к TREM1 привела к индукции CXCL10, CXCL9, CCL3, CCL13, ИЛ-6, CSF-1, HLA-DR, CD40, CD86 и CD80. В NK-клетках обработка антителом к TREM1 привела к индукции ИФН- γ , CCL3, CCL4, CCL17, 4-1BB, CRTAM и CD69. В нейтрофилах обработка антителом к TREM1 привело к индукции CCL3, CCL4, CCL13, CXCL8 и PD-L1. Сводная таблица факторов, на которые указывает антитело к TREM1, функций этих факторов и источника клеток приведена в таблице 29.

Таблица 29		
Индукцированный антителом к TREM1 фактор	Функция	Источник клеток
ИФН-гамма, 4-1BB, CXCL9, CXCL10, CCL13	Рекрутинг и активация Т-клеток	NK-клетки, Моноциты, Нейтрофилы

ИФН-гамма, CCL3, CCL4, CSF1, CXCL8	Рекрутинг и активация миелоидных клеток	NK-клетки, Моноциты, Нейтрофилы
ИФН-гамма, CXCL10, 4-1BB	Усиление презентации антигена	NK-клетки, Моноциты,
ИФН-гамма, CXCL10, CCL4	Активация NK-клеток	NK-клетки, Моноциты, Нейтрофилы
ИФН-гамма, CXCL9, CXCL10	Необходим для анти-PD-1 эффективности	NK-клетки, Моноциты,
HLA-DR, CD40, CD86, CD80	Активация Т-клеток	Моноциты,

Пример 16: Эффективность анти-TREM1 терапии *in vivo* в модели опухоли яичников

[0658] Все антитела для использования *in vivo* были проверены на наличие эндотоксина и использовали на уровне не более 0,2 ЕЭ/мг белка. Анти-PD-1 (клон RMP1-14) был приобретен у Absolute Antibody Inc или рекомбинантно получен в формате мышиного IgG1 D265A в Рiоупг. Изотипические контроли мышиного IgG1 (клон MOPC-21) и мышиного IgG2a (клон C1.18.4) были приобретены у BioXCell или рекомбинантно получены в клетках HEK293 в Рiоупг. Химерный мышиный вариант IgG2a для антитела к TREM1 (PI-9067L) был получен в клетках HEK293 в Рiоупг и оценен на монодисперсность и чистоту с помощью ЭХ и ДСН-КЭ, а также протестирован на эндотоксин.

[0659] Все экспериментальные процедуры с участием живых животных были одобрены институциональными комитетами по уходу и использованию животных компании AJES Life Sciences LLC. 6-8-недельных самок мышей B6(Cg)-Tguc-2J/J или B6-albino приобретали в Jackson Laboratory и использовали после недельной акклиматизации в помещении для животных. Поверхностные эпителиальные клетки яичников мыши, сверхэкспрессирующие люциферазу светлячка, известные как ID8-Luc (AJES Life Sciences LLC, Стоуни-Брук, штат Нью-Йорк), собирали в течение 3-7 субкультивирований после оттаивания из банка с жидким азотом и использовали для экспериментов *in vivo*. В день инокуляции опухоли клетки собирали и использовали в течение 45 минут. Для получения внутрибрюшинных опухолей 5×10^6 клеток ID8-Luc вводили в правую нижнюю часть брюшной стенки. Через 20 дней после инъекции всем мышам проводили исследование активности люциферазы *in vivo* для включения в исследование. Сорок животных с опухолями включали в исследование на основе среднего значения люминесценции в качестве косвенного показателя опухолевой нагрузки. В каждую из четырех групп лечения случайным образом распределяли по 10 животных таким образом, что средняя интенсивность излучения опухоли (ф/с/см²/ср) для каждой группы составляла $4,7 \times 10^4$. Животных с опухолями лечили указанными антителами внутрибрюшинно каждые 5 дней, а люминесцентные изображения получали еженедельно. Мышам внутрибрюшинно вводили 0,2 мл 15 мг/мл D-люциферина (Promega). Через десять минут после инъекции D-люциферина мышей визуализировали в приборе, оборудованном камерой на ПЗС (IVIS, Xenogen, Аламеда, штат Калифорния). Данные анализировали с помощью программного обеспечения Living Image (Xenogen) и представляли в виде

интенсивности излучения опухоли (ф/с/см2/ср) для представляющей интерес области, охватывающей брюшную полость.

[0660] В этом примере PI-9067L использовали в качестве *in vivo* заменителя для описанных выше антител, поскольку оно связывается с мышинным TREM1 и, как было показано в PCT/US2018/045680, обеспечивает противораковый терапевтический эффект *in vivo*.

[0661] Как показано на **Фиг. 40**, лечение антителами к TREM1 имело эффективность в виде монотерапии и комбинированной терапии в ортотопической модели опухоли яичников ID8. У мышей, которых лечили только антителом к TREM1, наблюдали уменьшение опухолевой нагрузки, о чем свидетельствует снижение люминесценции опухоли по сравнению с мышами, которых лечили изотипическим контролем. Лечение контрольным антителом к PD-1 также привело к уменьшению опухолевой нагрузки, а комбинация антител к TREM1 и к PD-1 привела к еще большему уменьшению опухолевой нагрузки по сравнению с лечением только антителом к TREM1 или антителом к PD-1.

[0662] В результате всех исследований эффективности *in vivo*, антитела к TREM1 показали: эффективность монотерапии в модели карциномы толстой кишки MC38, которая привела к ингибированию роста опухоли примерно на 44% по сравнению с контролем; эффективность монотерапии в модели поджелудочной железы Рапс02, которая привела к ингибированию роста опухоли примерно на 43% по сравнению с контролем; и эффективность монотерапии в модели яичников ID8, которая привела к ингибированию роста опухоли примерно на 44% по сравнению с контролем. Антитела к TREM1 имели эффективность комбинации с антителами к PD-1 в модели карциномы толстой кишки CTC26, которая привела к ингибированию роста опухоли примерно на 40-45% и излечению на 20-40% по сравнению с контролем; эффективность комбинации с антителами к PD-1 в модели Рапс02, которая привела к ингибированию роста опухоли примерно на 56% по сравнению с контролем; эффективность комбинации с антителами к PD-1 в модели опухоли яичников ID8, которая привела к ингибированию роста опухоли примерно на 62% и излечению на 20% по сравнению с контролем; и эффективность комбинации с антителами к PD-1 в линии карциномы молочной железы Py8119, которая привела к ингибированию роста опухоли примерно на 46% по сравнению с контролем.

Пример 17. Лечение анти-TREM1 приводит к формированию долгосрочной противоопухолевой иммунной памяти

[0663] Мыши BALB/c, которые не имели опухолей в предыдущих исследованиях модели опухоли CT26 после лечения афукозилированным антителом к TREM1 PI-9067L и антителом к PD-1, как описано в Примере 13 документа PCT/US2018/045680, были повторно заражены через три месяца 1×10^6 опухолевыми клетками CT26. Объем опухоли измеряли на 25-й день после имплантации. Соответствующие по возрасту наивные мыши получали эквивалентное количество клеток CT26 и у них отслеживали рост опухоли в течение периода исследования. В течение исследования мышам не проводили никакого дополнительного лечения.

[0664] Мыши, излечившиеся от опухолей CT26 после лечения комбинацией афукозилированного PI-9067L к TREM1 и мкАт к PD-1, продемонстрировали эффективный противоопухолевый вторичный иммунный ответ (**Фиг. 41**). Вылеченные мыши были способны отторгать любой новый рост опухоли даже при

отсутствии дополнительной терапии, что указывает на долгосрочную иммунную память против первоначальной, имплантированной опухоли. Эта форма долговременной иммунной памяти может использоваться для поддержания активного вторичного иммунного ответа CD8+ эффекторных клеток.

Пример 18. TREM1 экспрессируется при различных злокачественных новообразованиях и обратно коррелирует с выживаемостью пациентов

[0665] Уровень 2. Данные секвенирования РНК для когорты образцов колоректального рака Атласа ракового генома были загружены от Института Брода с помощью *firehose_get*. Значения RSEM для TREM1 из опухоли (n=282) и соседних нормальных образцов (n=41) были конвертированы в log 2 количества на миллион прочтений и построены в R (**Фиг. 42А**). Предварительно нормализованные профили экспрессии TREM1 и соответствующие клинические данные по 566 опухолям толстой кишки были загружены с сайта GEO от NCBI (№ доступа: GSE39582). Профили экспрессии были разделены на две когорты на основе медианного уровня TREM1. Для каждой когорты были построены кривые выживаемости Каплана-Мейера и проведен соответствующий логранговый тест с использованием пакетов *survival* и *survminer* в R (**Фиг. 42В**).

[0666] TREM1 высоко экспрессируется при колоректальном раке (**Фиг. 42А**). Кроме того, уровень экспрессии TREM1 при колоректальном раке обратно коррелирует с вероятностью выживаемости пациентов, например, пациенты с высокой экспрессией TREM1 имели более низкую долгосрочную вероятность выживаемости по сравнению с пациентами с низкой экспрессией TREM1, $p=0,0081$ (**Фиг. 42В**). Обратная корреляция экспрессии TREM1 и выживаемости пациентов также наблюдали у пациентов с раком молочной железы и раком поджелудочной железы (данные не показаны). Высокую экспрессию мРНК TREM1 также наблюдали при НМРЛ, ПКРГШ, раке яичников, желудка и мочевого пузыря (данные не показаны).

Пример 19: Фармакокинетические исследования *In vivo*

Материалы и способы

[0667] Самкам мышей CD-1 внутривенно вводили возрастающие дозы 0,1, 1, 10 и 100 мг/кг афукозилированного антитела к TREM1 PI-4928. Плазму собирали через 0,25, 1, 2, 24, 72, 168 и 336 часов после введения дозы. Концентрации в плазме антитела PI-4928 и растворимого мышинного TREM1 определяли, как описано ниже. В этом примере PI-4928 был использован в качестве *in vivo* заменителя антител, описанных выше, поскольку оно связывается с TREM1 мыши и, как было показано, обеспечивает противораковый терапевтический эффект *in vivo*.

[0668] ФК анализ PI-4928 у мыши представляет собой анализ связывания лигандов (LBA). 96-луночный планшет с высокой степенью связывания от MSD был покрыт Fc-меченным рекомбинантным мышинным TREM1 (R&D Systems, № 1187-TR). После блокирования образцы добавляли в планшет, который связывал белок TREM1. Присутствие афукозилированного антитела PI-4928 было обнаружено с помощью сульфо-меченного вторичного антитела к IgG2a мыши (Jackson ImmunoResearch, № 115-035-206). ЭХЛ сигнал продуцировался вторичным антителом после того, как на планшет подавался электрический сигнал от планшетного ридера от MSD. ЭХЛ сигнал был обнаружен и количественно оценен с помощью планшетного ридера.

[0669] ФК анализ от MSD демонстрирует высокую чувствительность с динамическим диапазоном от 300 нг/мл до 0,41 нг/мл. При использовании минимально необходимого разведения (MRD) 1:20, НПКО данного анализа составляет 8,2 нг/мл, а ВПКО составляет 6000 нг/мл. Анализ предназначен для выявления афукозилированных антител PI-4928 в K₂ЭДТА плазме крови BALB/c.

[0670] Количественное определение растворимого TREM1 мыши (msTREM1) проводили с помощью иммуноферментного анализа, разработанного на платформе MSD. Биотинилированные козы поликлональные антитела к mTREM1 (R&D Systems, № AF1187) использовали в качестве агентов захвата и связывали с предварительно покрытым стрептавидином планшетом. После промывки образцы, содержащие белки mTREM1, добавляли в планшет. Связанные белки TREM1 были обнаружены с помощью сульфомеченного антитела mIgG2a к mTREM1 (антитело собственной разработки).

[0671] Динамический диапазон для анализа sTREM1 от MSD составляет от 10 нг/мл до 14 пг/мл. НПКО и нижний предел чувствительности этого анализа составляют 14 пг/мл и 1 пг/мл, соответственно. Этот анализ sTREM1 способен обнаружить циркулирующие белки TREM1 в образцах плазмы крови линий Balb/c, C57BL/6 и CD1. Кроме того, этот анализ выявляет белок sTREM1 в присутствии антитела PI-4928.

[0672] Количество клеток крови также определяли на 7-й и 14-й дни. Кровь собирали в пробирки с K₂ЭДТА и анализировали на аппарате Heska Element HT5 для определения лейкоцитарной формулы и эритроцитарных параметров.

Результаты

[0673] Афукозилированное антитело PI-4928 имело дозозависимую фармакокинетику у мышей (**Фиг. 43А**). Как показано на **Фиг. 43В**, лечение антителом к TREM1 привело к дозозависимому накоплению растворимого белка TREM1 мыши в плазме, что указывает на то, что антитело PI-4928 также стабилизировало растворимый белок TREM1 мыши.

[0674] Кроме того, введение афукозилированного PI-4928 не вызывало значительного изменения количества нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов или базофилов в крови мыши (**Фиг. 44А и 44В**) или химический анализ сыворотки крови (**Фиг. 44С и 44D**), протестированные на 7-й и 14-й день. Были измерены параметры эритроцитов, включая гемоглобин (HGB), гематокрит (HCT), среднюю величину объема эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците в абсолютных единицах (MCH), среднюю корпускулярную концентрацию гемоглобина (MCHC) и относительную ширину распределения эритроцитов по объему (RDW-CV).

Пример 20. Эффективность анти-TREM1 терапии in vivo в модели рака молочной железы

Материалы и способы

[0675] Самки мышей BALB/c в возрасте около восьми недель были получены от компании Taconic. Линия клеток опухоли молочной железы мыши EMT6 (CRL-2755) получили из Американской коллекции типовых культур и культивировали в соответствии с их рекомендациями. Клетки низких пассажей ресуспендировали в количестве 1×10^7 клеток/мл в бессывороточной культуральной среде. Суспензию опухолевых клеток вводили подкожно в выбранный правый вентральный бок мышей BALB/c. Рост объема опухоли контролировали путем перпендикулярного измерения диаметра опухоли и рассчитывали по формуле (мм^3) = $0,5 \times (\text{длина}) \times (\text{ширина})^2$. Для лечения лекарственными препаратами мышам внутрибрюшинно вводили дозу

мышинного антимышиного изотипического контроля IgG2a (клон C1.18.4 при 15 мг/кг), антимышиного изотипического контроля IgG1 (клон MOPC-21 в дозе 15 мг/кг), антимышиного PD-1 (Pionyr Pi-0004-AB в дозе 5 мг/кг), антимышиного TREM1 (клон Pi-9067L в дозе 15 мг/кг) или комбинацию антитела к TREM1 и антитела к PD-1. Анти-PD-1 (клон RMP1-14) приобретали у BioXCell (Вест-Лебанон, штат Нью-Гэмпшир, США) или получали рекомбинантно в формате мышинного IgG1 D265A. Лечение начинали, когда средний объем опухоли в группе составлял в среднем 62 кубических мм (**Фиг. 45A**) или в среднем 173 куб. мм (**Фиг. 45B**). Вертикальные линии обозначают дни, когда антитела вводили внутривенно. Все исследования проводили в соответствии с институциональным комитетом по уходу и использованию животных Explora Biolabs согласно протоколу AUP0606. Мыши содержали в условиях, описанных в руководстве NIH по уходу и использованию лабораторных животных в соответствии с Законом США о благополучии лабораторных животных Министерства сельского хозяйства США. Животные имели неограниченный доступ к корму Lab Diet и воде для грызунов. Исследователь или ветеринарный персонал обследовали мышей минимум два раза в неделю на предмет клинических отклонений, которые могут потребовать эвтаназии. Мышей с потерей массы тела >20% по сравнению с исходной массой подвергали эвтаназии.

Результаты

[0676] На **Фиг. 44A** и **44B** показана противоопухолевая эффективность анти-TREM1, анти-PD-1 или комбинации анти-TREM1 и анти-PD-1 в подкожном лечении опухоли EMT6 у самок мышей BALB/c. На **Фиг. 44A** показаны объемы опухолей во время лечения мышей с «небольшими» опухолями объемом 62 мм³. На **Фиг. 44B** показаны объемы опухолей во время лечения мышей с «большими» опухолями 173 мм³. В небольших опухолях лечение антителами к TREM1 отдельно или в комбинации с антителами к PD-1 показало противоопухолевую эффективность. Лечение антителом к TREM1 привело к 47% ингибированию роста опухоли, лечение антителом к PD-1 привело к 65% ингибированию роста опухоли и 2 полным регрессиям, а лечение комбинацией антитела к TREM1 и антитела к PD-1 привело к 91% ингибированию роста опухоли и 3 полным регрессиям (**Фиг. 44A**). В больших опухолях лечение антителом к TREM1 привело к 1 полной ремиссии, лечение антителом к PD-1 привело к 10% ингибированию роста опухоли, а лечение комбинацией антитела к TREM1 и антителом к PD-1 привело к 75% ингибированию роста опухоли (**Фиг. 44A**). Таким образом, антитело к TREM1 демонстрирует эффективность как в монотерапии, так и в комбинированной терапии.

[0677] Все ссылки, выданные патенты и патентные заявки, приведенные в тексте данного описания, настоящим включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

[0678] Хотя изобретение было конкретно показано и описано со ссылкой на предпочтительный вариант осуществления и различные альтернативные варианты осуществления, специалистам в соответствующей области техники будет понятно, что в него могут быть внесены различные изменения в форме и деталях без отступления от сущности и объема изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO	Название	Последовательность

1	TREM1 человсека	MRKTRLWGLLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTL DVKCDYTLEKFASSQKAWQI IRD GEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQP PK EPHMLFDRIRLVVTKGFSGTPGSNENSTQNVYKIPPTTTKALCPLYTSPRTVTQAPPKST ADVSTPDSEINLTNVTDIIRVPVFNIVILLAGGFLSKSLVFSVLFVAVTLRSFVP
2	TREM1 мышы	MRKAGLWGLLCVFFVSEVKA AIVLEEERYDLVEGQTLTVKCPFNMIMKYANSQKAWQR LPD GKEPLTLVVTQRPFTRPSEVHMGKFTLKHDPSEAMLQVQMTDLQVTD SGLYRCVIYHP PN DPVVL FHPVRLVVTKGSSDVFTPVIIPITRLTERPILITTKYSPSDTTTTRSLPKPTAVV SSPGLGVTIINGTDADSVSTSSVTISVICGLLSKSLVFILFIVTKRTFG
3	VH-1 4026 c 100X	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTD YVINWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGS TFYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARRXAAMDYWGQGTLVT VSS
4	VH-2 4026 c 100X	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTD YVINWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGS TFYAQKFQGRVTMTADTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCTRRXAAMDYWGQGTLVT VSS
5	VH-3 4026 c 100X	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTD YVINWVRQAPGQGLEWIGE IYPGSGST FYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCTRRXAAMDYWGQGTLVTVS S
6	VH-4 4026 c 100X	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTD YVINWVRQAPGQGLEWIGE IYPGSGST FYAQKFQGRATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCTRRXAAMDYWGQGTLVTVS S
7	VH-1 4026 c M100	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTD YVINWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGS TFYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARRMAAMDYWGQGTLVT VSS
8	VH-2 4026 c M100	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTD YVINWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGS TFYAQKFQGRVTMTADTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCTRRMAAMDYWGQGTLVT VSS
9	VH-3 4026 c M100	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTD YVINWVRQAPGQGLEWIGE IYPGSGST FYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCTRRMAAMDYWGQGTLVTVS S
10	VH-4 4026 c M100	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTD YVINWVRQAPGQGLEWIGE IYPGSGST FYAQKFQGRATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCTRRMAAMDYWGQGTLVTV SS
11	VH-1 4026 c M100L	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTD YVINWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGS TFYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARRLAAMDYWGQGTLVTV SS

12	VH-2 4026 c M100L	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYVINWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGS TFYAQKFQGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCTRRLAAMDYWGQGTLVTV SS
13	VH-3 4026 c M100L	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWVRQAPGQGLEWIGEIYPGSGST FYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDNAVYYCTRRLAAMDYWGQGTLVTVS S
14	VH-4 4026 c M100L	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWVRQAPGQGLEWIGEIYPGSGST FYAQKFQGRATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDNAVYYCTRRLAAMDYWGQGTLVTVS S
15	VH-1 4026 c M100Q	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYVINWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGS TFYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCARRQAAMDYWGQGTLVT VSS
16	VH-2 4026 c M100Q	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYVINWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGS TFYAQKFQGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCTRRQAAMDYWGQGTLVT VSS
17	VH-3 4026 c M100Q	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWVRQAPGQGLEWIGEIYPGSGST FYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDNAVYYCTRRQAAMDYWGQGTLVTVS S
18	VH-4 4026 c M100Q	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWVRQAPGQGLEWIGEIYPGSGST FYAQKFQGRATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDNAVYYCTRRQAAMDYWGQGTLVTVS S
19	VL-1 4026	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWYQQKPGKAPKLLIYTTSNLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQWSGYPTFGQGTKLEIK
20	VL-2 4026	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWYQQKPGKAPKLLLYTTSNLASGVPSR FSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCHQWSGYPTFGQGTKLEIK
21	VL-3 4026	DIQLTQSPSSLSASVGDRITLTCSASSSVSYMHWYQQKPGKAPKLLLYTTSNLASGVPSR FSGSGSGTDYTLTISSVQPEDFATYYCHQWSGYPTFGQGTKLEIK
22	VL-4 4026	DIQLTQSPSSLSASVGDRITLTCSASSSVSYMHWYQQKPGKAPKLLLYTTSNLASGVPSR FSGSGSGTDYTLTISSVQPEDAATYYCHQWSGYPTFGQGTKLEIK
23	CDR H1	GYTFTDYVIN
24	CDR H2	EIYPGSGSTF
25	CDR H3	RMAAMDY
26	CDR L1	SASSSVSYMH
27	CDR L2	TTSNLAS
28	CDR L3	HQWSGYPT

29	Консенсусная CDR H3	RXAAMDY
30	CDR H3 M100I	RIAAMDY
31	CDR H3 M100E	REAAMDY
32	CDR H3 M100L	RLAAMDY
33	CDR H3 M100Q	RQAAMDY
34	Тяжелая цепь 4026-5 с M100Q	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWVRQAPGQGLEWIGEIYPGSGSTFYAQKF QGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDТАVYYCTRRQAAMDYWGQGTЛTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
35	Легкая цепь 4026-5 с M100Q	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWYQKPGKAPKLLLYTTSNLASGVPSRFSGS GSGETDYTLTISSLQPEDFATYYCHQWSGYPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

36	Тяжелая цепь 4026-5 с M100L	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWVRQAPGQGLEWIGEIYPGSGST FYAQKF QGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDТАVYYCTRRLAAMDYWGQGTЛTVSSASTKG PSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTP EVTСVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
37	Легкая цепь 4026-5 M100L	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWYQKPGKAPKLLLYTTSNLASGVPSR cFSGS GSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCHQWSGYPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEK HKVYAC EVTHQGLSPVTKSFNRGEC
38	Тяжелая цепь 4026-5 с M100M	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWVRQAPGQGLEWIGEIYPGSGST FYAQKF QGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDТАVYYCTRRMAAMDYWGQGTЛTVSSASTKG PSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTP EVTСVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
39	Легкая цепь 4026-5 M100M	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWYQKPGKAPKLLLYTTSNLASGVPSR cFSGS GSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCHQWSGYPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEK HKVYAC EVTHQGLSPVTKSFNRGEC

40	CH 4026	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
41	CL 4026	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
42	Остатки 21-34 hTREM1	ATKLTEEKYELKEG
43	Остатки 103-109 hTREM1	LQVEDSG
44	Остатки 128-136 hTREM1	RIRLVVTKG
45	hIgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
46	mIgG1	AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD D LYTLSSSVTVPSSRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIF PPKPKDVLITITLTPKVTCVVDISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQTQPREEQFNSTFRS V SELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDK V SLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVNQKSNWEAG NTF TCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK

47	hlgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCSPCAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK
48	Тяжелая цепь мкАт 4170	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTTFSTYAMHWVRQASGKLEWVGRIRTKSSN YATYYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRDMGIRRFAYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK
49	Легкая цепь мкАт 4170	DIVLTQSPDLSAVSLGERATINCRASESVDTFDYSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNL GVPDFRFGSGSGTDFTLTITSLQAEDVAVYYCQQSNEDPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
50	Тяжелая цепь мкАт TREM-26	QVQLQQSGPELVKPGTSVKMSCKASGYTFDYSVINWVKQRTGQGLEWIGEYIPGSGST FYHEKFKGKATLTADKSSNTAYMQVSSLTSEDSAVYFCTRRMAAMDYWGQGTSTVTS SAKTTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQ SDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVF LFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTF RSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTLSKTKGRPKAPQVYTLPPPKEQMA KDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQVQSN WEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK
51	Легкая цепь мкАт TREM-26	QIVLTQSPAISASLGEEITLTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKLLLYTTSNLAGVPSR FSGTGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYCHQWSGYPTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSS EQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
52	VH TREM-26	QVQLQQSGPELVKPGTSVKMSCKASGYTFDYSVINWVKQRTGQGLEWIGEYIPGSGST FYHEKFKGKATLTADKSSNTAYMQVSSLTSEDSAVYFCTRRMAAMDYWGQGTSTVTS S
53	VL TREM-26	QIVLTQSPAISASLGEEITLTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKLLLYTTSNLAGVPSR FSGTGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYCHQWSGYPTFGGGTKLEIK

54	Тяжелая цепь Pi-4928	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSITSSNVYWFRQPPGKGLEWMGNIWGDGSTD YNSSLKSRLTLSRDTSKNQVFLKINSLQSEDTATYFCTRSWEYYFDHWGQG VVVTVSS AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQS DLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGG PSVFIFPPKIKDVLMLISLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYN STLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEE EMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGGSYFMYSKLRVE KKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
55	Легкая цепь Pi-4928	DIVLTQSPALAVSPGQRATLSCRASQSVTLNVLNLMNWWYQQKPGQPKLLIYHASNLAS GIPTRFSGSGSGTDFTLTIDPVQADDIAAAYYCQQSGESPRTFGGGKVELKRADAAPT VSIFFPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYST SMSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
56	Тяжелая цепь Pi-9067s	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDIYSYSIHWVRQAPGKGLEWVAYIYPSYGYTS YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAVAALDYWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPNLL GGPSVFIFPPKIKDVLMLISLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHRED YNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPE EEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGGSYFMYSKLR VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
57	Легкая цепь Pi-9067s	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPS RFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYGVSGYSLITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCFLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTSL STLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
58	Тяжелая цепь Pi-9067L	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDIYSYSIHWVRQAPGKGLEWVAYIYPSYGYTS YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAVAALDYWGQGLTVTS SAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQ SDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLG GPSVFIFPPKIKDVLMLISLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDY NSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPE EEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGGSYFMYSKLRV EKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
59	Легкая цепь Pi-9067L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPS RFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYGVSGYSLITFGQGTKVEIKRADAAPT VSIFFPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYST SMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое связывается с TREM1 человека (англ.: Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1 – рус.: триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 1) (SEQ ID NO: 1), причем антитело

i) связывается в пределах остатков 21–34 (SEQ ID NO: 42), 103–109 (SEQ ID NO: 43), и 128–136 (SEQ ID NO: 44) TREM1 человека (SEQ ID NO: 1); и

ii) необязательно содержит человеческую область Fc.

2. Выделенное антитело, которое связывается с TREM1 человека (SEQ ID NO: 1), содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), состоящую из трех последовательностей CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и легкую цепь, содержащую последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), состоящую из трех последовательностей CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, причем:

- a. CDR-H1 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23,
- b. CDR-H2 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24,
- c. CDR-H3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 29, где X представляет собой лейцин (L), глутамин (Q), метионин (M), изолейцин (I) или глутаминовую кислоту (E),
- d. CDR-L1 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26,
- e. CDR-L2 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27, и
- f. CDR-L3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28.

3. Выделенное антитело по п. 1, причем антитело содержит CDR-H3, включающую последовательность RXAAMDY (SEQ ID NO: 29), где X представляет собой лейцин (L), глутамин (Q), метионин (M), изолейцин (I) или глутаминовую кислоту (E).

4. Выделенное антитело по п. 1 или п. 3, причем антитело дополнительно содержит CDR-H1, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, и CDR-H2, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24.

5. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, в котором CDR-H3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33; и антитело дополнительно содержит CDR-H1, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23 и CDR-H2, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24.

6. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело дополнительно содержит CDR-L1, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26, CDR-L2, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27, и CDR-L3, включающую последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 28.

7. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело содержит последовательность VH, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 16, 17 или 18.
8. Выделенное антитело по п. 7, причем антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 17.
9. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело содержит последовательность VL, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 20, 21 или 22.
10. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело содержит последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.
11. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 17, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.
12. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело представляет собой scFv.
13. Выделенное антитело по любому из пунктов 1–11, причем антитело представляет собой scFv и содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 17, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.
14. Выделенное антитело по любому из пунктов 1–11, причем антитело представляет собой scFv и содержит последовательность VH, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 16, 17 или 18, и последовательность VL, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 20, 21 или 22.
15. Выделенное антитело по любому из пп. 1–11, причем антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 17, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20; и человеческая область Fc включает Fc человеческого IgG1 дикого типа.
16. Выделенное антитело по любому из пп. 1–11 или 15, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 34, и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 35.
17. Выделенное антитело по п. 2, причем антитело содержит последовательность VH, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 4, 5 или 6.
18. Выделенное антитело по п. 17, причем антитело содержит последовательность VL, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 20, 21, или 22.
19. Выделенное антитело по п. 17 или п. 18, причем антитело содержит последовательность VH, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 8, 9 или 10.
20. Выделенное антитело по п. 2, причем CDR-H3 включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 32, и антитело дополнительно содержит CDR-H1, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, и CDR-H2, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24.
21. Выделенное антитело по п. 20, причем антитело содержит последовательность VH, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 12, 13 или 14.
22. Выделенное антитело по п. 21, причем антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 13.

23. Выделенное антитело по любому из пп. 20–22, причем антитело содержит последовательность VL, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 20, 21 или 22.
24. Выделенное антитело по п. 23, причем антитело содержит последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.
25. Выделенное антитело по любому из пп. 1–24, причем антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 13, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.
26. Выделенное антитело по одному из пп. 20–25, причем антитело представляет собой scFv и содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 13, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.
27. Выделенное антитело по любому из пп. 1–11, причем антитело представляет собой scFv и содержит последовательность VH, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 112, 13 или 14, и последовательность VL, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 20, 21 или 22.
28. Выделенное антитело по любому из пп. 20–25, причем антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 13, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20; и человеческая область Fc включает Fc человеческого IgG1 дикого типа.
29. Выделенное антитело по любому из пп. 20–28, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 36, и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 37.
30. Выделенное антитело по одному из пп. 1–4 или 6, причем антитело состоит из последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 17, 13 или 9; и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 20.
31. Выделенное антитело по одному из пп. 1–6, причем антитело состоит из последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 17; и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 20.
32. Выделенное антитело по одному из пп. 1–4 или 6, причем антитело состоит из последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 13; и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 20.
33. Выделенное антитело по одному из пп. 1–4 или 6, причем антитело состоит из последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 9; и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 20.
34. Выделенное антитело по одному из пп. 1–6, причем антитело состоит из последовательности тяжелой цепи, указанной в SEQ ID NO: 34, и последовательности легкой цепи, указанной в SEQ ID NO: 35.
35. Выделенное антитело по одному из пп. 1–4 или 6, причем антитело состоит из последовательности тяжелой цепи, указанной в SEQ ID NO: 36, и последовательности легкой цепи, указанной в SEQ ID NO: 37.
36. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело является афукозилированным.
37. Выделенное антитело, которое связывается с TREM1 человека (SEQ ID NO: 1), причем антитело является афукозилированным, и антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 17, 13 или 9; и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.

38. Выделенное антитело по п. 37, причем антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 17, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.
39. Выделенное антитело по п. 38, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 34 и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 35.
40. Выделенное антитело по п. 37, причем антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 13, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.
41. Выделенное антитело по п. 40, причем антитело является афукозилированным, и антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 36 и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 37.
42. Выделенное антитело по п. 37, причем антитело содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 9, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 20.
43. Выделенное антитело по п. 42, причем антитело является афукозилированным, и антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 38 и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 39.
44. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело является гуманизированным, человеческим или химерным антителом.
45. Выделенное антитело по п. 44, причем антитело представляет собой гуманизированное антитело.
46. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело содержит человеческую константную область тяжелой цепи класса, выбранного из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.
47. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело содержит область Fc.
48. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, в котором область Fc представляет собой человеческую область Fc.
49. Выделенное антитело по любому из вышеприведенных пунктов, в котором человеческая область Fc содержит человеческую константную область тяжелой цепи класса IgG и подкласса, выбранного из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.
50. Выделенное антитело по п. 49, в котором человеческая область Fc включает Fc человеческого IgG1 дикого типа.
51. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело состоит из последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 17, и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 20; а человеческая область Fc включает Fc человеческого IgG1 дикого типа.
52. Выделенное антитело по любому из вышеприведенных пунктов, в котором область Fc содержит одну или более аминокислотных замен, при этом одна или более замен приводят к увеличению периода полужизни антитела, увеличению активности АЗКЦ, увеличению активности АЗКФ или увеличению активности КЗЦ по сравнению с Fc без одной или более замен.

53. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, в котором область Fc связывает Fcγ-рецептор, выбранный из группы, состоящей из: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa, и FcγRIIIb.
54. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело представляет собой моноклональное антитело.
55. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело связывается с TREM1 человека с K_D меньше или равной около 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7×10^{-9} М, по данным анализа методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).
56. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело связывается с TREM1 человека с K_D меньше или равной около 7 нМ по данным анализа методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).
57. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело является агонистическим антителом.
58. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля.
59. Выделенное антитело по п. 58, в котором по меньшей мере один цитокин или хемокин выбран из группы, состоящей из: ИФН-γ, ИЛ-1α, ИЛ-12, ИЛ-2, TNFSF9, TNFSF10, CXCL9, CXCL10, CCL17, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL11, CXCL15, CCL3, CCL4, CCL2, FasL, CD274, CRTAM, гранзима А (GzmA), или гранзима В (GzmB).
60. Выделенное антитело по п. 59, в котором цитокин или хемокин представляет собой CXCL10 или ИФН-γ.
61. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного миелоидного костимулирующего белка в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля.
62. Выделенное антитело по п. 61, в котором миелоидный костимулирующий белок представляет собой HLA-DR, CD40, CD80 или CD86 в клетке.
63. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело индуцирует повышенную активацию внутриклеточных сигнальных путей ERK и/или STAT3 в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля.
64. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело индуцирует противоопухолевый вторичный иммунный ответ по сравнению с антителом изотипического контроля.
65. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело:
- а. конкурирует за связывание с TREM1 человека с человеческим антителом TREM-26;
 - б. связывается с TREM1 человека;
 - в. связывается с TREM1 яванского макака;

- d. стимулирует сигналинг TREM1;
- e. индуцирует иммунные сигнальные пути;
- f. индуцирует секрецию цитокинов и хемокинов;
- g. индуцирует экспрессию костимулирующих молекул;
- h. уничтожает, инактивирует или истощает миелоидные клетки; или
- i. способно к любой комбинации a.- h.

66. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело имеет активность антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ),

67. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело имеет активность антителозависимого клеточно-опосредованного фагоцитоза (АЗКФ).

68. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело имеет активность комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ).

69. Выделенное антитело по любому из пп. 58–68, в котором клетка представляет собой TREM1+ клетку.

70. Выделенное антитело по п. 69, в котором TREM1+ клетка выбрана из группы, состоящей из: дендритных клеток, опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ), миелоидных супрессорных клеток (МСК), нейтрофилов и опухолеассоциированных нейтрофилов (ОАН).

71. Выделенное антитело по п. 70, в котором TREM1+ клетка представляет собой миелоидную супрессорную клетку или опухолеассоциированный нейтрофил.

72. Выделенное антитело по любому из пп. 1–71, причем антитело перекрестно связывает TREM1 с TREM1 на поверхности TREM1+ клетки.

73. Выделенное антитело по любому из приведенных выше пунктов для применения в качестве лекарственного средства.

74. Выделенное антитело по любому из приведенных выше пунктов для применения в лечении рака или инфекции.

75. Выделенное антитело по любому из приведенных выше пунктов для применения в лечении рака, причем рак выбран из солидной опухоли и гемобластоза.

76. Выделенный полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующих антитело по любому из приведенных выше пунктов, его VH, его VL, его легкую цепь, его тяжелую цепь или его антигенсвязывающую часть; необязательно кДНК.

77. Вектор или набор векторов, содержащий полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. 76.

78. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. 76, или вектор, или набор векторов по п. 77.

79. Способ получения антитела, включающий проведение экспрессии антитела с использованием клетки-хозяина по п. 78 и выделение экспрессированного антитела.
80. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1–75 и фармацевтически приемлемый эксципиент.
81. Набор, содержащий антитело по любому из пп. 1–75 или фармацевтическую композицию по п. 80 и инструкции по применению.
82. Способ повышения иммунного ответа, включающий введение субъекту композиции, содержащей антитело к TREM1 или его антигенсвязывающий фрагмент.
83. Способ по п. 82, в котором композиция содержит антитело по любому из пп. 1–75 или фармацевтическую композицию по п. 80.
84. Способ по п. 82, в котором антитело имеет активность, блокирующую рецептор-лиганд, агонистическую или антагонистическую активность.
85. Способ по п. 84, в котором антитело обладает агонистической активностью.
86. Способ по любому из пп. 82–85, в котором антитело индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля.
87. Способ по п. 86, в котором по меньшей мере один цитокин или хемокин выбран из группы, состоящей из: ИФН- γ , ИЛ-1 α , ИЛ-12, ИЛ-2, TNFSF9, TNFSF10, CXCL9, CXCL10, CCL17, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL11, CXCL15, CCL3, CCL4, CCL2, FasL, CD274, CRTAM, гранзима A (GzmA), или гранзима B (GzmB).
88. Способ по п. 87, в котором цитокин или хемокин представляет собой CXCL10 или ИФН- γ .
89. Способ по любому из пп. 82–88, в котором антитело индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного миелоидного костимулирующего белка по сравнению с антителом изотипического контроля.
90. Способ по п. 89, в котором миелоидный костимулирующий белок представляет собой HLA-DR, CD40, CD80 или CD86 в клетке.
91. Способ по любому из пп. 82–90, в котором антитело индуцирует повышенную активацию внутриклеточных сигнальных путей ERK и/или STAT3 в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля.
92. Способ по любому из пп. 82–91, в котором антитело индуцирует вторичный иммунный ответ.
93. Способ по любому из пп. 82–92, в котором клетка представляет собой TREM1+ клетку.
94. Способ по п. 93, в котором TREM1+ клетка выбрана из группы, состоящей из: дендритных клеток, опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ), миелоидных супрессорных клеток (МСК), нейтрофилов и опухолеассоциированных нейтрофилов (ОАН).
95. Способ по п. 94, в котором TREM1+ клетка представляет собой миелоидную супрессорную клетку или опухолеассоциированный нейтрофил.

96. Способ по любому из пп. 82–95, в котором антитело перекрестно связывает TREM1 с TREM1 на поверхности TREM1+ клетки.
97. Способ по любому из пп. 82–96, в котором субъект представляет собой человека.
98. Способ лечения рака, включающий введение субъекту композиции, содержащей антитело к TREM1 или его антигенсвязывающий фрагмент.
99. Способ по п. 98, в котором композиция содержит антитело по любому из пп. 1–75 или фармацевтическую композицию по п. 80.
100. Способ по п. 98, в котором антитело имеет активность, блокирующую рецептор-лиганд, агонистическую или антагонистическую активность.
101. Способ по п. 98, в котором антитело обладает агонистической активностью.
102. Способ по любому из пп. 98–101, в котором антитело индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля.
103. Способ по п. 102, в котором по меньшей мере один цитокин или хемокин выбран из группы, состоящей из: ИФН- γ , ИЛ-1 α , ИЛ-12, ИЛ-2, TNFSF9, TNFSF10, CXCL9, CXCL10, CCL17, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL11, CXCL15, CCL3, CCL4, CCL2, FasL, CD274, CRTAM, гранзима A (GzmA), или гранзима B (GzmB).
104. Способ по п. 103, в котором цитокин или хемокин представляет собой CXCL10 или ИФН- γ .
105. Способ по любому из пп. 98–104, в котором антитело индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного миелоидного костимулирующего белка по сравнению с антителом изотипического контроля.
106. Способ по п. 105, в котором миелоидный костимулирующий белок представляет собой HLA-DR, CD40, CD80 или CD86 в клетке.
107. Способ по любому из пп. 98–106, в котором антитело индуцирует повышенную активацию внутриклеточных сигнальных путей ERK и/или STAT3 в клетке по сравнению с антителом изотипического контроля.
108. Способ по любому из пп. 98–107, в котором антитело индуцирует противоопухолевый вторичный иммунный ответ по сравнению с антителом изотипического контроля.
109. Способ по п. 98, в котором антитело имеет активность антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ).
110. Способ по п. 98, в котором антитело имеет активность комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ).
111. Способ по п. 98, в котором антитело имеет активность антитело-опосредованного фагоцитоза (АЗКФ).
112. Способ по любому из пп. 98–108, в котором клетка представляет собой TREM1+ клетку.
113. Способ по п. 112, в котором TREM1+ клетка выбрана из группы, состоящей из: дендритных клеток, опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ), миелоидных супрессорных клеток (МСК), нейтрофилов и опухолеассоциированных нейтрофилов (ОАН).

114.Способ по п. 113, в котором TREM1+ клетка представляет собой миелоидную супрессорную клетку или опухолеассоциированный нейтрофил.

115.Способ по любому из пп. 98–114, в котором антитело перекрестно связывает TREM1 с TREM1 на поверхности TREM1+ клетки.

116.Способ по любому из пп. 98–115, в котором субъект представляет собой человека.

117.Способ по любому из пп. 98–116, в котором рак представляет собой солидную опухоль.

118.Способ по любому из пп. 98–117, в котором рак представляет собой гемобластоз.

119.Способ по любому из пп. 98–118, в котором рак выбран из группы, состоящей из: меланомы, рака почек, гепатобилиарного рака, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКГШ), рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака мочевого пузыря, рака уротелия, глиобластомы, рака предстательной железы, рака легкого, рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, рака пищевода, рака почек, рака эндометрия, рака шейки матки, рака яичек и мезотелиомы.

120.Способ по п. 119, в котором рак представляет собой рак желудка, рак яичников, рак толстой кишки или рак молочной железы.

121.Способ по любому из пп. 98–120, в котором приведение в контакт усиливает иммунный ответ у субъекта.

122.Способ по п. 121, в котором усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ.

123.Способ по п. 122, в котором усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.

124.Способ по любому из пп. 98–123, в котором субъект ранее получал, получает одновременно или будет получать в дальнейшем иммунотерапию.

125.Способ по п. 124, в котором иммунотерапия представляет собой по меньшей мере одно из: ингибитора контрольной точки; ингибитора контрольной точки Т-клеток; антитела к PD1; антитела к PDL1; антитела к CTLA4; адаптивной клеточной терапии; адаптивной Т-клеточной терапии; CAR-Т-клеточной терапии; вакцины из дендритных клеток; агониста STING; моноцитарной вакцины; вакцины бацилл Кальметта-Герена; антигенсвязывающего белка, который связывает как Т-клетку, так и антигенпрезентирующую клетку; двойного антигенсвязывающего белка BiTE; лиганда толл-подобного рецептора; цитокина; цитотоксической терапии; химиотерапии; лучевой терапии; низкомолекулярного ингибитора; низкомолекулярного агониста; иммуномодулятора; онколитического вируса; и эпигенетического модулятора.

126.Способ по п. 125, в котором иммунотерапия выбрана из группы, состоящей из: антитела к PD1, антитела к PDL1; или антитела к CTLA4.

127.Способ уничтожения, инактивации или истощения миелоидных клеток, которые экспрессируют на клеточной поверхности триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 1, (TREM1),

включающий приведение в контакт миелоидных клеток с антителом по любому из пп. 1–75 или фармацевтической композицией по п. 80.

128.Способ по п. 127, в котором антитело уничтожает, инактивирует или истощает миелоидные клетки по меньшей мере одним из АЗКЦ, КЗЦ и АЗКФ, необязательно при этом антитело уничтожает, инактивирует или истощает миелоидные клетки путем АЗКЦ, при этом необязательно антитело уничтожает, инактивирует или истощает миелоидные клетки путем КЗЦ, и при этом необязательно антитело уничтожает, инактивирует или истощает миелоидные клетки путем АЗКФ.

129.Способ по п. 127 или п. 128, в котором антитело уничтожает миелоидные клетки путем по меньшей мере одного из АЗКЦ, КЗЦ и АЗКФ.

130.Способ по любому из пп.127–129, в котором антитело инактивирует миелоидные клетки путем по меньшей мере одного из АЗКЦ, КЗЦ и АЗКФ.

131.Способ по любому из пп. 127–129, в котором антитело уничтожает миелоидные клетки путем по меньшей мере одного из АЗКЦ, КЗЦ и АЗКФ.

132.Способ по любому из пп. 127–131, в котором антитело имеет активность антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ).

133.Способ по любому из пп. 127–131, в котором антитело имеет активность комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ).

134.Способ по любому из пп. 127–131, в котором антитело имеет активность антитело-опосредованного фагоцитоза (АЗКФ).

135.Способ по любому из пп. 127–134, в котором антитело имеет активность, блокирующую рецептор-лиганд, агонистическую или антагонистическую активность.

136.Способ по любому из пп. 127–135, в котором миелоидные клетки представляют собой стимулирующие миелоидные клетки.

137.Способ по любому из пп. 127–135, в котором миелоидные клетки представляют собой нестимулирующие миелоидные клетки.

138.Способ по одному из пп. 127–137, в котором миелоидные клетки включают по меньшей мере одну из дендритных клеток, опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ), нейтрофилов, моноцитов или миелоидных супрессорных клеток.

139.Способ по п. 138, в котором миелоидные клетки представляют собой нейтрофилы или опухолеассоциированные нейтрофилы.

140.Способ по п. 139, в котором миелоидные клетки представляют собой опухолеассоциированные макрофаги.

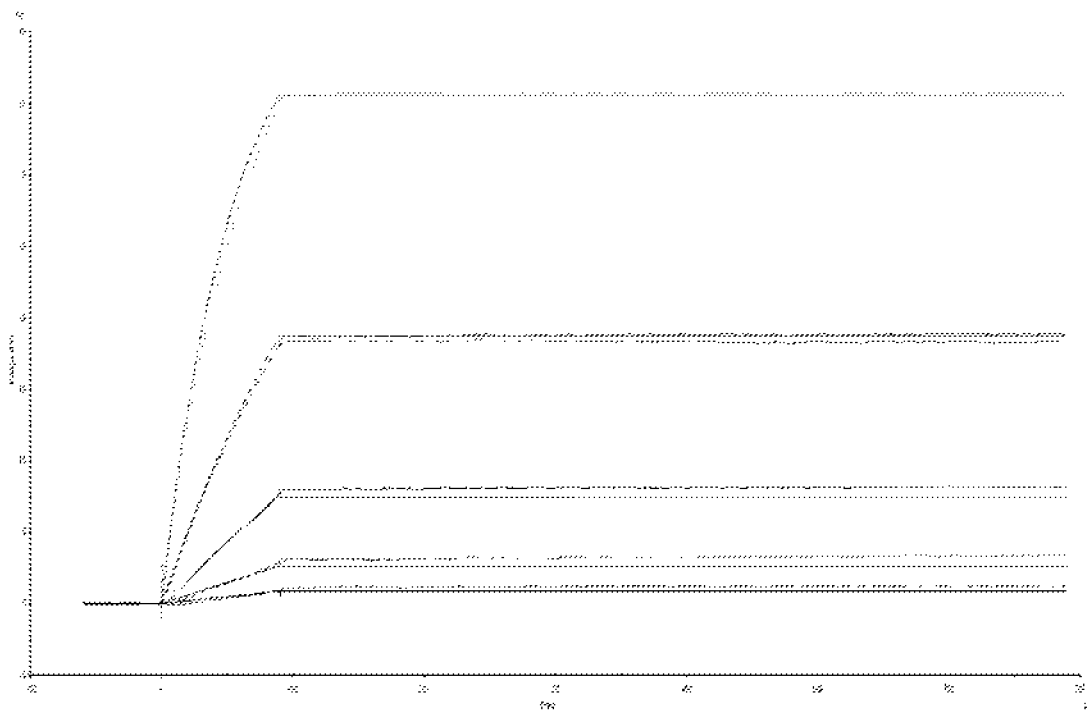
141.Способ по п. 138, в котором миелоидные клетки представляют собой моноцитарные миелоидные супрессорные клетки.

142. Способ по любому из пп. 127–141, в котором миелоидные клетки являются внутриопухолевыми.
143. Способ по любому из пп. 127–142, в котором миелоидные клетки находятся в популяции иммунных клеток, включающей стимулирующие миелоидные клетки и нестимулирующие миелоидные клетки.
144. Способ по любому из пп. 127–143, в котором приведение в контакт осуществляют *in vitro* или *in vivo*.
145. Способ по любому из пп. 127–144, в котором приведение в контакт осуществляют *in vivo* у субъекта, необязательно при этом субъект имеет рак.
146. Способ по любому из пп. 127–145, в котором субъект представляет собой человека.
147. Способ по любому из пп. 127–146, в котором рак представляет собой солидную опухоль.
148. Способ по любому из пп. 127–146, в котором рак представляет собой гемобластоз.
149. Способ по п. 146, в котором рак выбран из группы, состоящей из: меланомы, рака почек, гепатобилиарного рака, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКГШ), рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака мочевого пузыря, рака уротелия, глиобластомы, рака предстательной железы, рака легкого, рака молочной железы, рака яичников, рака желудка, рака пищевода, рака почек, рака эндометрия, рака шейки матки, рака яичек и мезотелиомы.
150. Способ по п. 149, в котором рак представляет собой рак желудка, рак яичников, рак толстой кишки или рак молочной железы.
151. Способ по п. 150, в котором приведение в контакт усиливает иммунный ответ у субъекта.
152. Способ по п. 151, в котором усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ.
153. Способ по п. 151, в котором усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.
154. Способ по п. 151, в котором усиленный иммунный ответ включает экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина.
155. Способ по п. 154, в котором по меньшей мере один цитокин или хемокин выбран из группы, состоящей из: ИФН- γ , ИЛ-1 α , ИЛ-12, ИЛ-2, TNFSF9, TNFSF10, CXCL9, CXCL10, CCL17, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL11, CXCL15, CCL3, CCL4, CCL2, FasL, CD274, CRTAM, гранзима A (GzmA), или гранзима B (GzmB).
156. Способ по п. 155, в котором по меньшей мере один цитокин или хемокин представляет собой CXCL10 или ИФН- γ .
157. Способ по любому из пп. 127–156, в котором субъект ранее получал, получает одновременно или будет получать в дальнейшем иммунотерапию.
158. Способ по п. 157, в котором иммунотерапия представляет собой по меньшей мере одно из: ингибитора контрольной точки; ингибитора контрольной точки Т-клеток; антитела к PD1; антитела к PDL1; антитела к CTLA4; адаптивной клеточной терапии; адаптивной Т-клеточной терапии; CAR-Т-клеточной терапии; вакцины из дендритных клеток; агониста STING; моноцитарной вакцины; вакцины бацилл Кальметта-

Герена; антигенсвязывающего белка, который связывает как Т-клетку, так и антигенпрезентирующую клетку; двойного антигенсвязывающего белка ViTE; лиганда толл-подобного рецептора; цитокина; цитотоксической терапии; химиотерапии; лучевой терапии; низкомолекулярного ингибитора; низкомолекулярного агониста; иммуномодулятора; онколитического вируса; и эпигенетического модулятора.

159.Способ по п. 158, в котором иммунотерапия выбрана из группы, состоящей из: антитела к PD1, антитела к PDL1; или антитела к CTLA4.

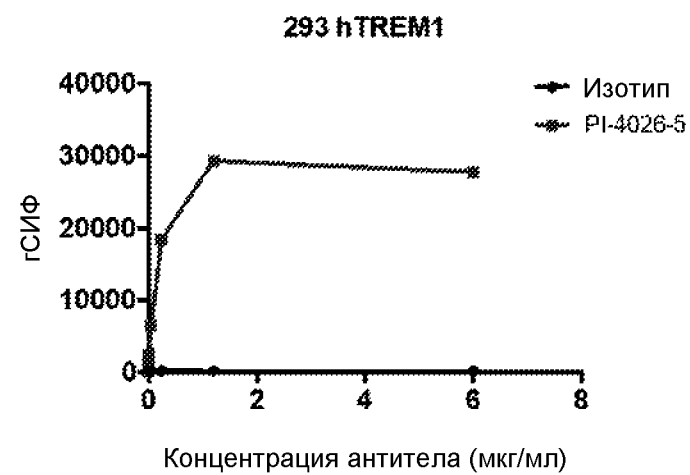
Фиг. 1



Фиг. 2А



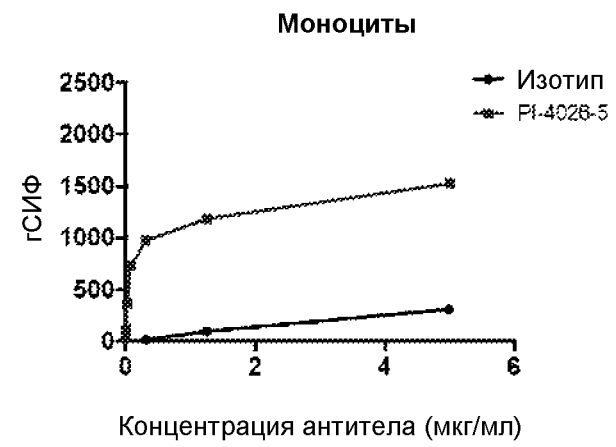
Фиг. 2В



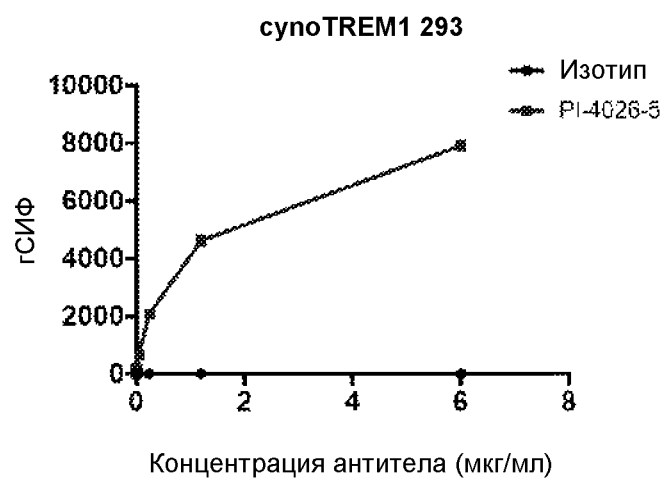
Фиг. 3А



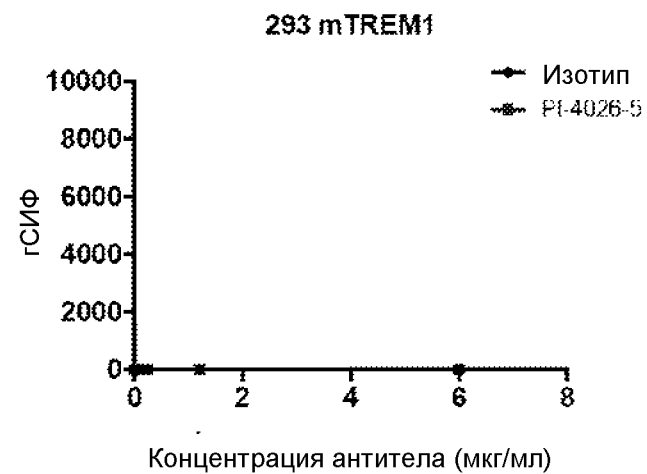
Фиг. 3В



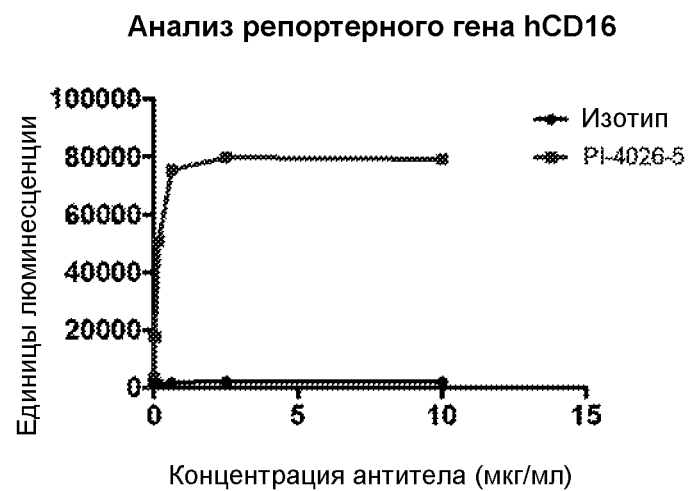
Фиг. 4А



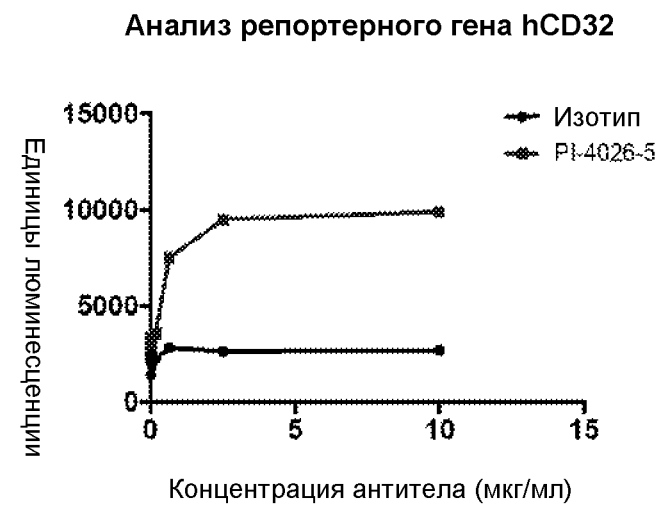
Фиг. 4В



Фиг. 5А



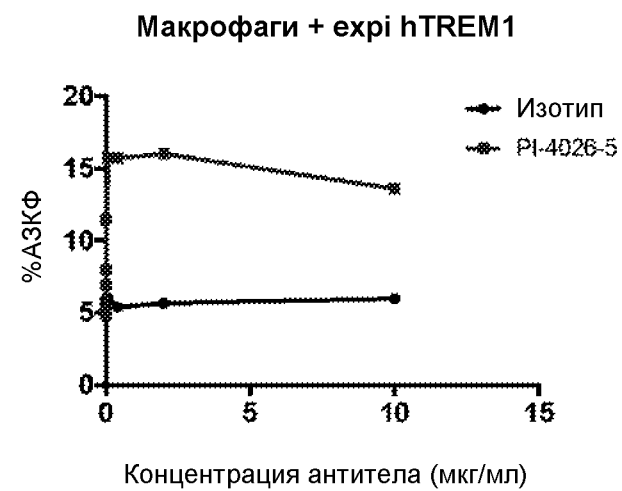
Фиг. 5В



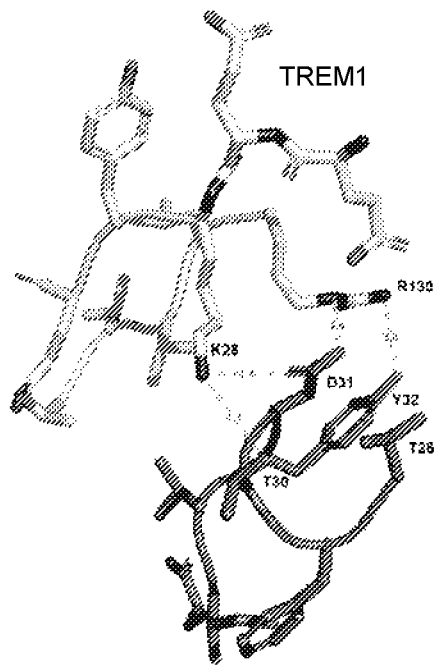
Фиг. 6А



Фиг. 6В

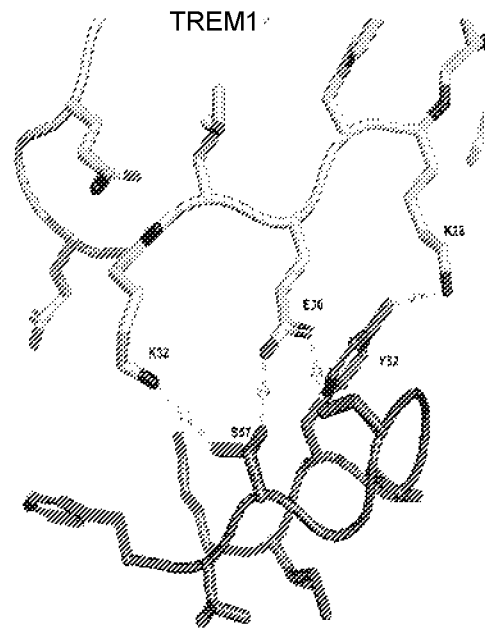


Фиг. 7А



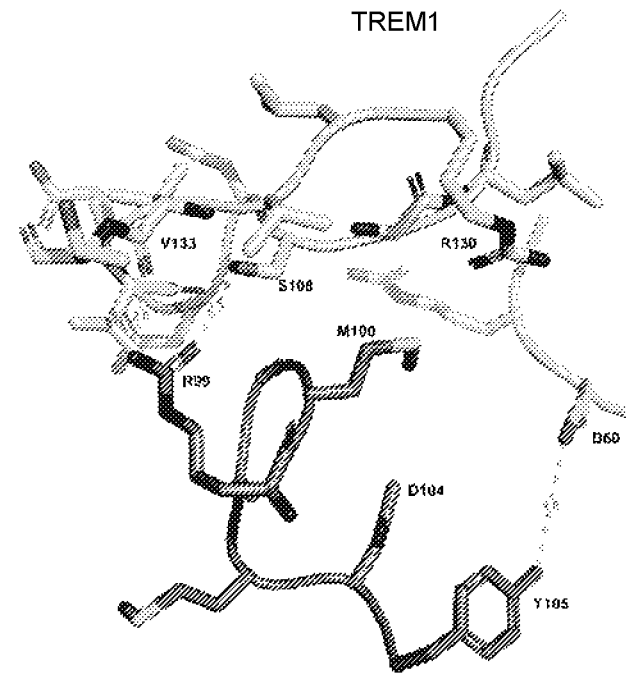
Fab PI-4026

Фиг.7В



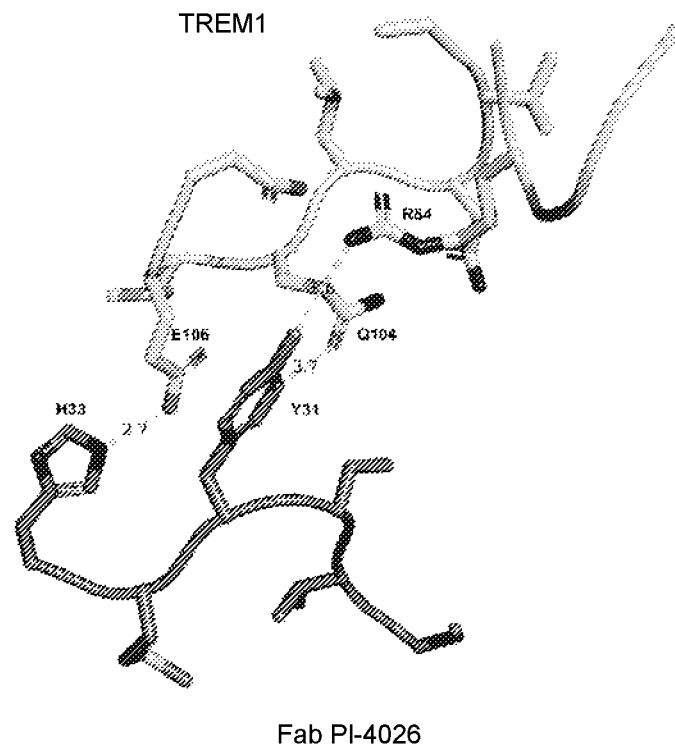
Fab PI-4026

Фиг. 7С

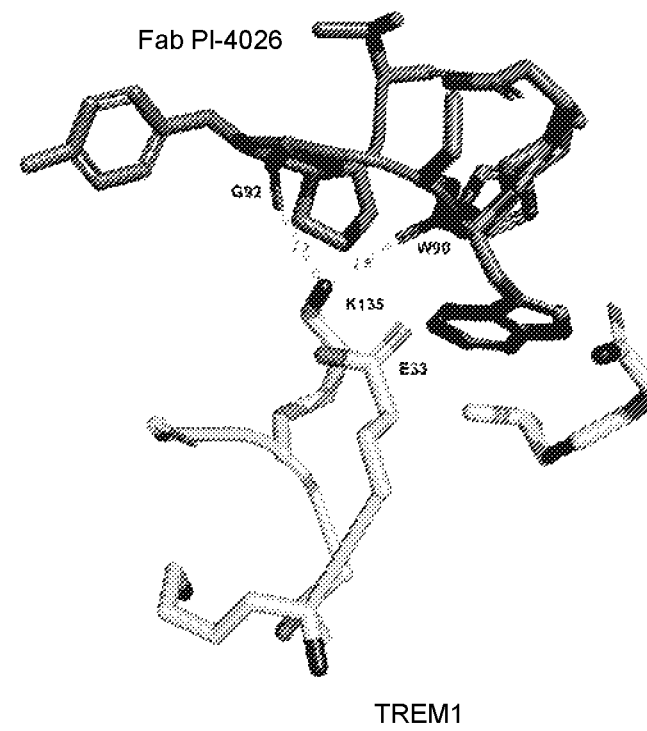


Fab PI-4026

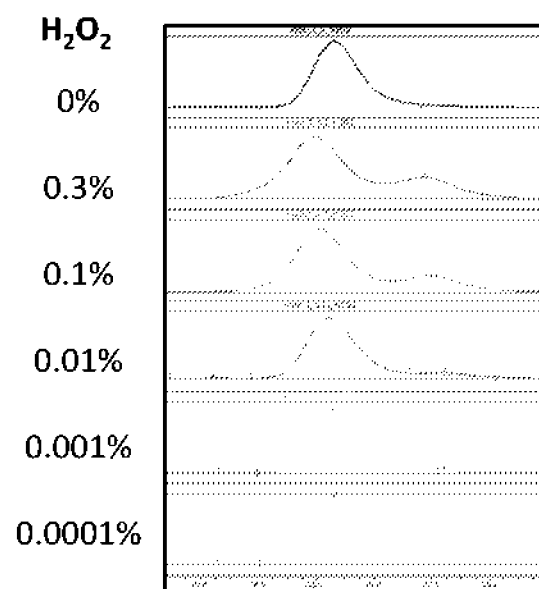
Фиг. 7D



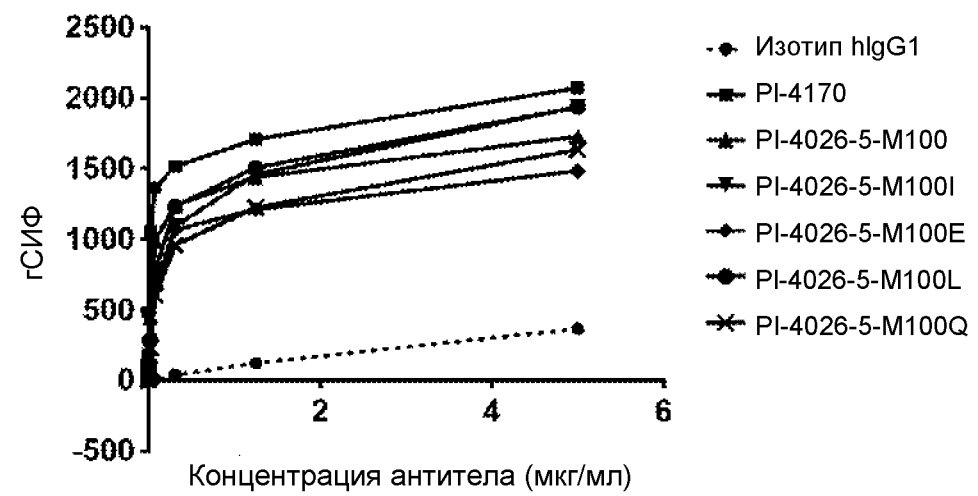
Фиг. 7E



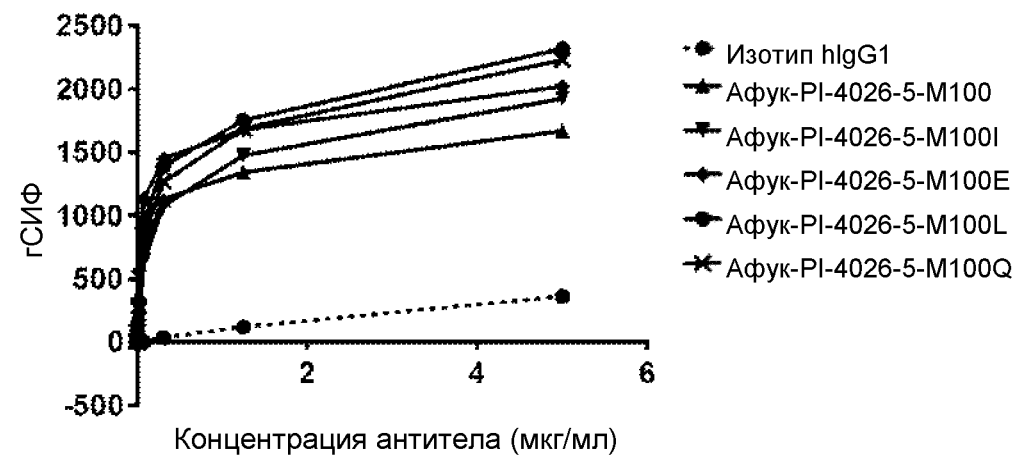
Фиг. 8



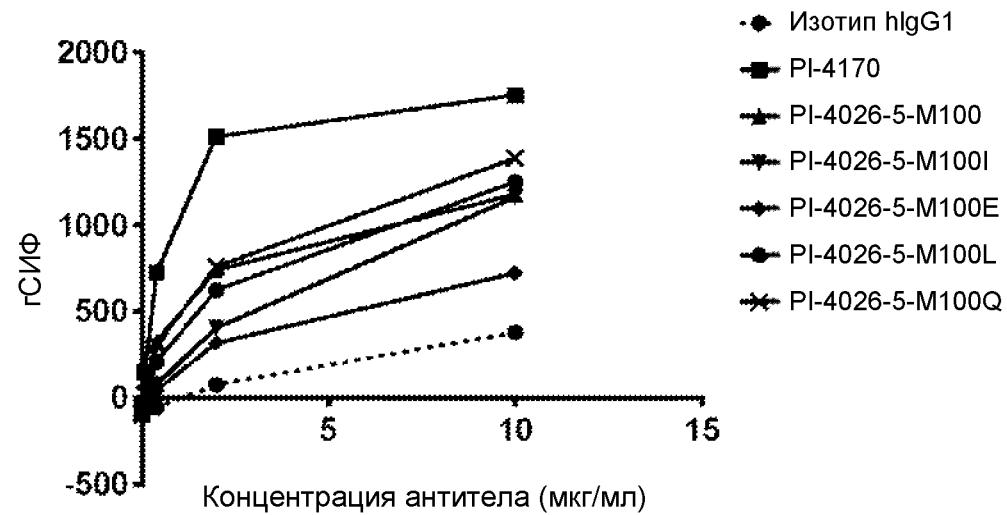
Фиг. 9А



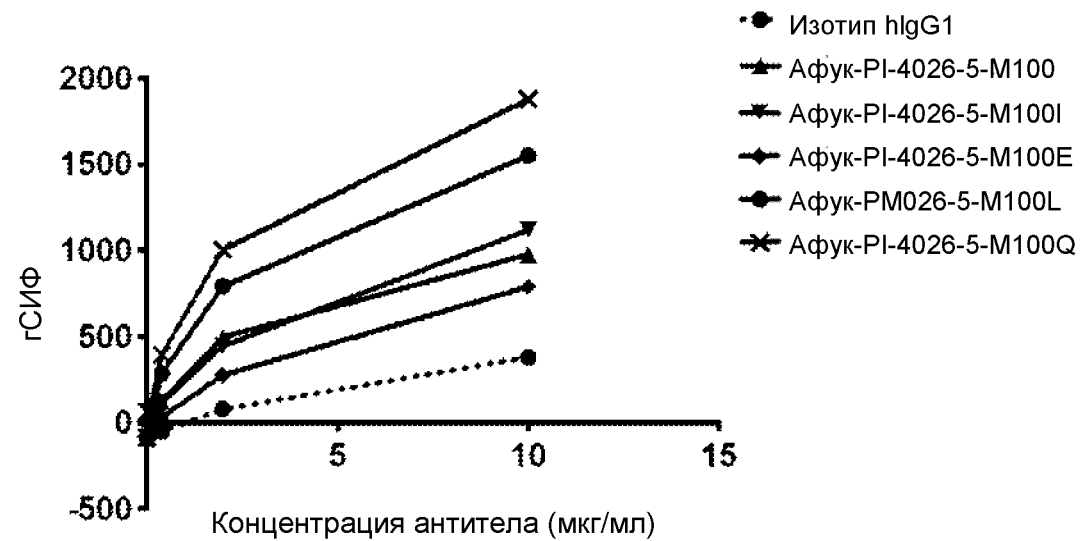
Фиг. 9В



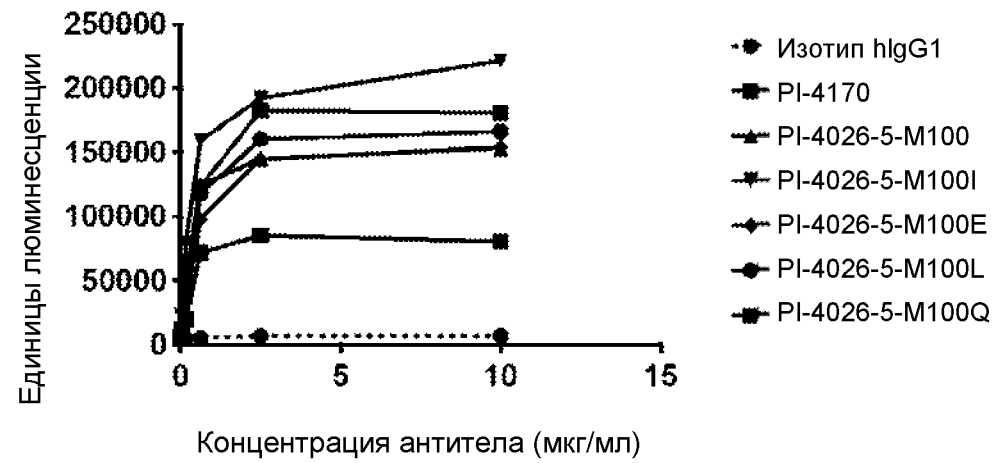
Фиг. 10А



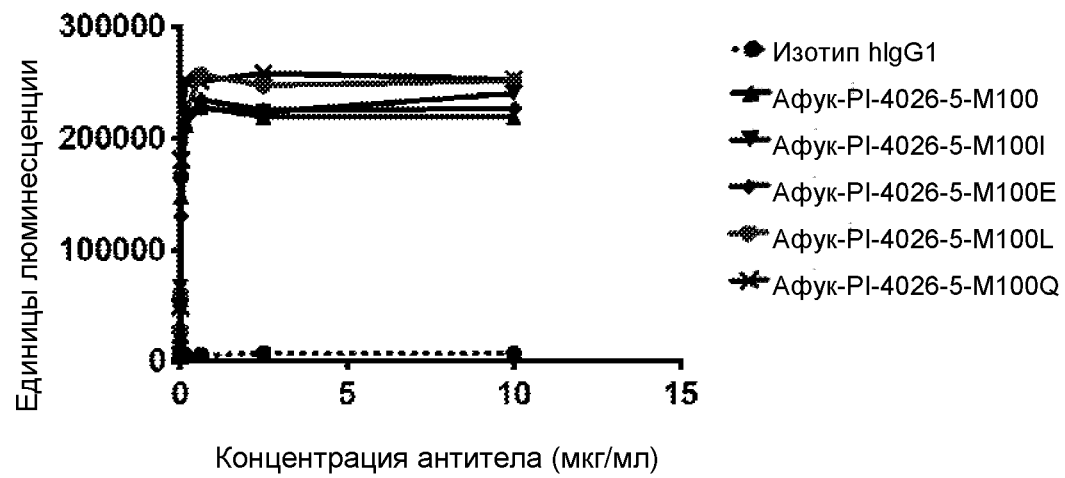
Фиг. 10В



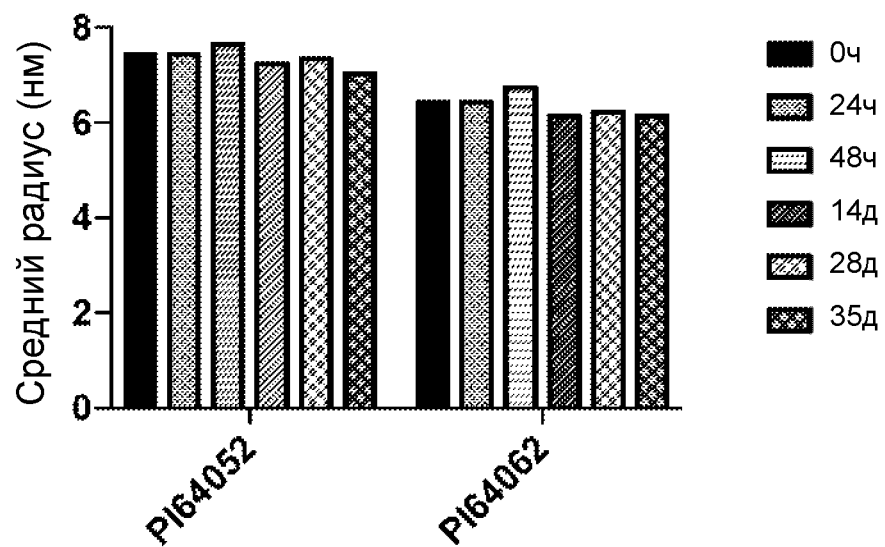
Фиг. 11А



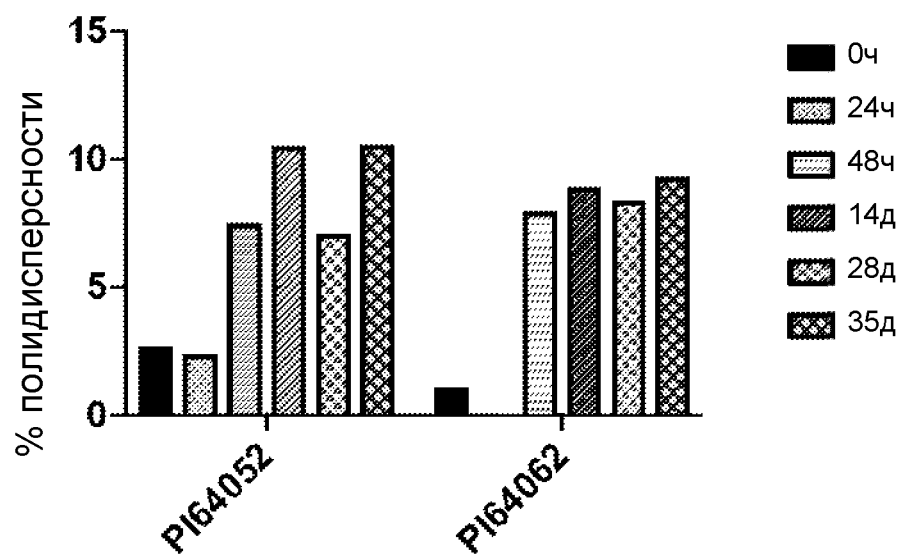
Фиг. 11В



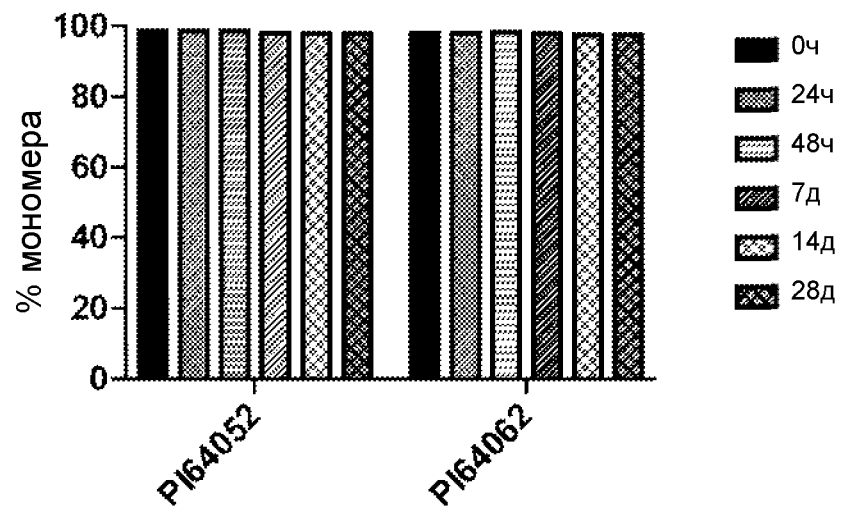
Фиг. 12А



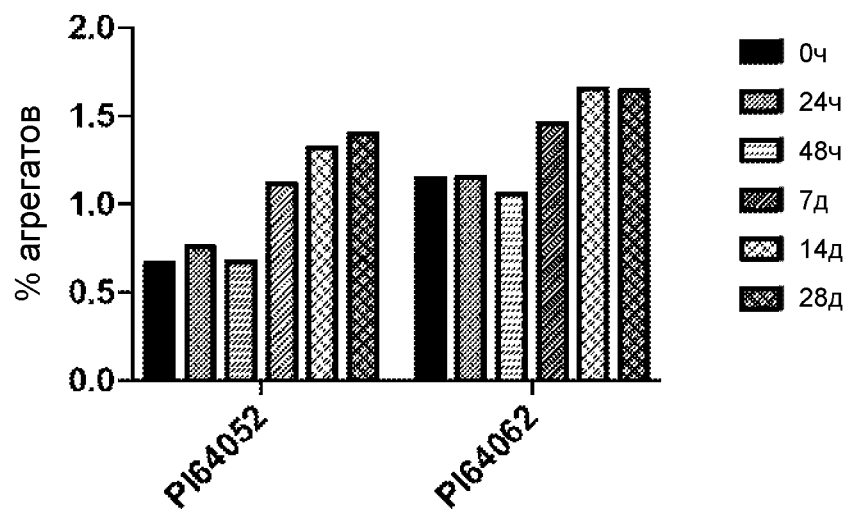
Фиг. 12В



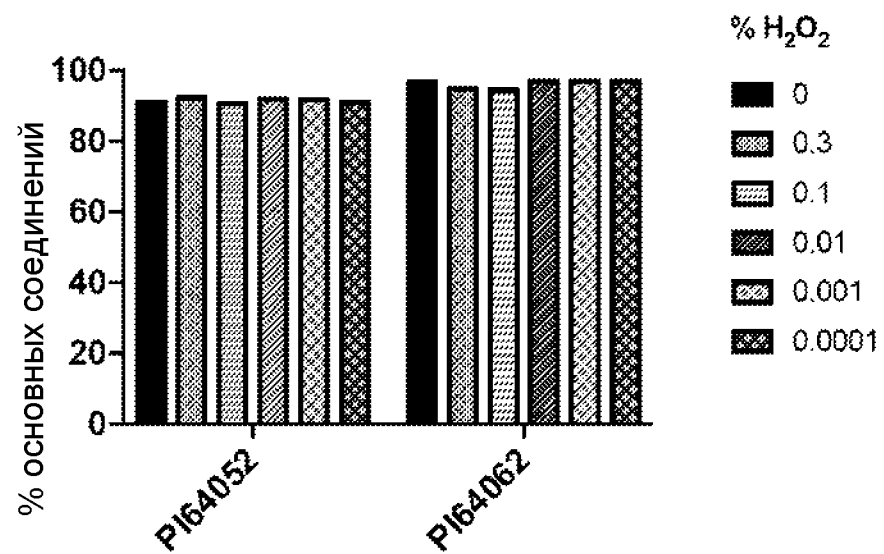
Фиг. 13А



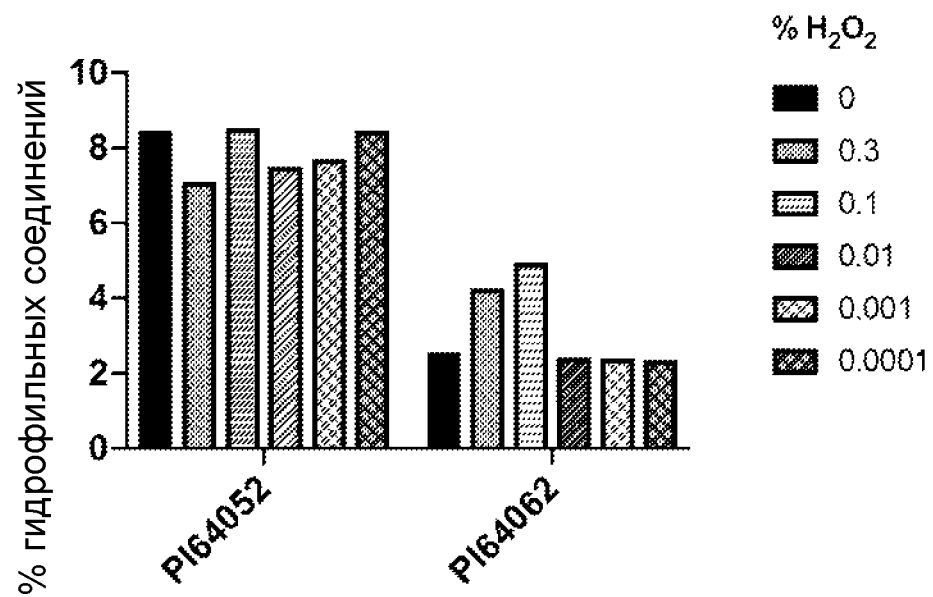
Фиг. 13В



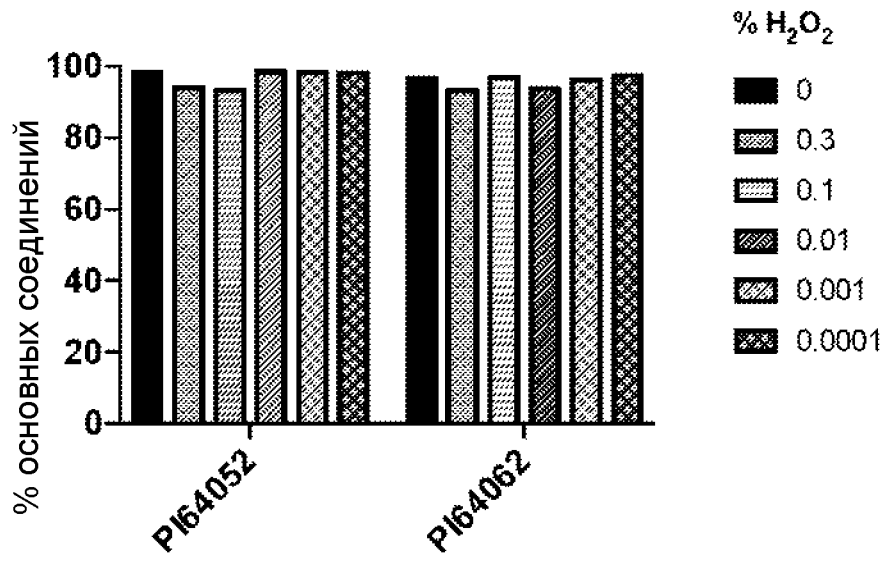
Фиг. 14А



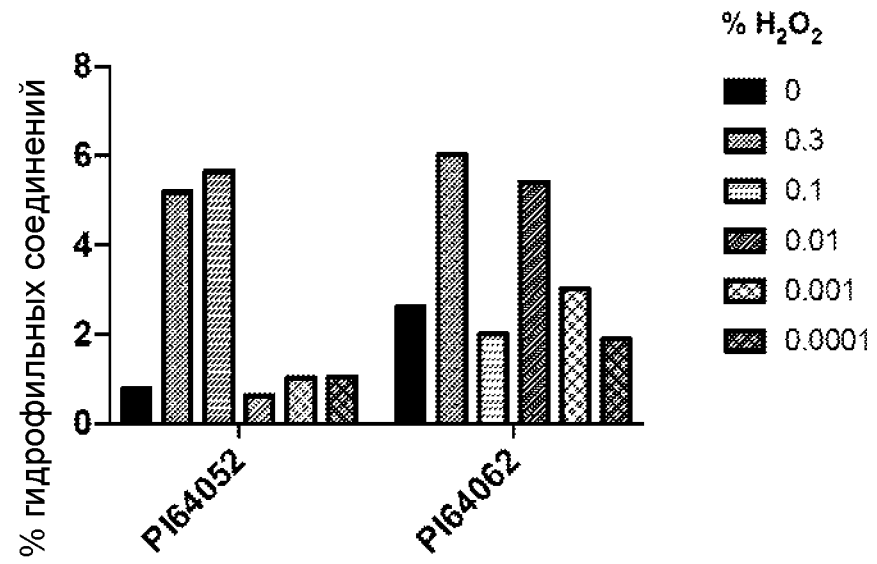
Фиг. 14В



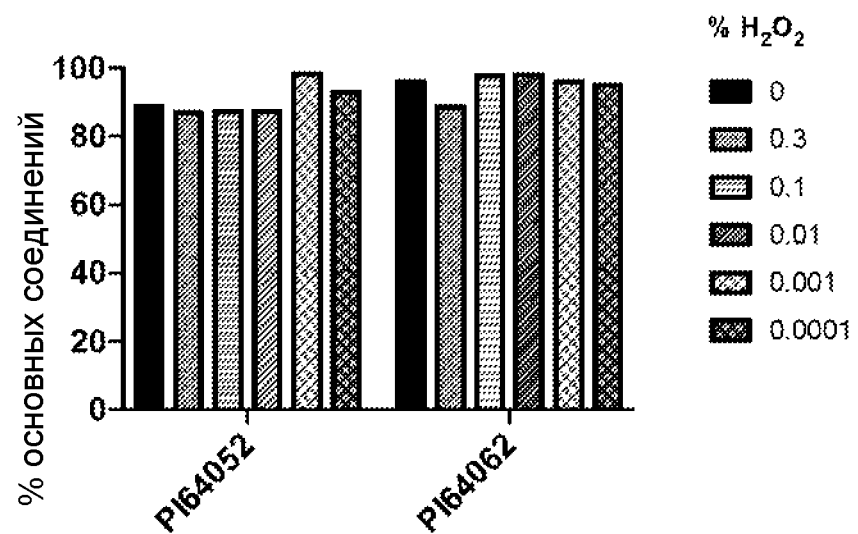
Фиг. 15A



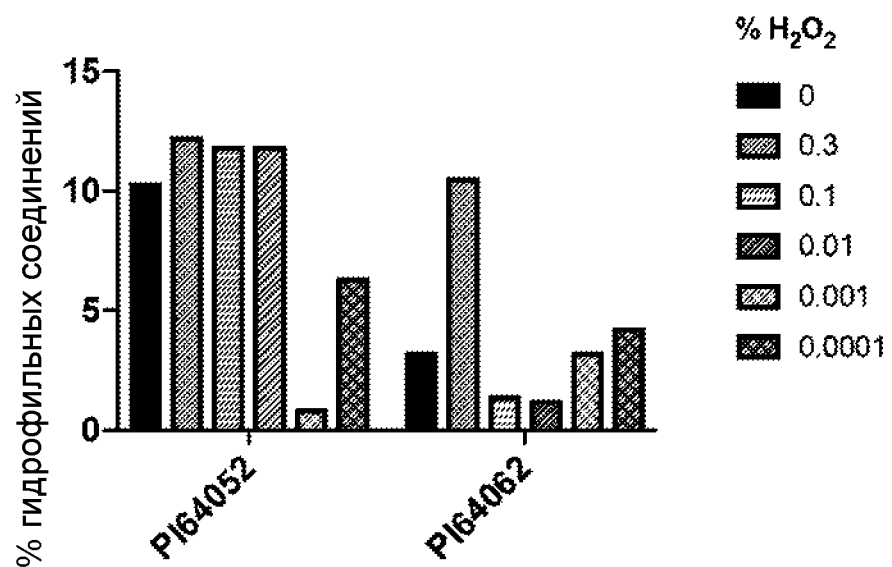
Фиг. 15B



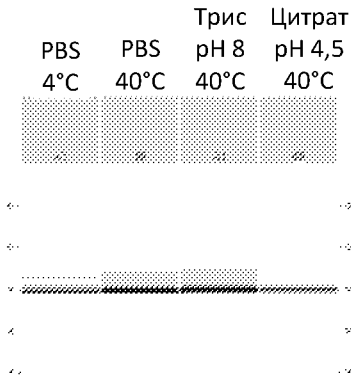
Фиг. 16А



Фиг. 16В

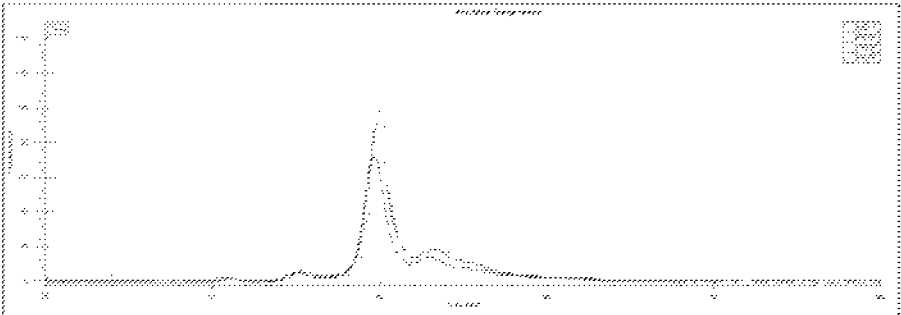


Фиг. 17А

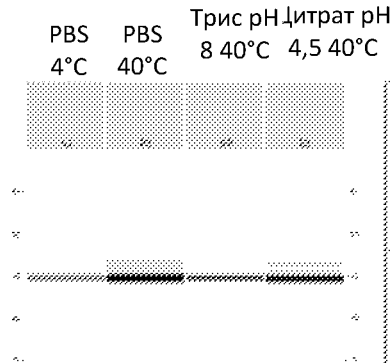


Фиг. 17В

PI64052

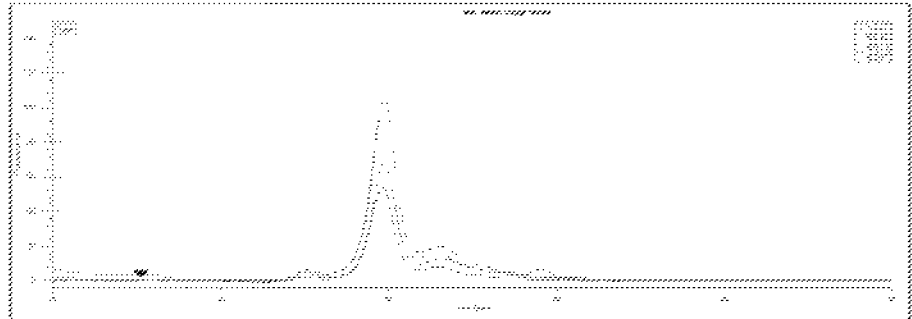


Фиг. 17С

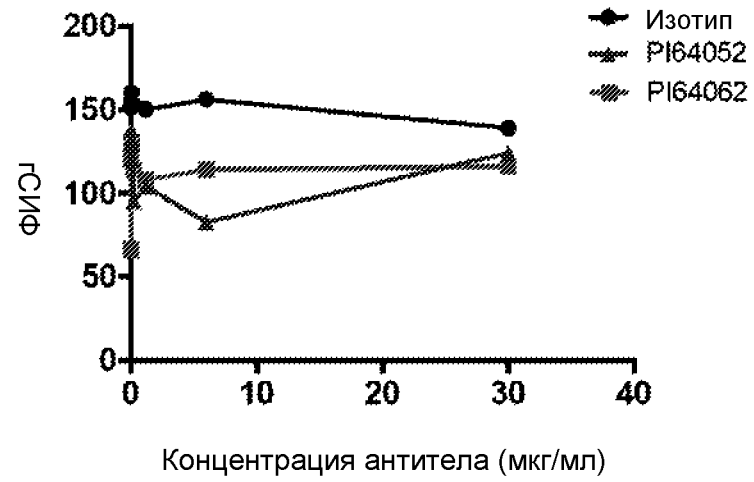


Фиг. 17D

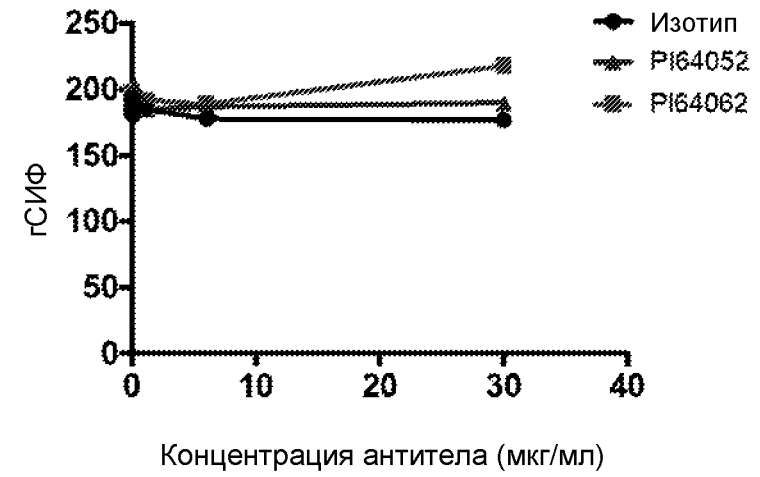
PI64062



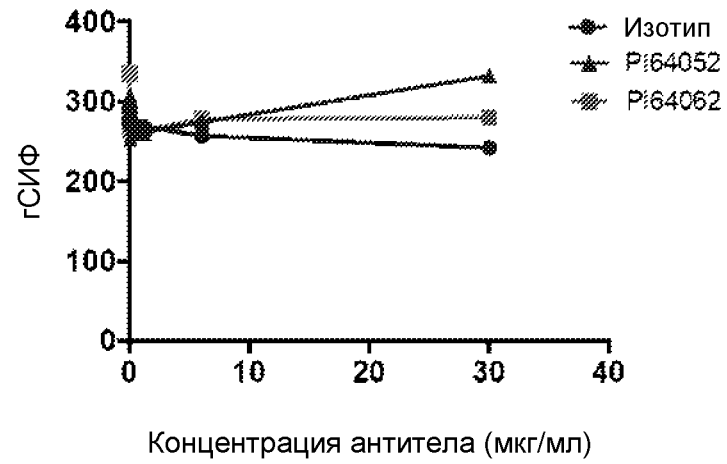
Фиг. 18А



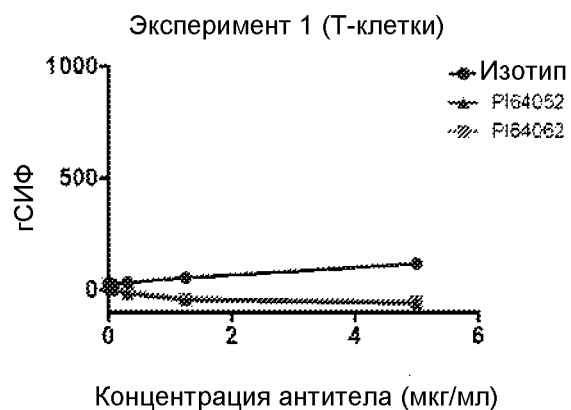
Фиг. 18В



Фиг. 18С



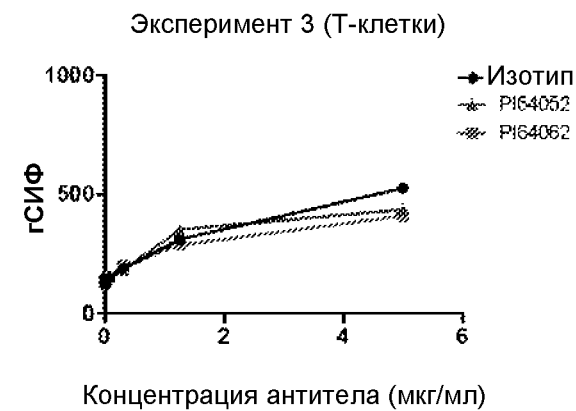
Фиг. 19А



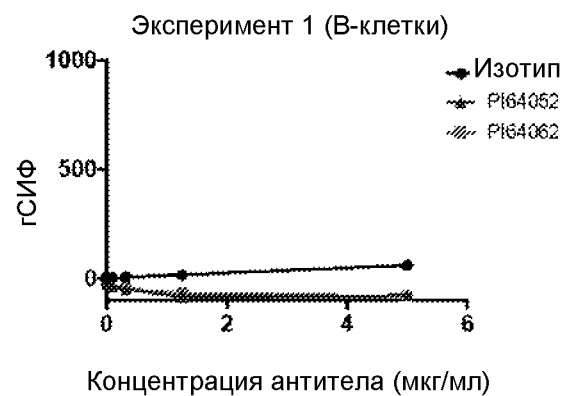
Фиг. 19В



Фиг. 19С



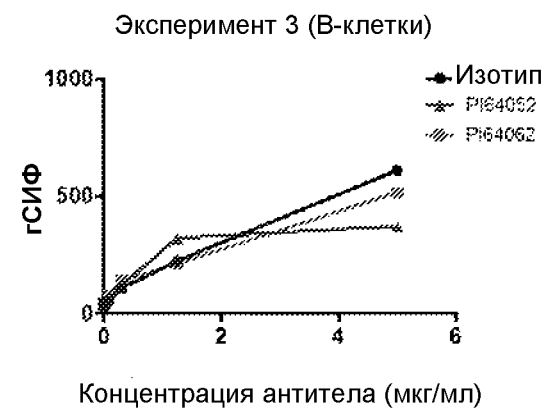
Фиг. 19D



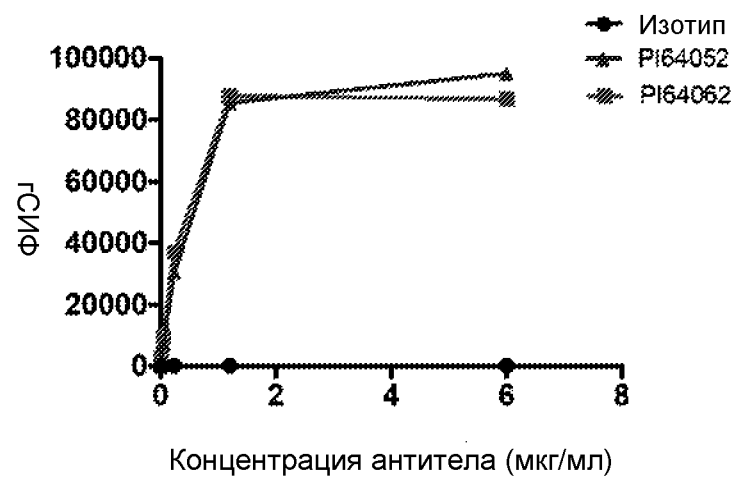
Фиг. 19Е



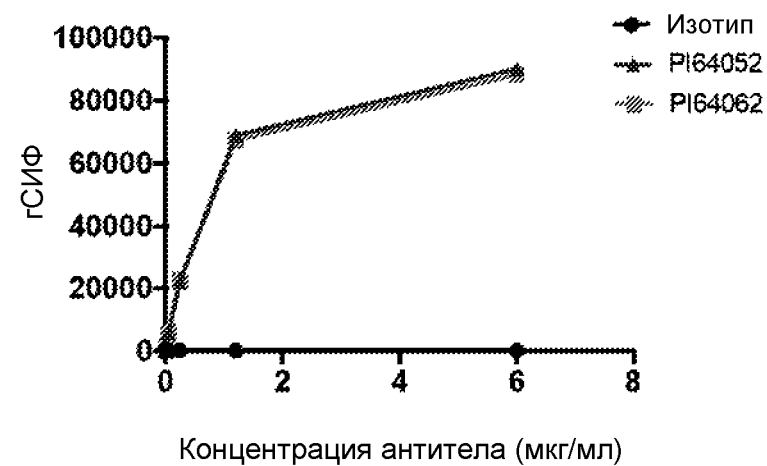
Фиг. 19F



Фиг. 20А



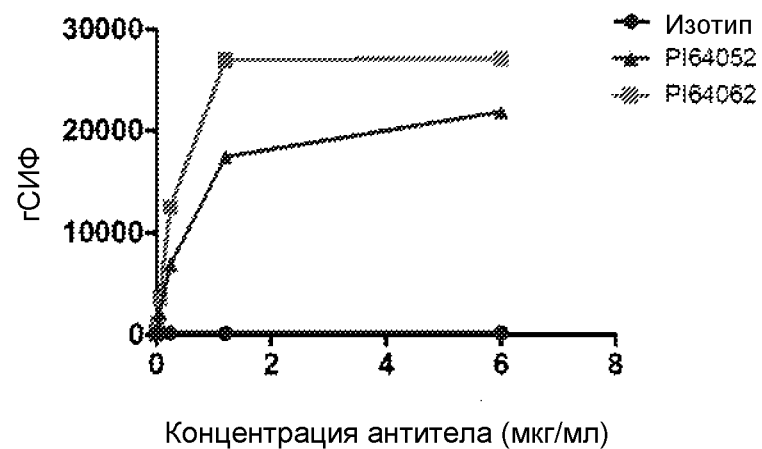
Фиг. 20В



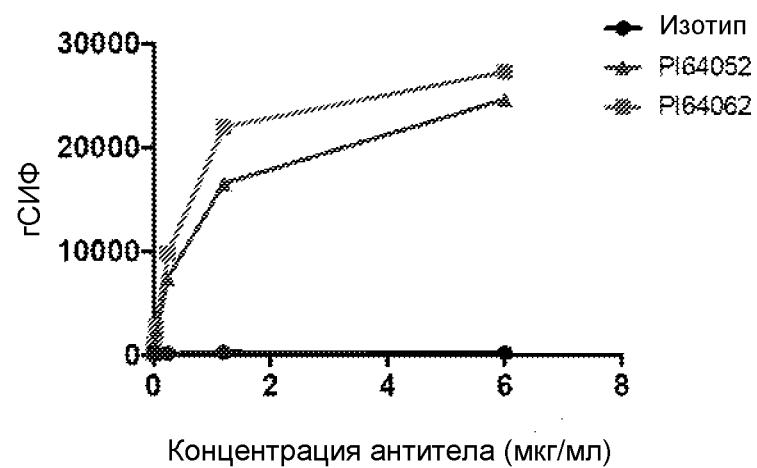
Фиг. 20С



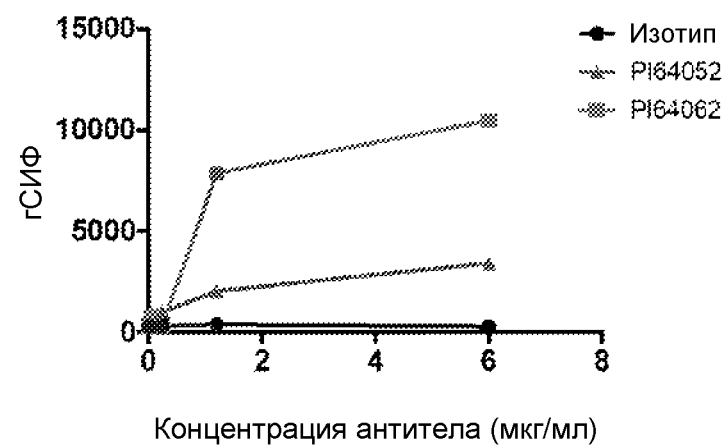
Фиг. 21А



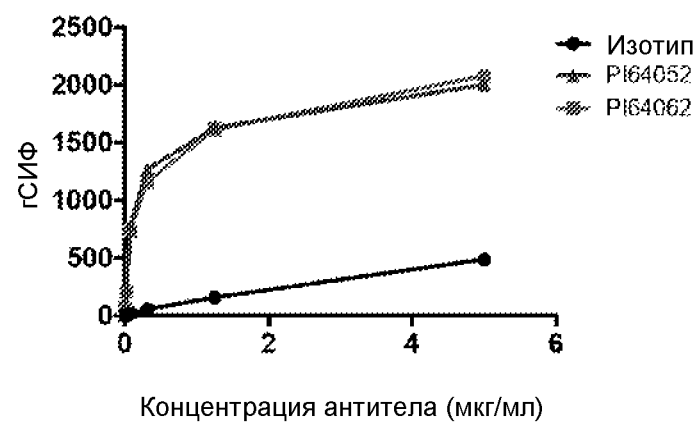
Фиг. 21В



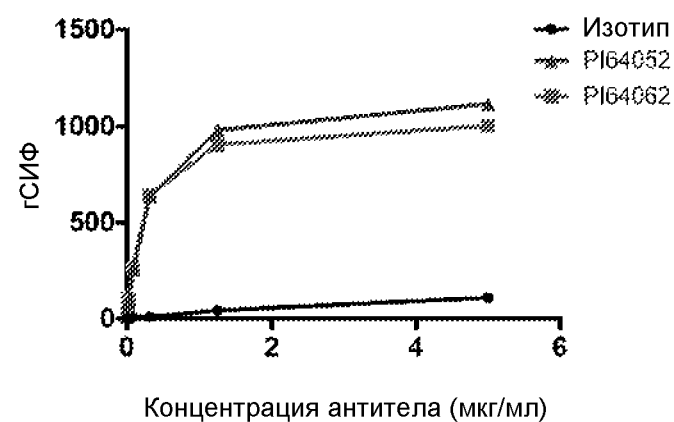
Фиг. 21С



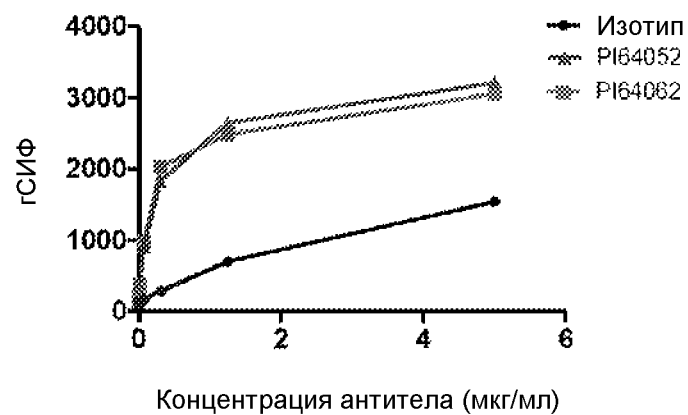
Фиг. 22А



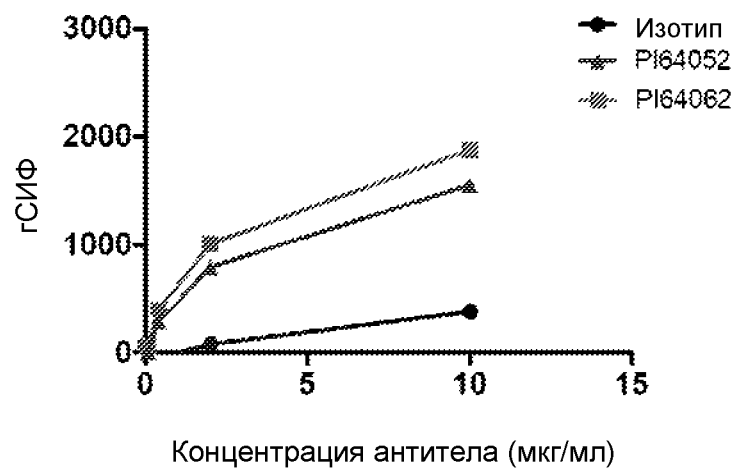
Фиг. 22В



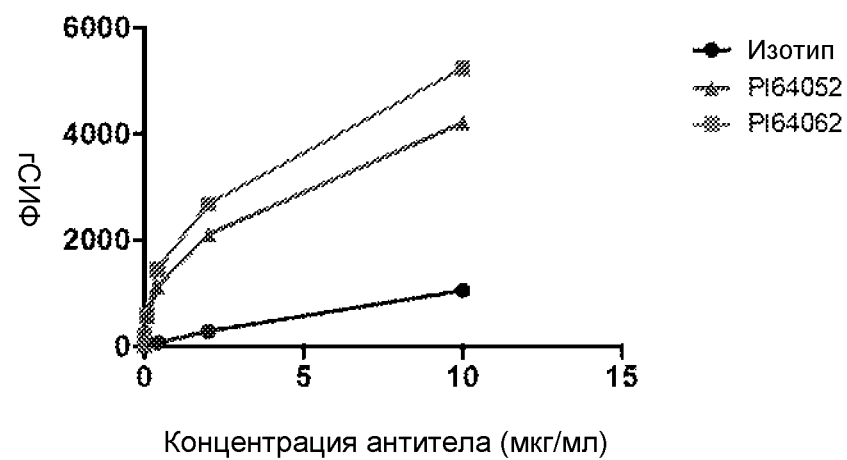
Фиг. 22С



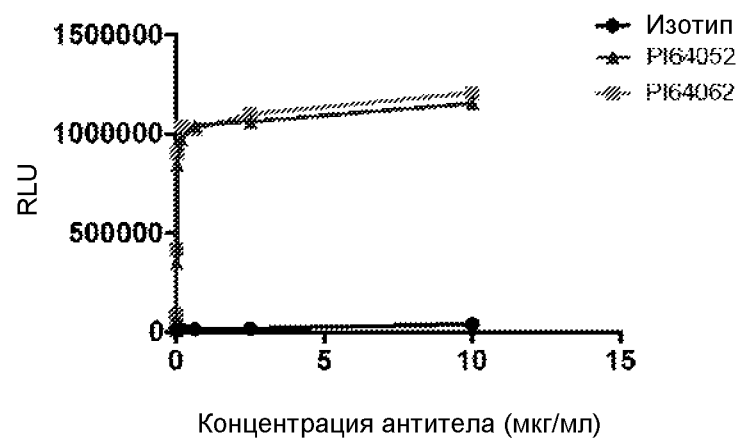
Фиг. 23А



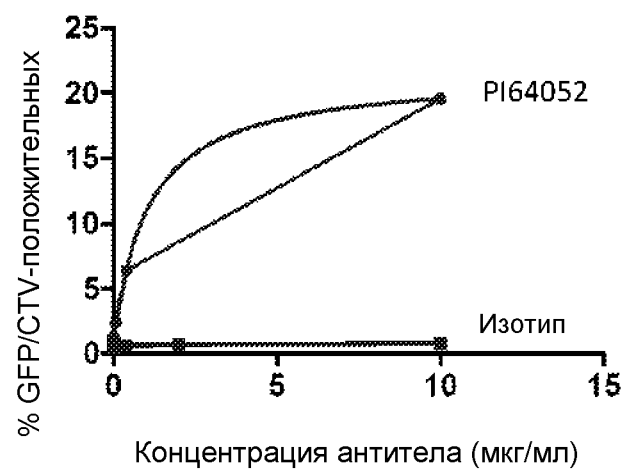
Фиг. 23В



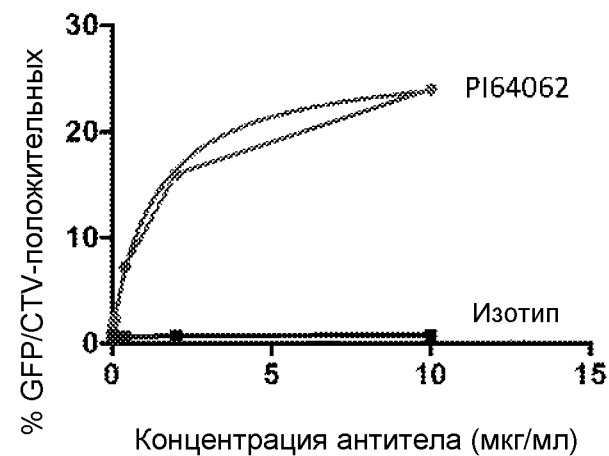
Фиг. 24



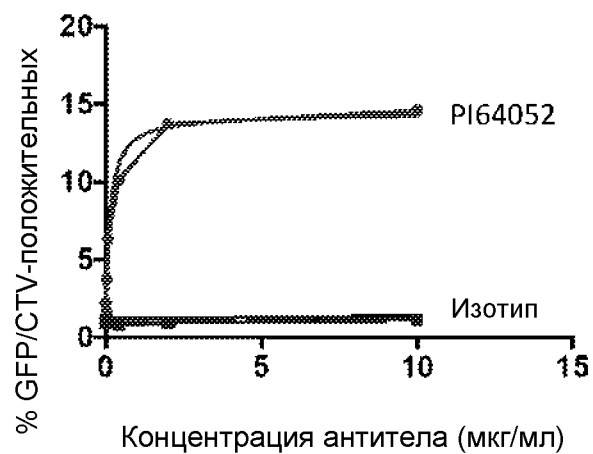
Фиг. 25A



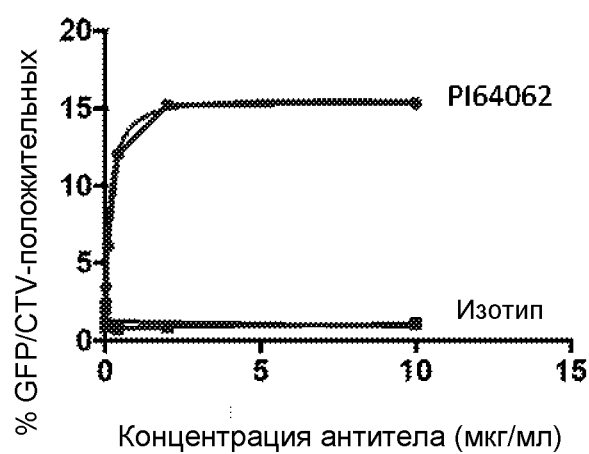
Фиг. 25B



Фиг. 25C



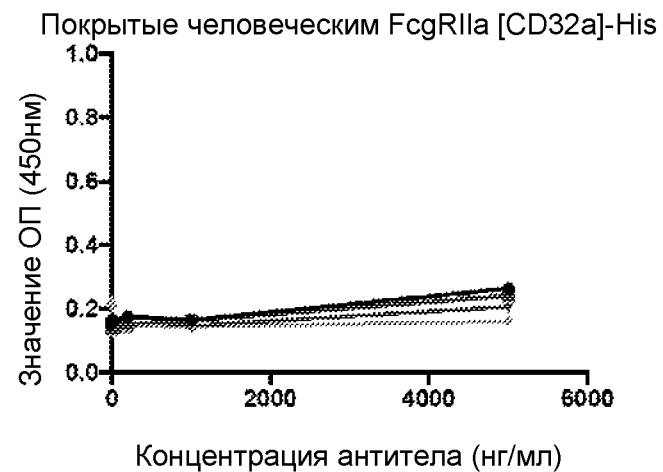
Фиг. 25D



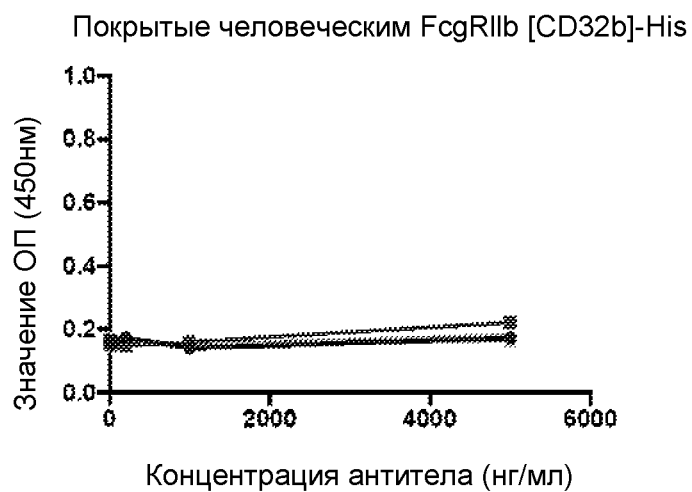
Фиг. 26А



Фиг. 26В



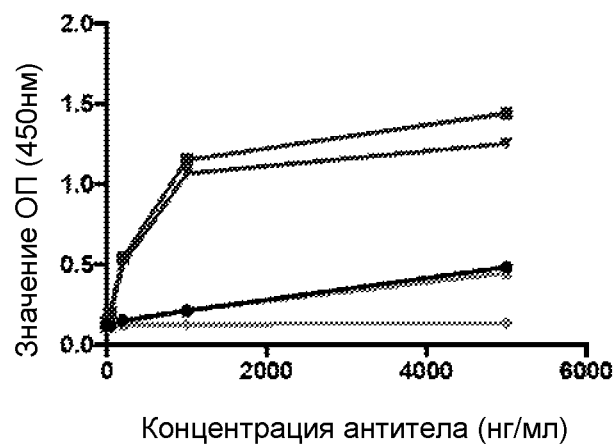
Фиг. 26С



- PI-4026-5-M100L (ДТ)
- Афукосилированное PI-4026-5-M100L (PI64052)
- PI-4026-5-M100Q (ДТ)
- Афукосилированное PI-4026-5-M100Q (PI64062)
- Контроль hlgG4

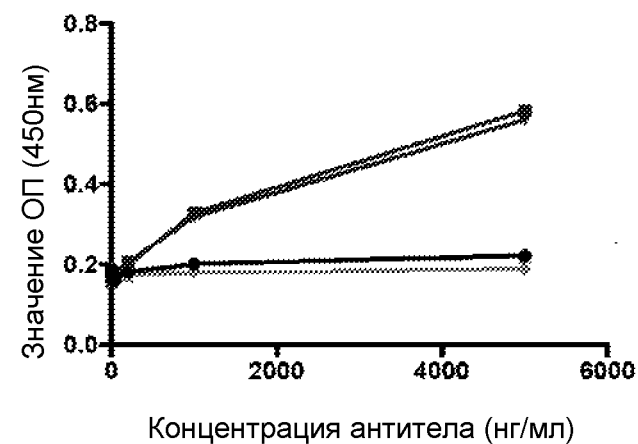
Фиг. 26D

Покрытые человеческим FcγRIIIa [CD16a-V]-His



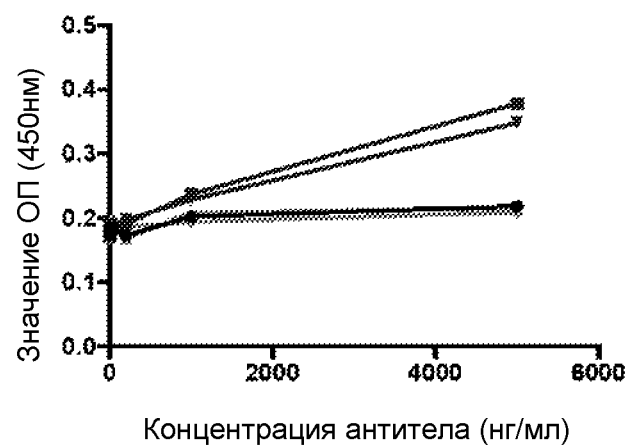
Фиг. 26E

Покрытые человеческим FcγRIIIa [CD16a-F]-His



Фиг. 26F

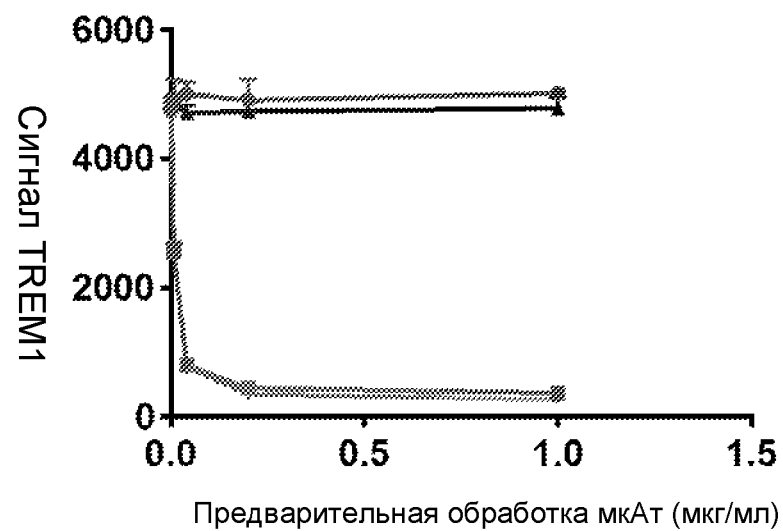
Покрытые человеческим FcγRIIIb [[CD16b]-His



- PI-4026-5-M100L (DT)
- Афукосилированное PI-4026-5-M100L (PI64052)
- PI-4026-5-M100Q (DT)
- Афукосилированное PI-4026-5-M100Q (PI64062)
- Контроль hIgG4

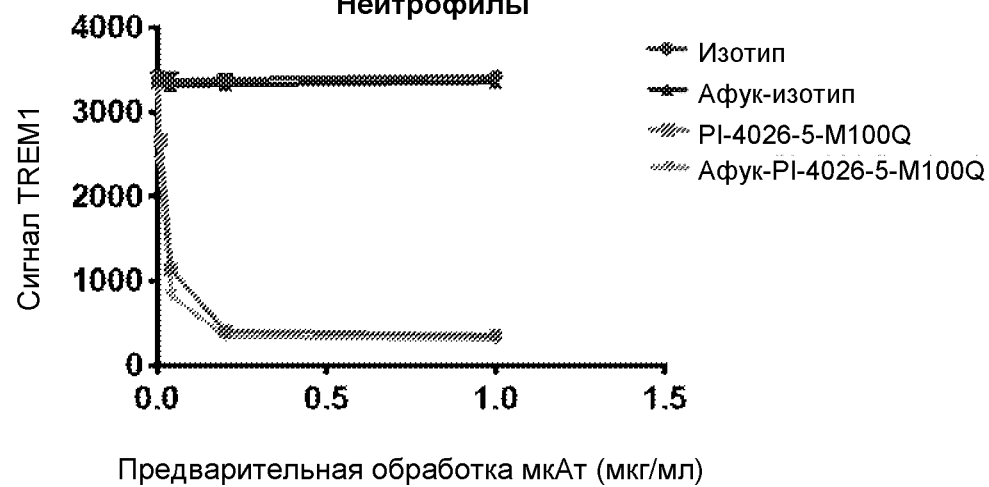
Фиг. 27А

Моноциты

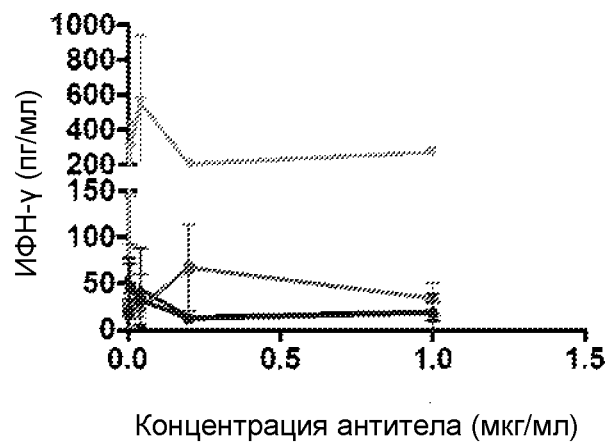


Фиг. 27В

Нейтрофилы

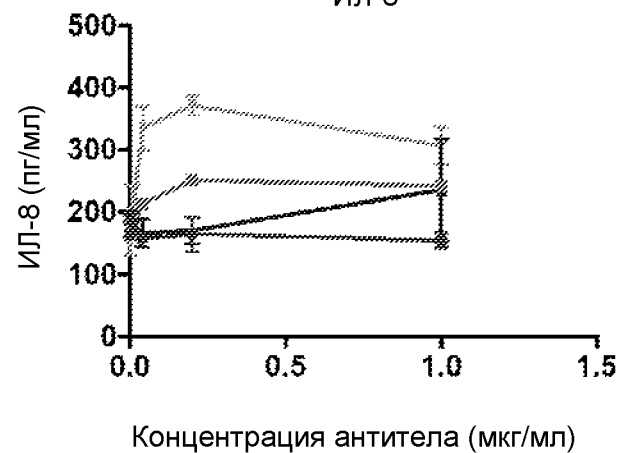


Фиг. 28А

ИФН- γ 

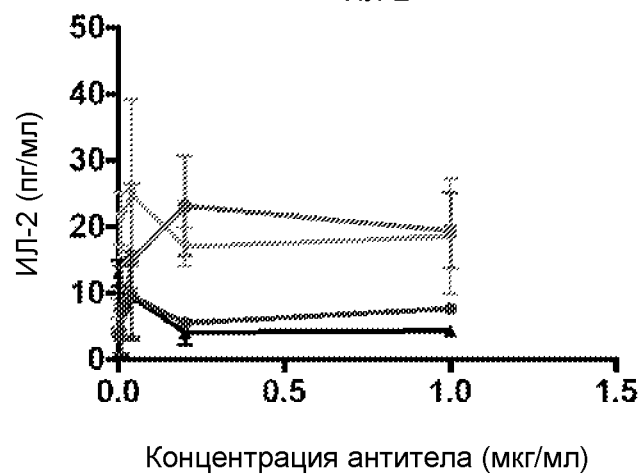
Фиг. 28В

ИЛ-8



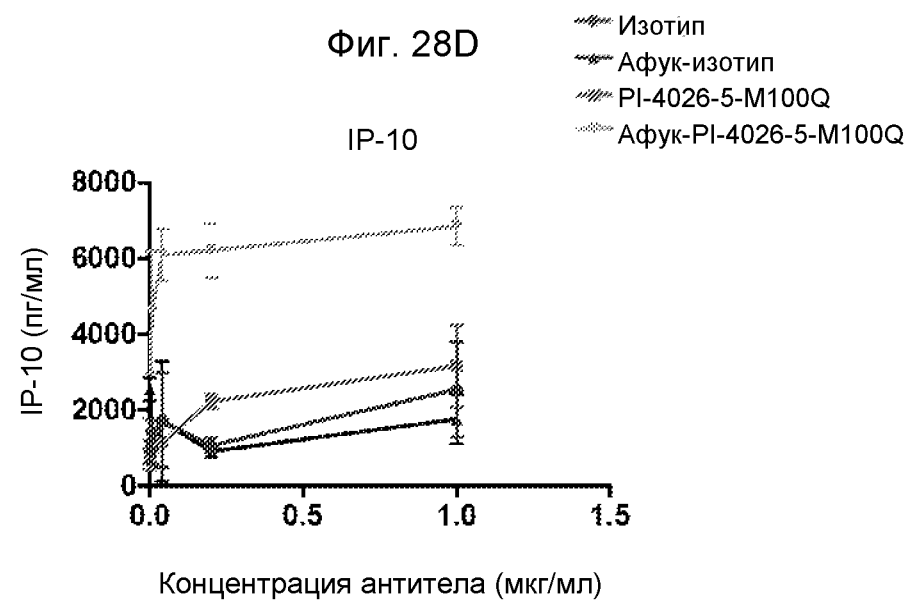
Фиг. 28С

ИЛ-2

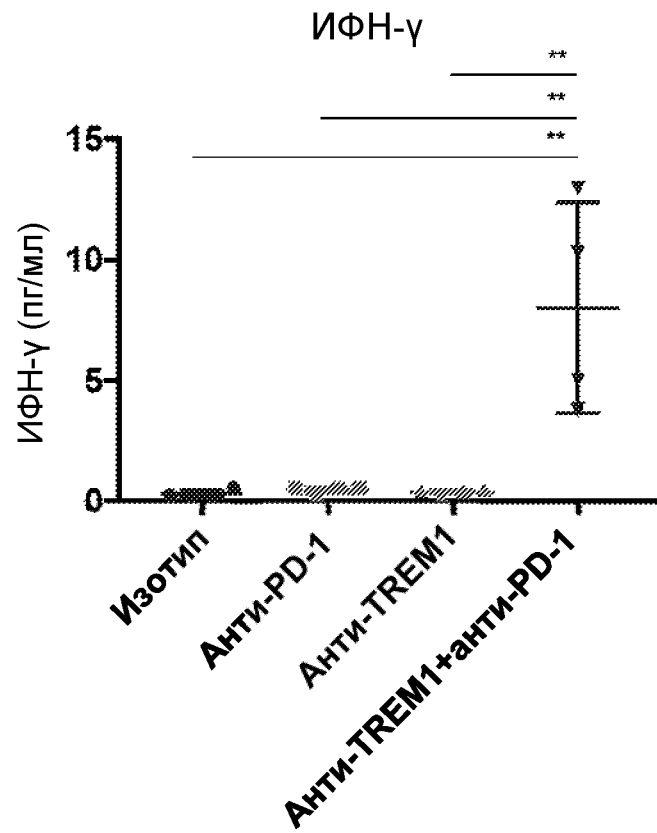


Фиг. 28D

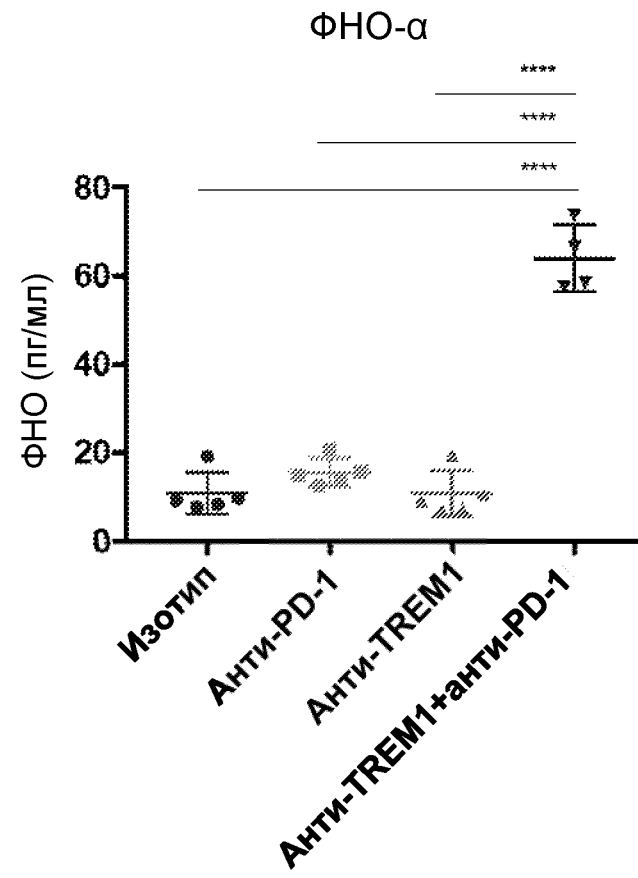
IP-10



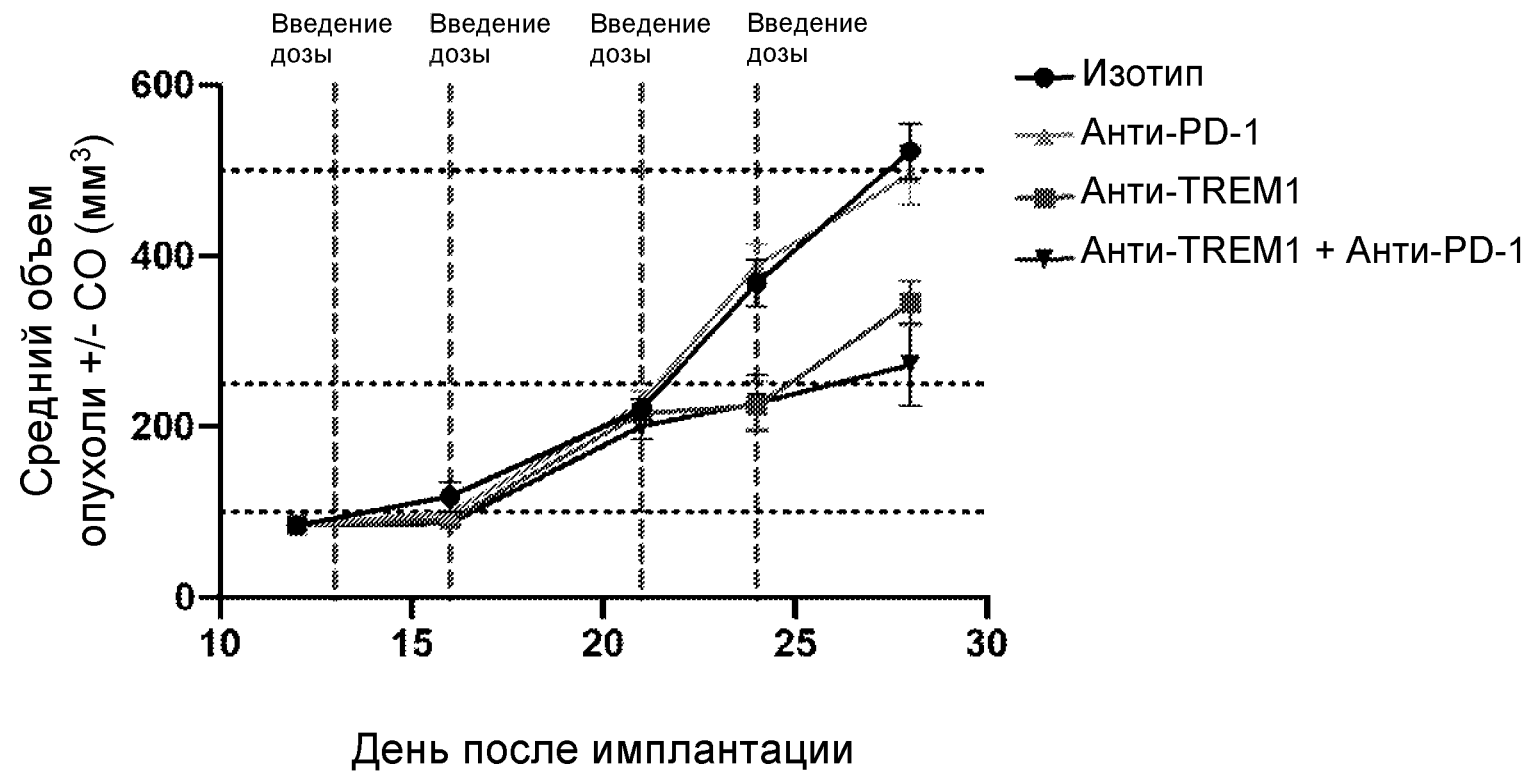
Фиг. 29А



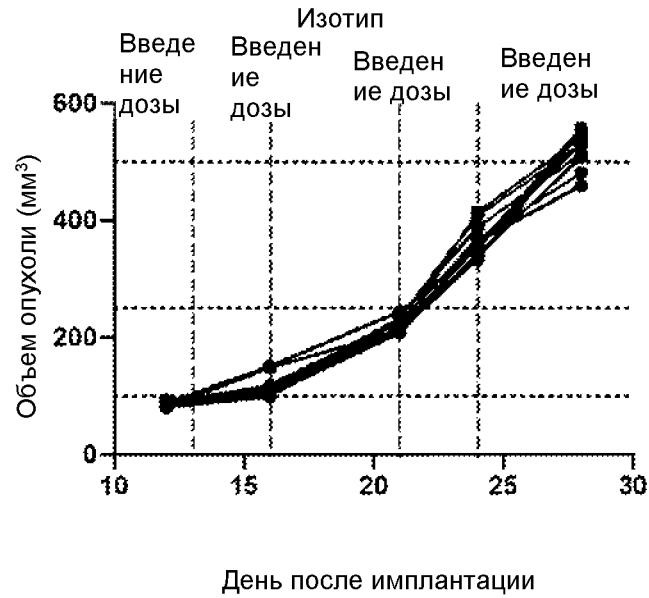
Фиг. 29В



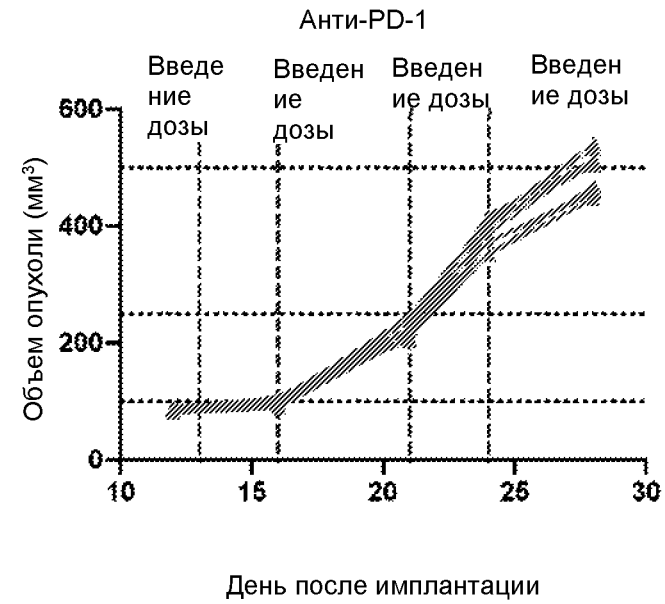
Фиг. 30



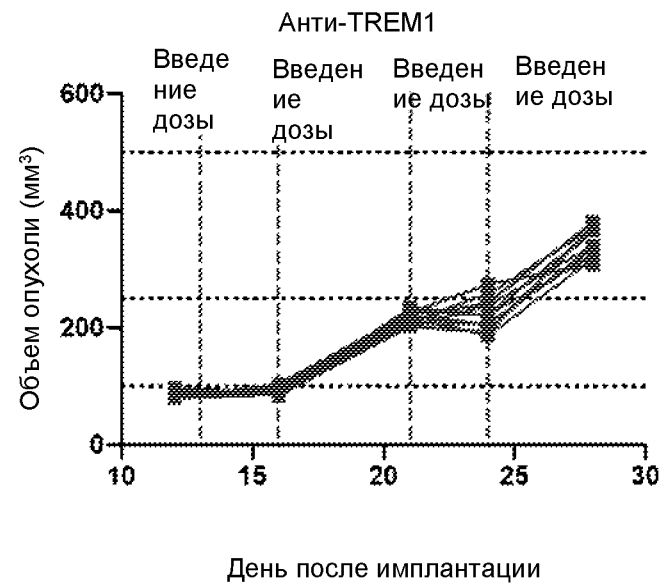
Фиг. 31А



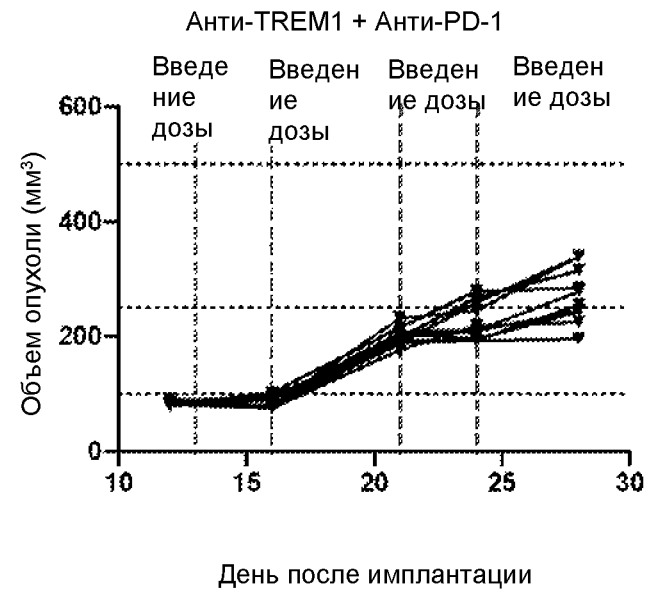
Фиг. 31В



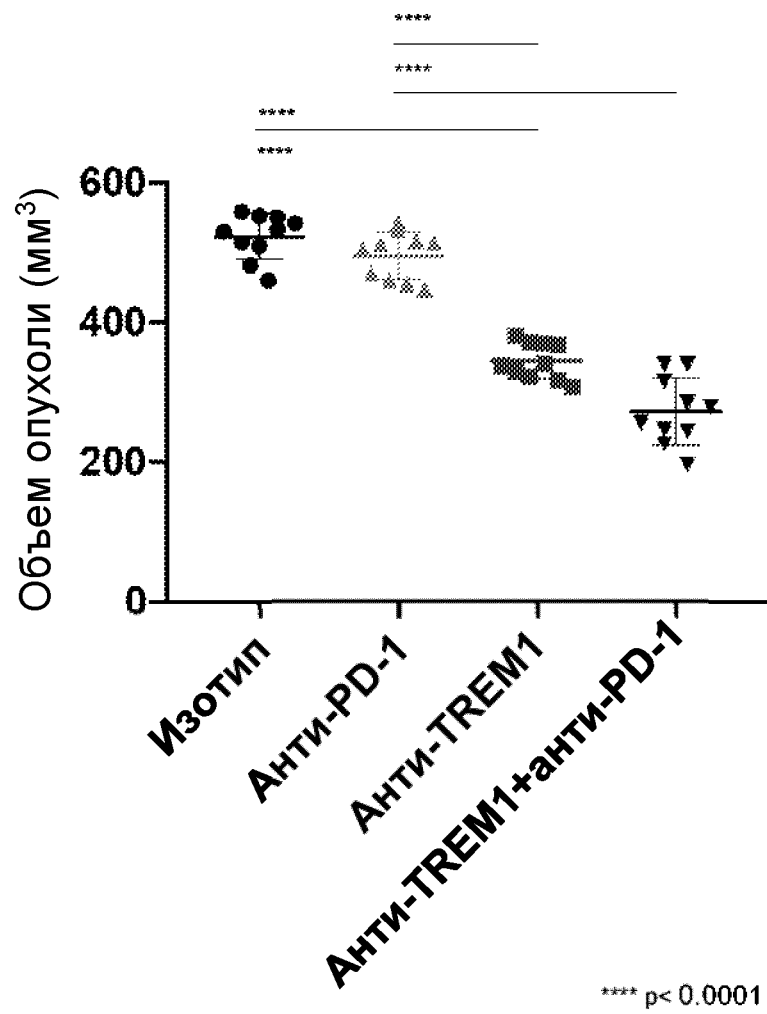
Фиг. 31С



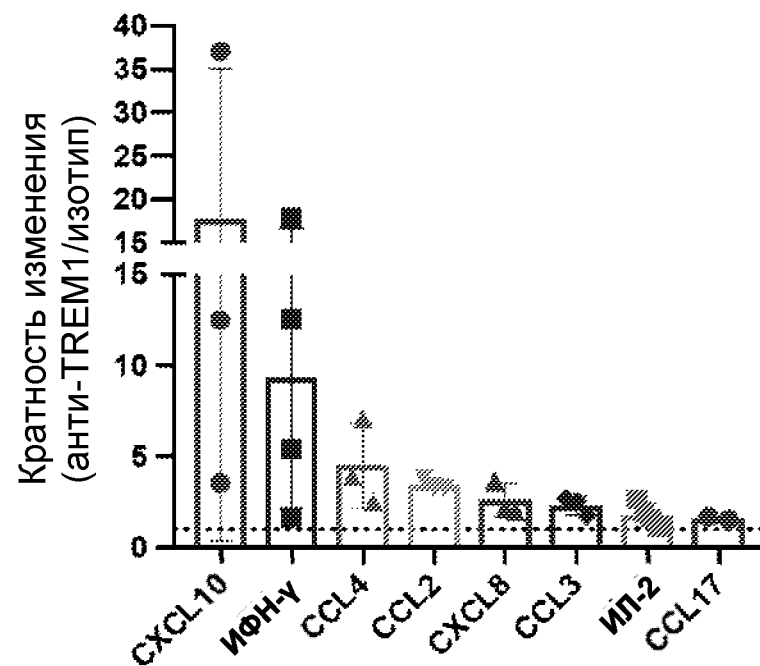
Фиг. 31D



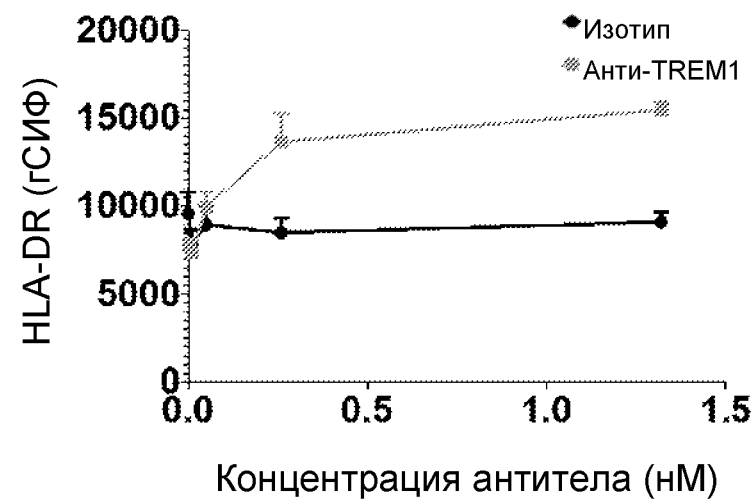
Фиг. 32



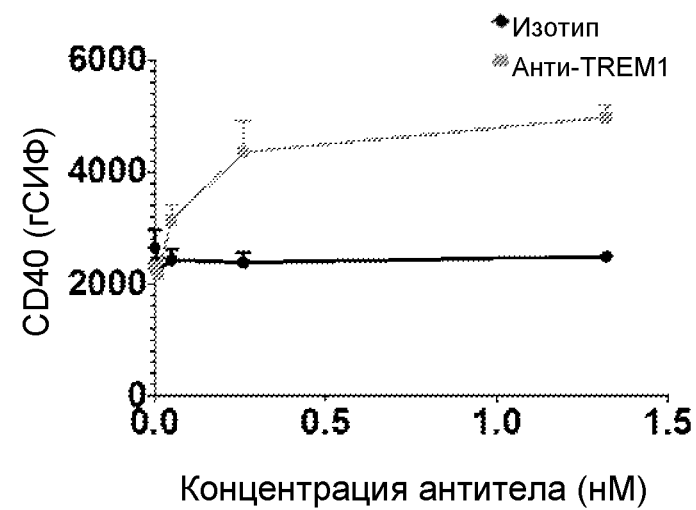
Фиг. 34А



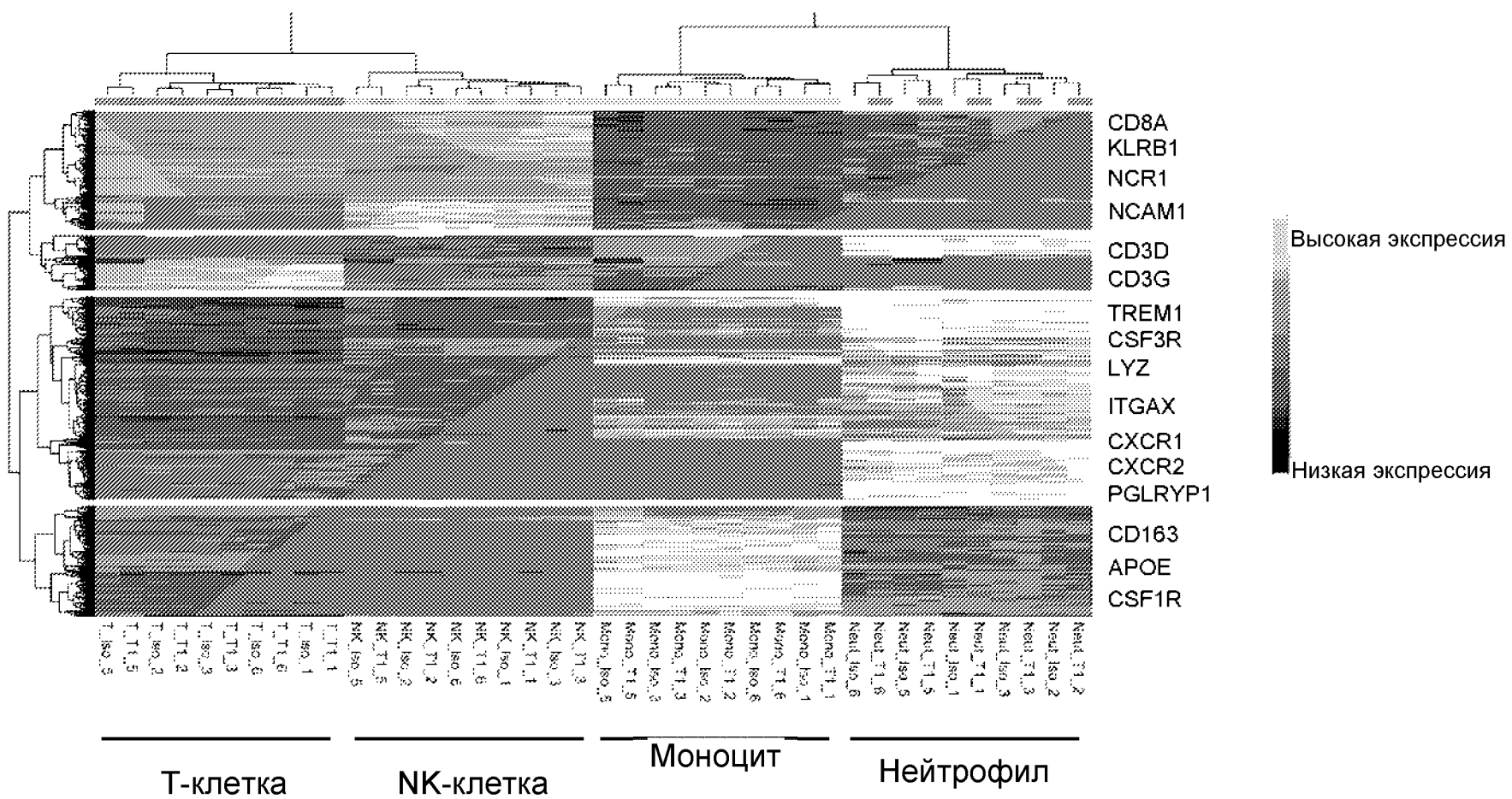
Фиг. 34В



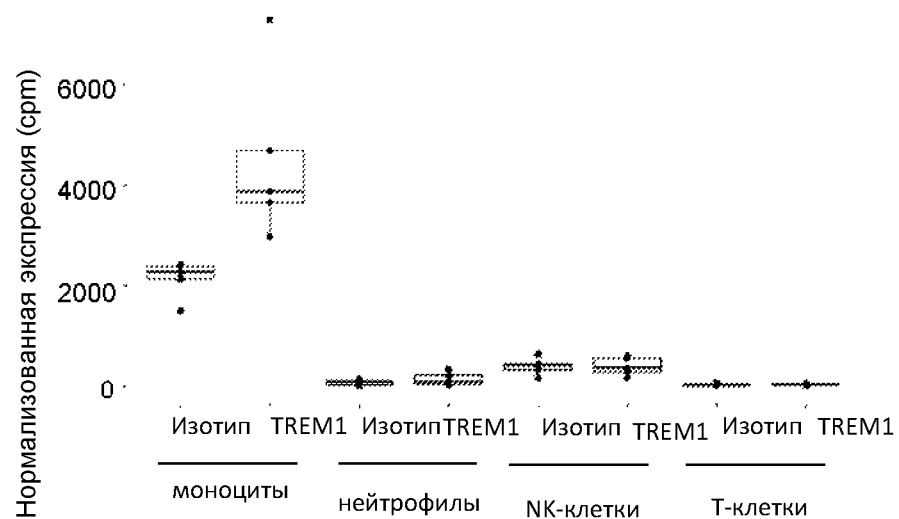
Фиг. 34С



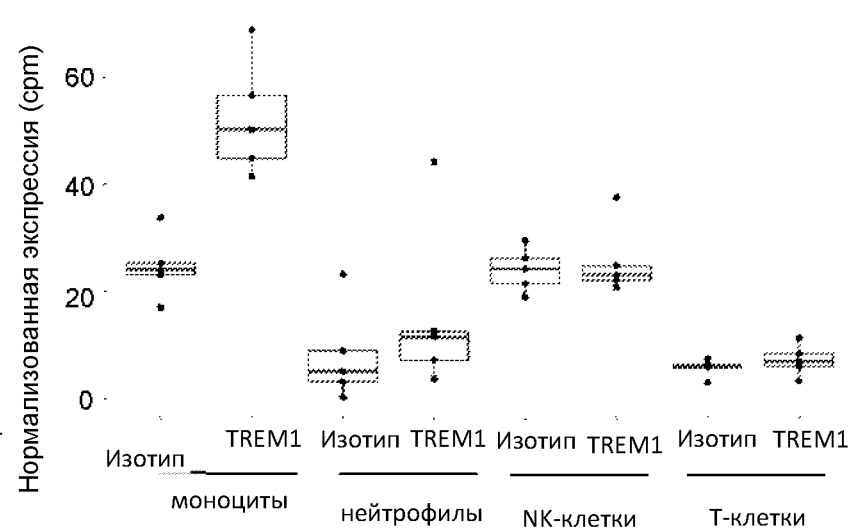
Фиг. 35



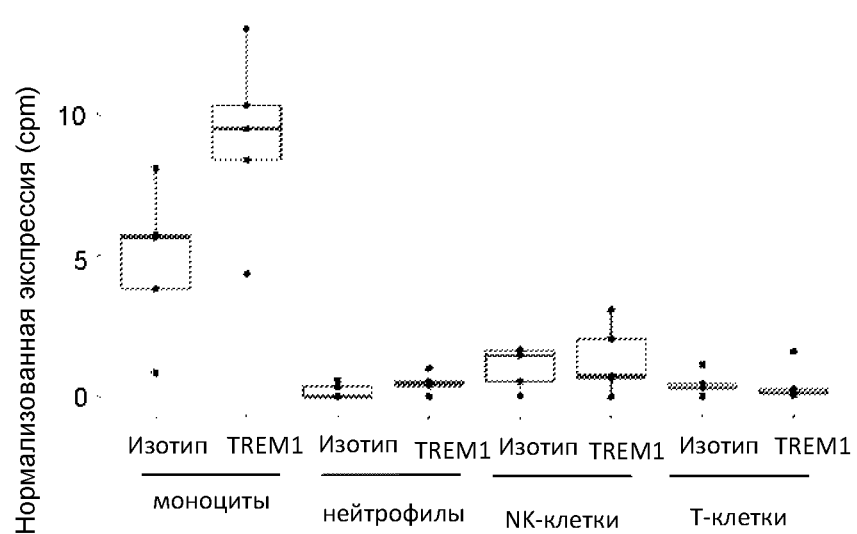
Фиг. 36A
HLA-DR



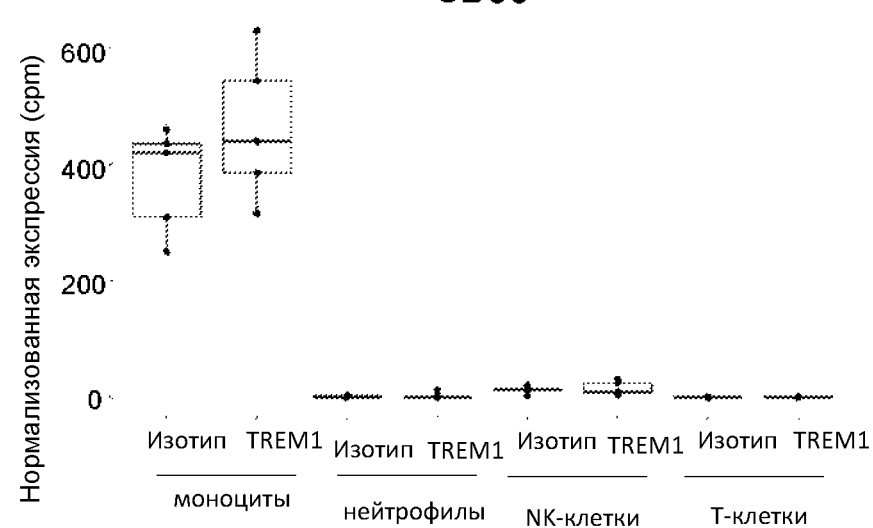
Фиг. 36B
CD40



Фиг. 36C
CD80

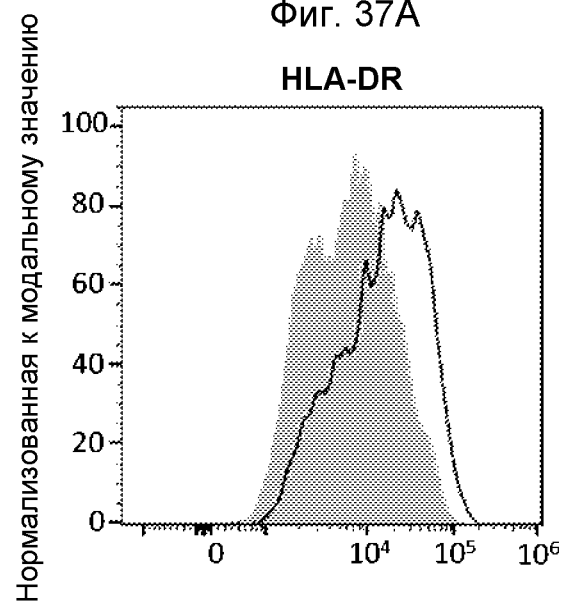


Фиг. 36D
CD86



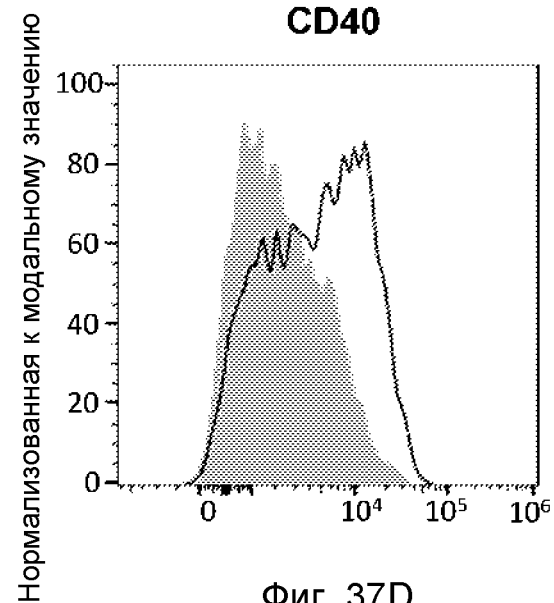
Фиг. 37А

HLA-DR



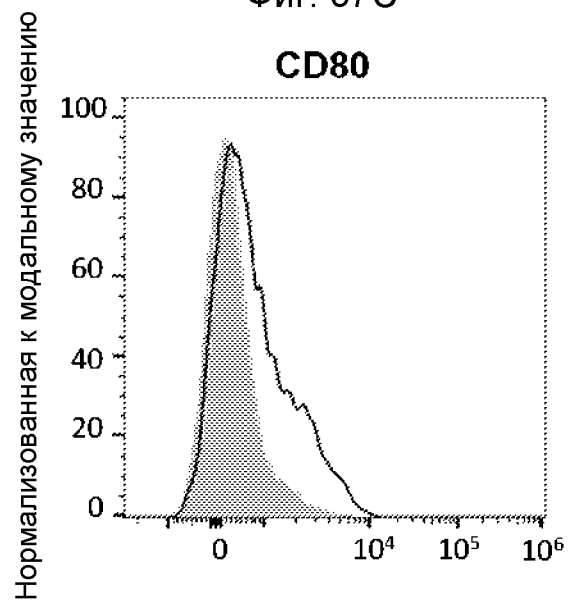
Фиг. 37В

CD40



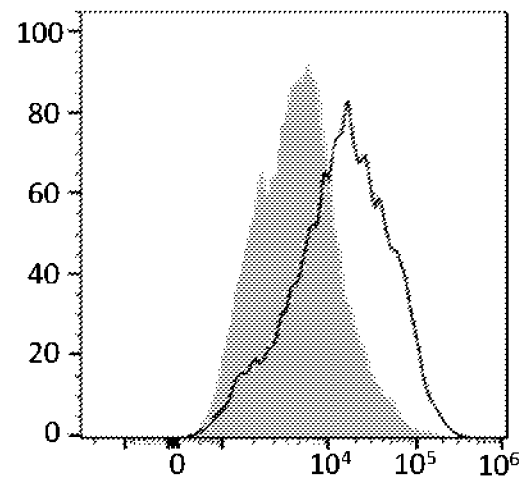
Фиг. 37С

CD80



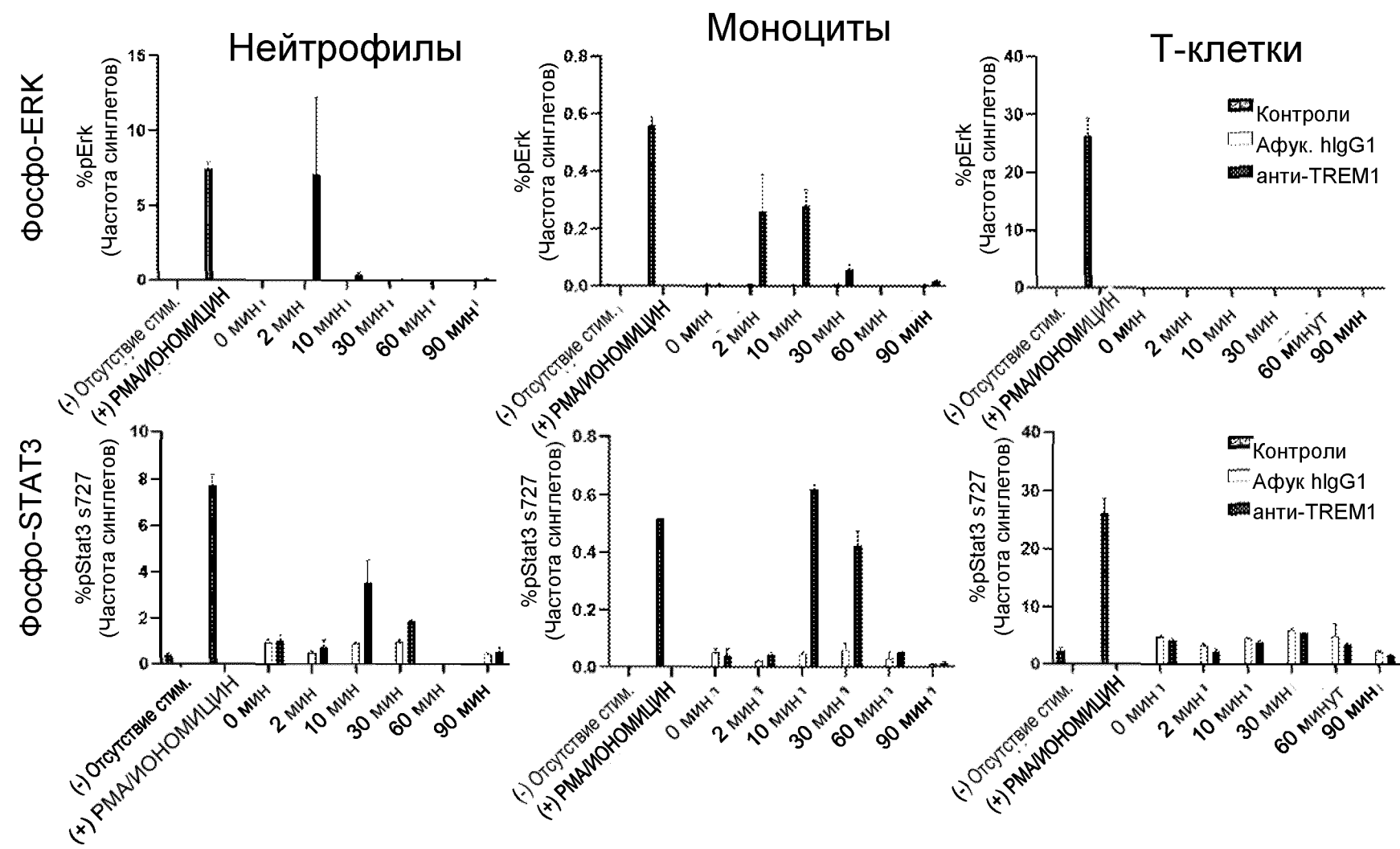
Фиг. 37D

CD86

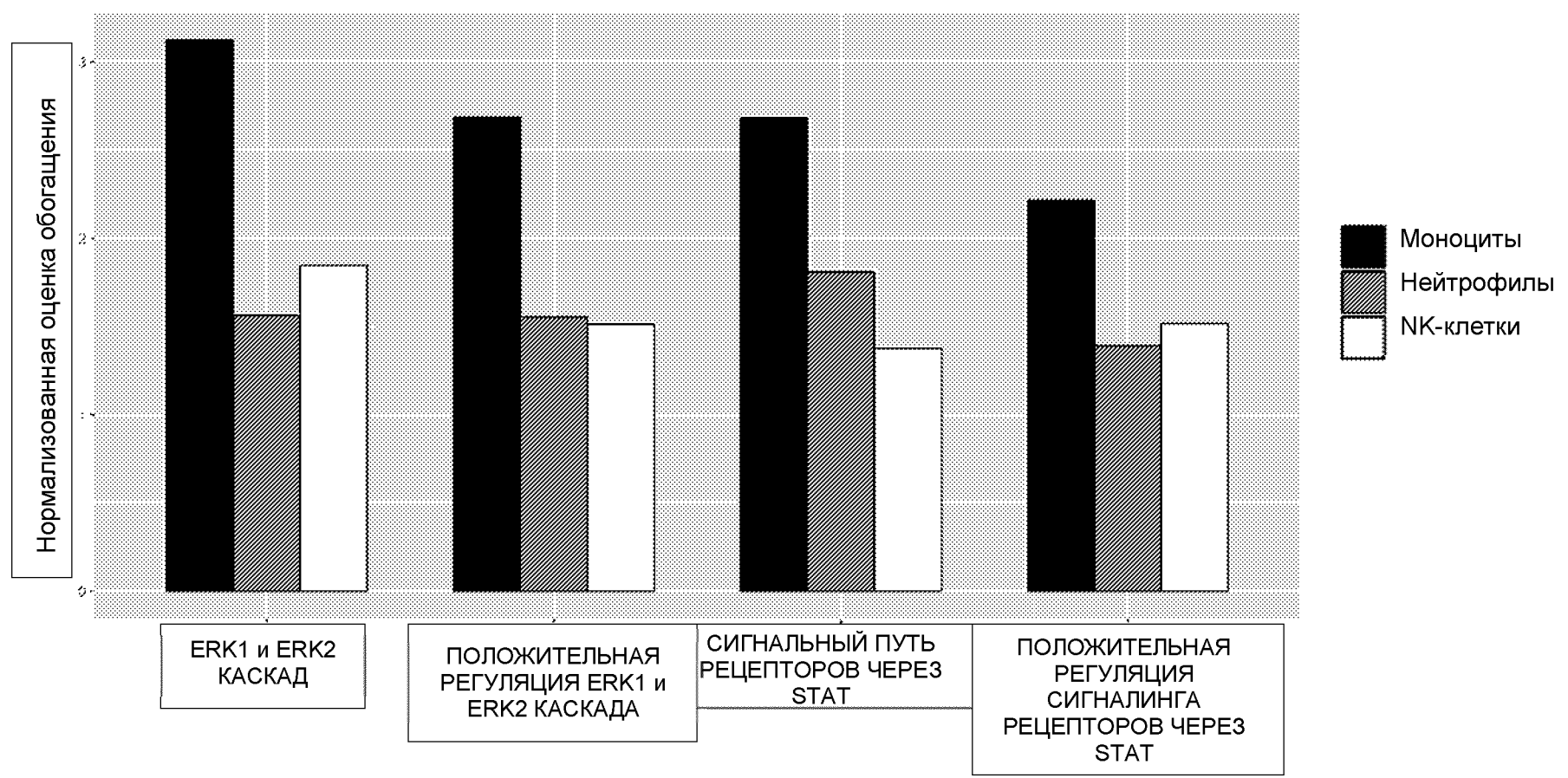


Обработанные изотипом
Обработанные анти-TREM1

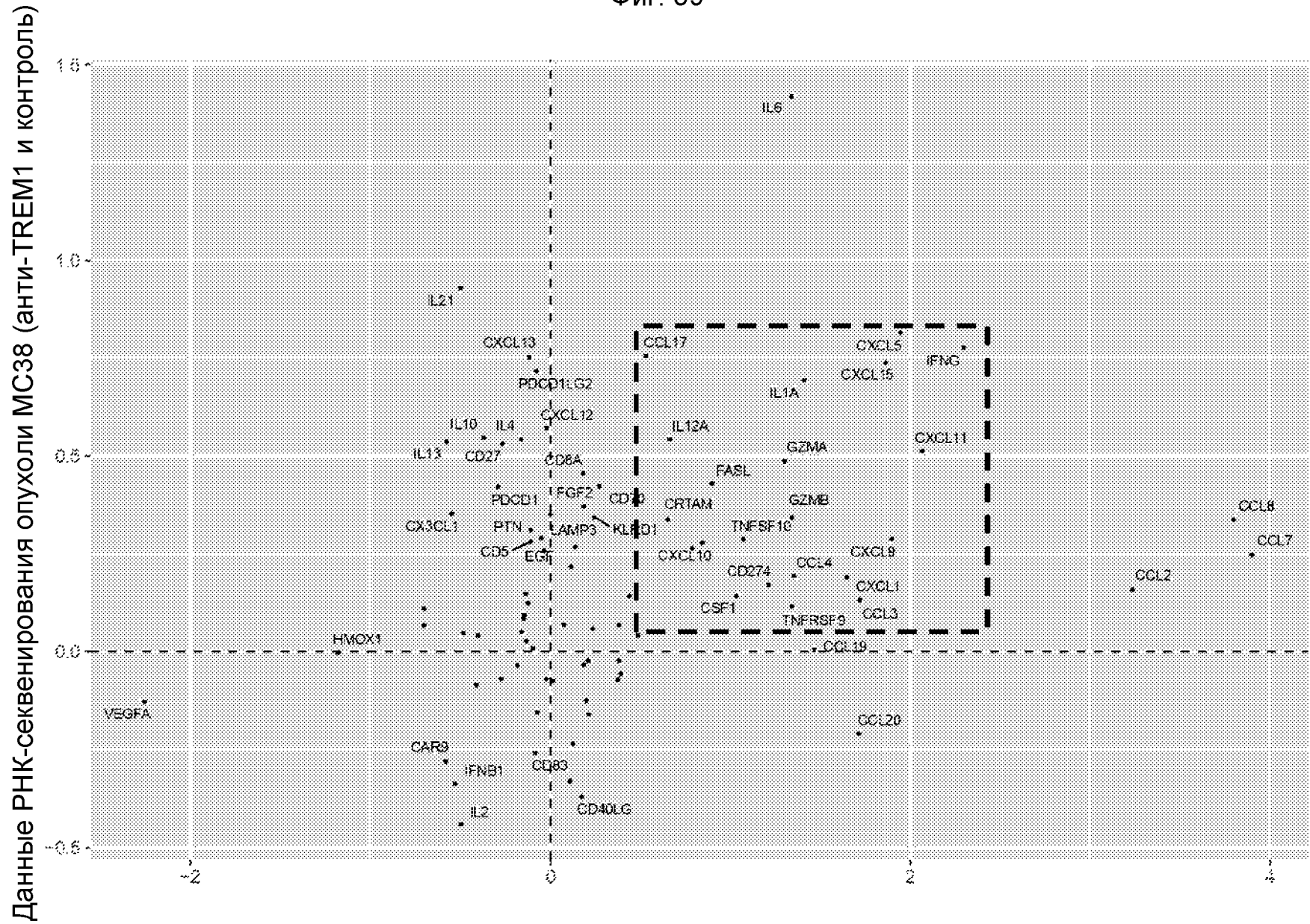
Фиг. 38А



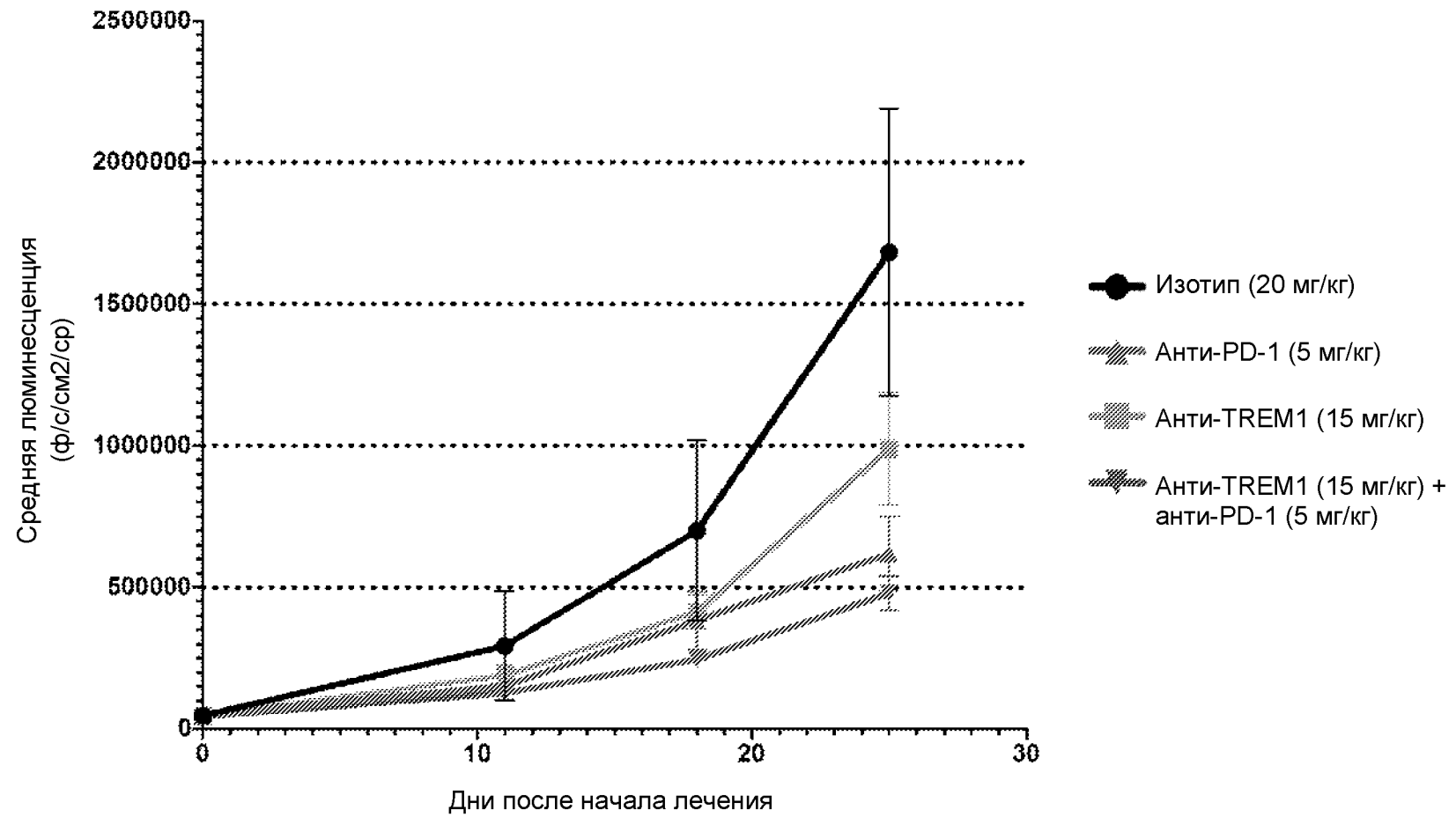
Фиг. 38В

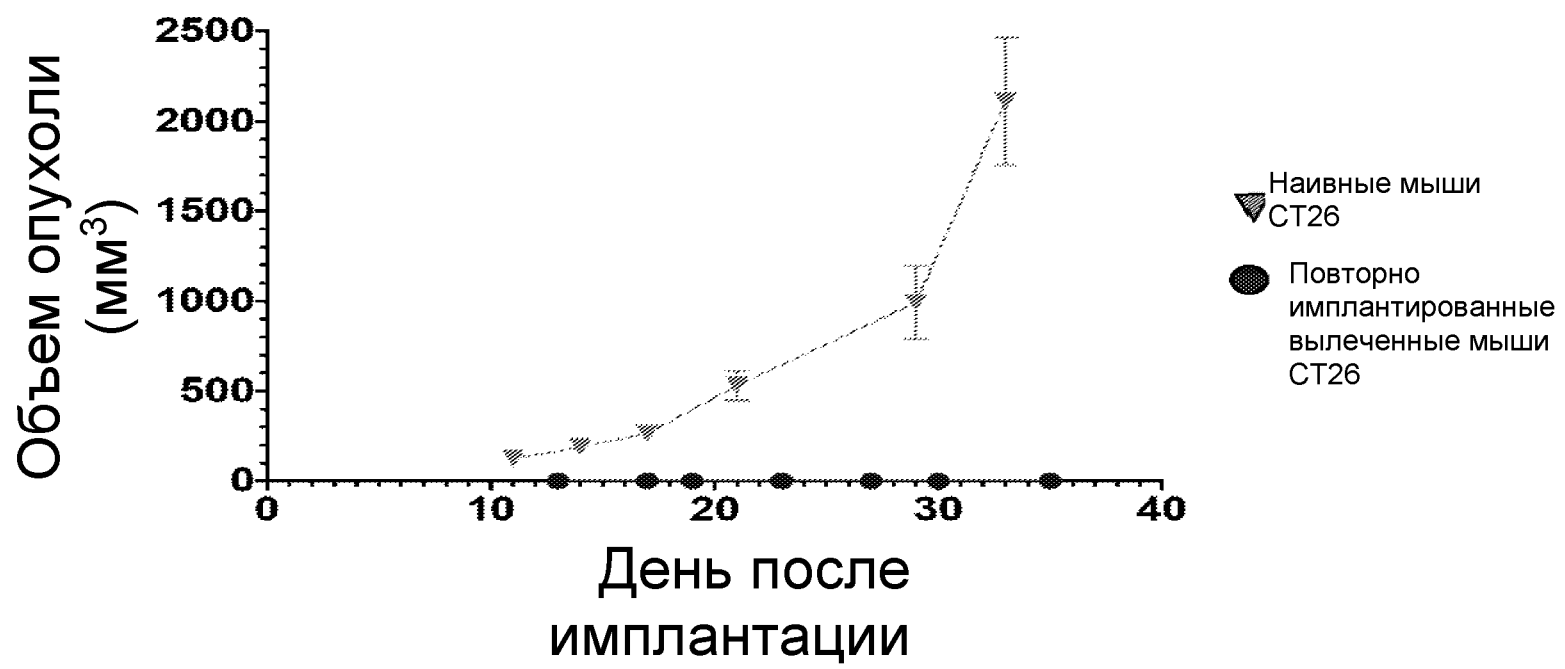


Фиг. 39

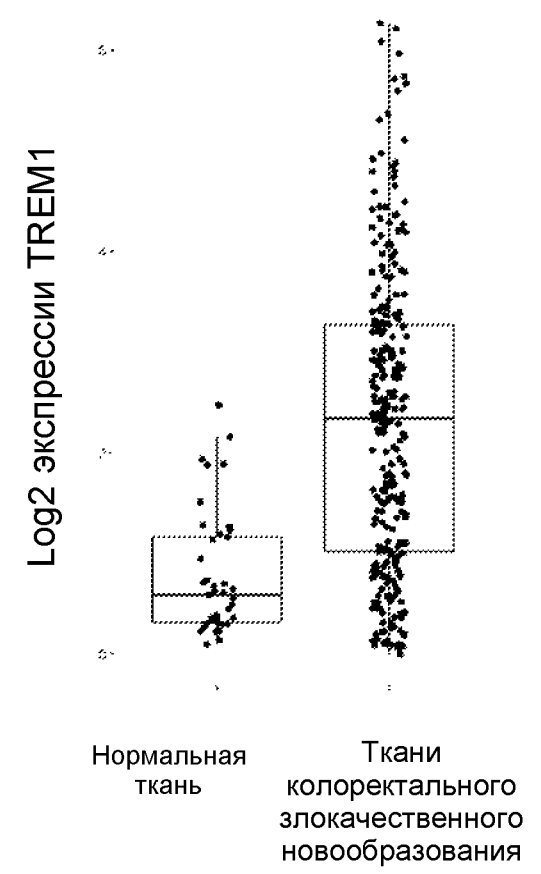


Фиг. 40

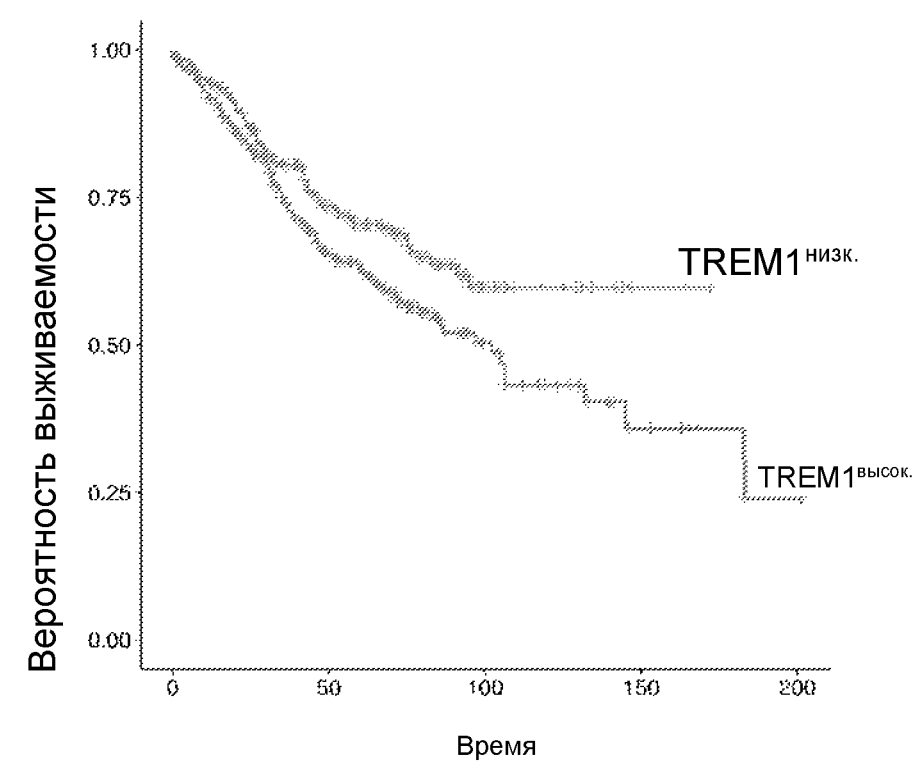


Фиг.
41

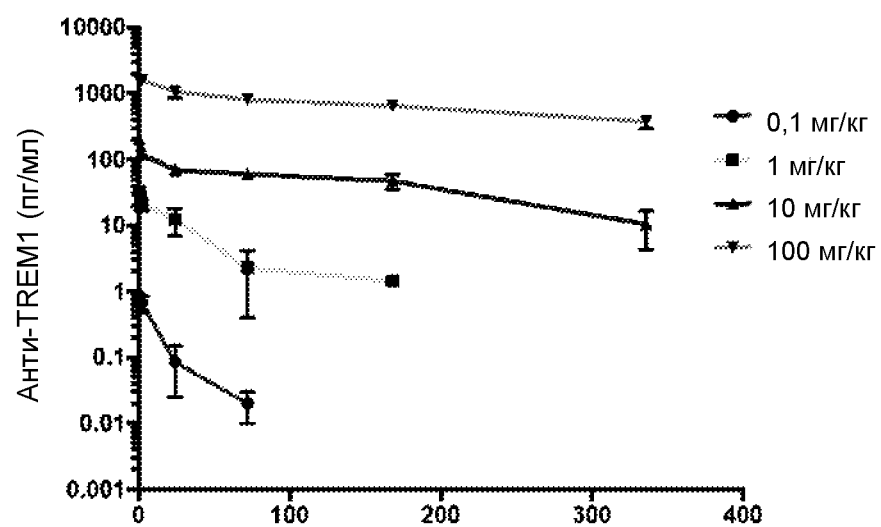
Фиг. 42А



Фиг.42В

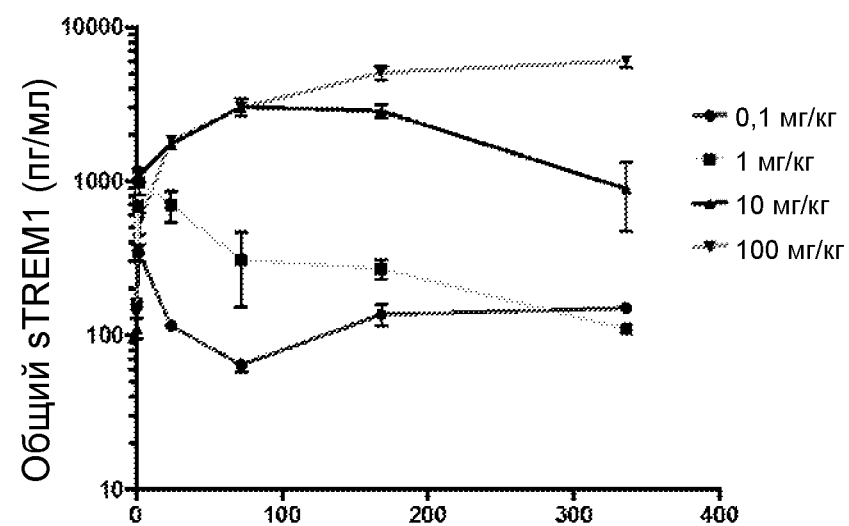


Фиг. 43А



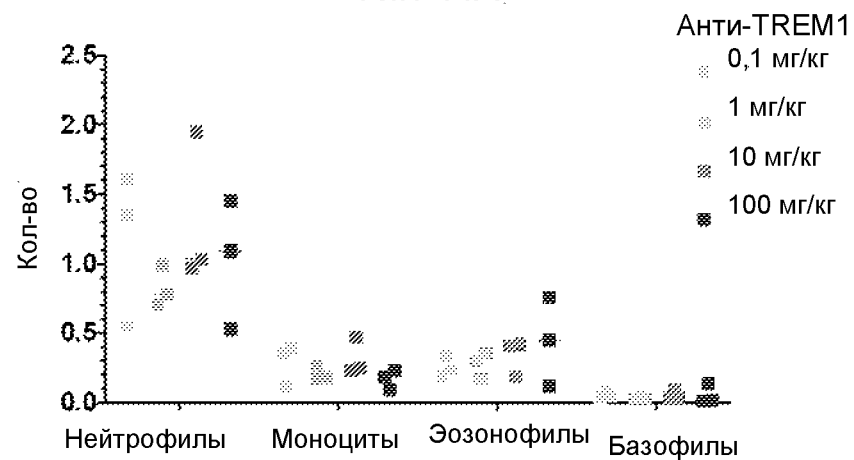
Время после введения дозы (Часы)

Фиг.43В

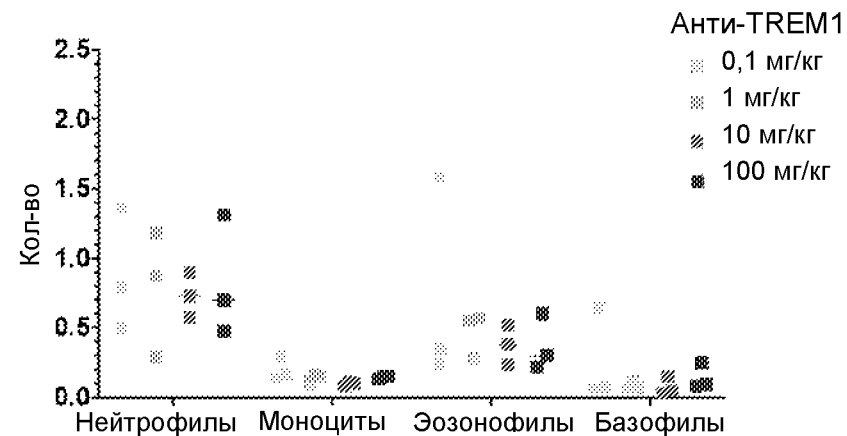


Время после введения дозы (Часы)

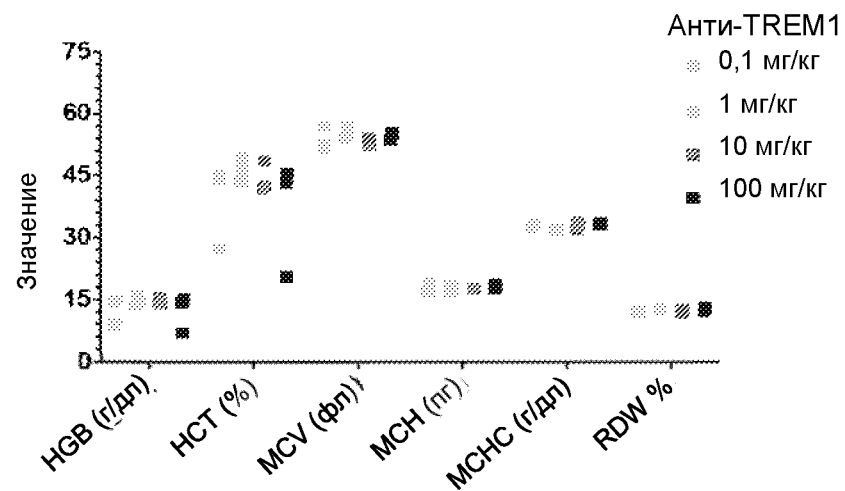
Фиг. 44A



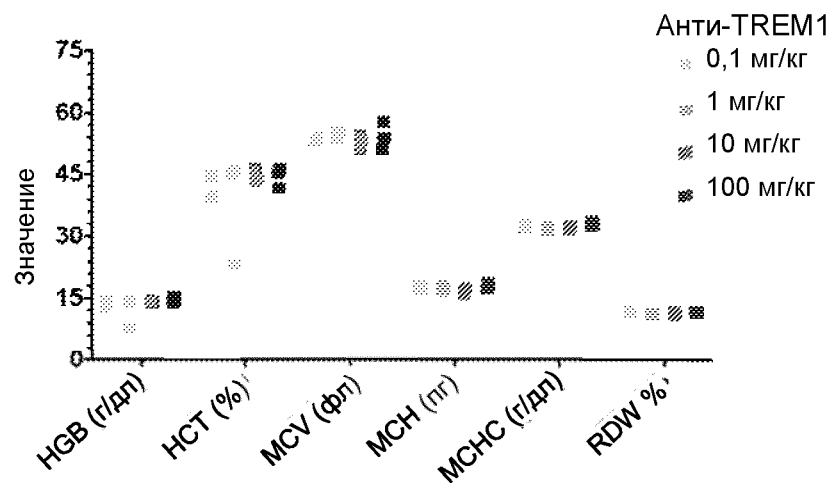
Фиг.44B



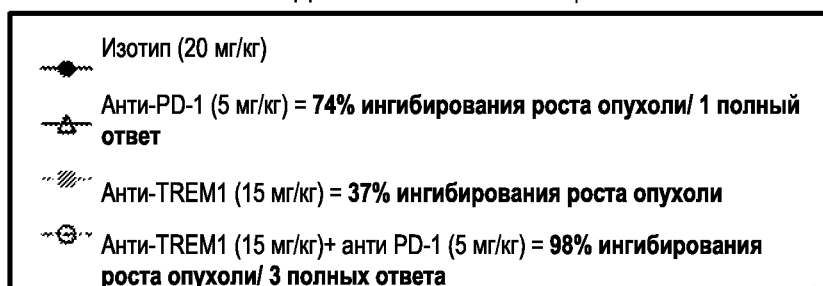
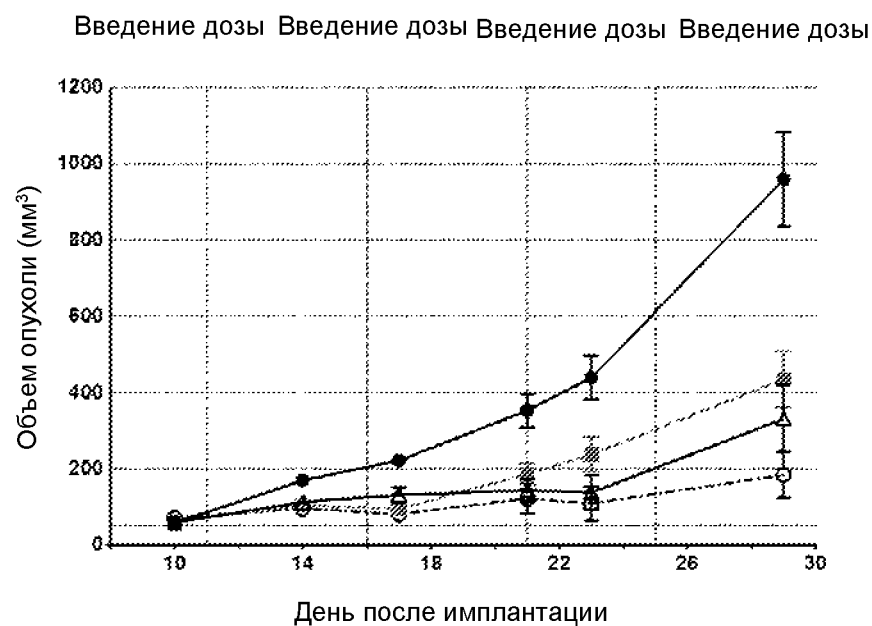
Фиг.44C



Фиг.44D



Фиг. 45А



Фиг.45В

