

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292348** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.03

(22) Дата подачи заявки
2021.02.17

(51) Int. Cl. *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К PILRA И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/978,106; 63/075,440

(32) 2020.02.18; 2020.09.08

(33) US

(86) PCT/US2021/018354

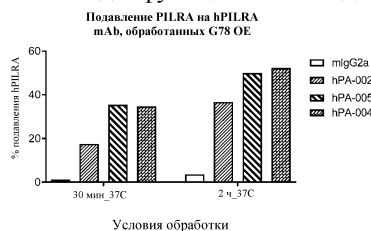
(87) WO 2021/167964 2021.08.26

(71) Заявитель:
АЛЕКТОР ЛЛС (US)

(72) Изобретатель:
Лианг Спенсер, Налле Сэмюел, Лёнг
Линг (US)

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

(57) В данном изобретении предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PILRA человека, и композиции, содержащие такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. В конкретном аспекте антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PILRA человека, блокируют связывание PILRA с лигандом и/или уменьшают количество PILRA на клеточной поверхности. В дополнительных аспектах антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для лечения заболеваний или состояний, связанных с дисфункцией миелоидных клеток.



A1

202292348

202292348

A1

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 62/978106, поданной 18 февраля 2020 г., и 63/075440, поданной 8 сентября 2020 г., каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ А ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ ЧЕРЕЗ EFS-WEB

[0002] Содержание представленного в электронном виде перечня последовательностей (название: 4503_009PC02_Seqlisting_ST25.txt; размер: 52063 байт; и дата создания: 12 февраля 2021 г.) полностью включено в данное описание посредством ссылки.

1. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Данное изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с PILRA человека, композициям, содержащим такие антитела, и к способам получения и применения антител, которые специфически связываются с PILRA человека.

2. ОПИСАНИЕ ИЗВЕСТНОГО УРОВНЯ ТЕХНИКИ

[0004] Парный иммуноглобулин-подобный рецептор типа 2 альфа (PILRA) представляет собой рецептор клеточной поверхности, который экспрессируется на различных клетках врожденного иммунитета миелоидного происхождения, таких как моноциты, макрофаги, микроглия (в ЦНС), дендритные клетки и нейтрофилы. PILRA представляет собой ингибиторный рецептор, содержащий внутриклеточный домен ITIM и внеклеточный домен IgV, а его лиганды включают специфические сialiлированные O-гликозилированные белки. PILRA также является входным рецептором вируса простого герпеса 1 типа (ВПГ-1). Встречающийся в природе аллель в гене PILRA приводит к миссенс-варианту (G78 в R78) в кодируемом белке PILRA. Вариант R78 PILRA связан со сниженным риском болезни Альцгеймера. Сообщается также, что этот вариант снижает связывание PILRA с несколькими его лигандами за счет изменения доступа к карману связывания сиаловой кислоты PILRA. Было высказано предположение, что этот вариант защищает людей от болезни Альцгеймера за счет снижения ингибирующей передачи сигналов в микроглии и уменьшения инфекции микроглии во время рецидива ВПГ-1.

[0005] Учитывая экспрессию и функцию PILRA, в данном документе предложены антитела, которые специфически связываются с PILRA человека. Такие антитела могут снижать ингибирующую передачу сигналов PILRA путем блокирования связывания PILRA с лигандами и/или путем подавления активности PILRA на клеточной поверхности. Такие антитела можно использовать для активации миелоидных клеток и для лечения заболеваний, при которых желательна активация миелоидных клеток, включая рак и нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера. Эти и другие композиции и способы представлены в данном документе.

3. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В данном документе представлены выделенные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PILRA человека, и способы их применения.

[0007] В некоторых аспектах, представленных в данном документе, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PILRA человека, блокирует связывание PILRA с одним или более его лигандами. В некоторых аспектах выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PILRA человека, подавляют PILRA клеточной поверхности. В некоторых аспектах выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PILRA человека, блокирует связывание PILRA с одним или более его лигандами, и подавляют PILRA клеточной поверхности.

[0008] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание остатка Arg126 PILRA человека (SEQ ID NO:1) с одним или более лигандами PILRA.

[0009] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание PILRA-Fc с Т-клетками человека на по меньшей мере 70 %, по меньшей мере на 75 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % или по меньшей мере 98 %.

[0010] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент подавляет PILRA клеточной поверхности на по меньшей мере 10 %, по меньшей мере 20 %, по меньшей мере 30 %, по меньшей мере 40 % или по меньшей мере 50 % через 30 минут при 37 °C.

[0011] В некоторых аспектах выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PILRA человека содержит последовательности определяющей комплементарности области (CDR) 1 варибельной области тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области легкой цепи (VL): SEQ ID NO: 4-9, соответственно; SEQ ID NO: 10-15, соответственно; SEQ ID NO: 16-21, соответственно; или SEQ ID NO: 22-27, соответственно.

[0012] В некоторых аспектах выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с PILRA человека, при этом эталонное антитело содержит варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 28 и 29 соответственно; SEQ ID NO: 30 и 31 соответственно; SEQ ID NO: 32 и 33 соответственно; или SEQ ID NO: 34 и 35 соответственно.

[0013] В некоторых аспектах выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом PILRA человека, что и антитело, содержащее варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO:28 и 29, соответственно; SEQ ID NO:30 и 31, соответственно; SEQ ID NO:32 и 33, соответственно; или SEQ ID NO:34 и 35, соответственно.

[0014] В некоторых аспектах выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PILRA человека содержит CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела, выбранного из группы, состоящая из hPA-002, hPA-005, hPA-004 или hPA-001. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR, определенные по Kabat, CDR, определенные по Chothia, CDR, определенные по IMGT, или CDR, определенные по AbM.

[0015] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, 30, 32 или 34. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, 31, 33 или 35.

[0016] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO:28 и 29, соответственно; SEQ ID NO:30 и 31, соответственно; SEQ ID NO:32 и 33, соответственно; или SEQ ID NO:34 и 35, соответственно. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PILRA человека, представляет собой гуманизированную форму или антитело, которое содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO:28 и 29, соответственно; SEQ ID NO:30 и 31, соответственно; SEQ ID NO:32 и 33, соответственно; или SEQ ID NO:34 и 35, соответственно.

[0017] В некоторых аспектах выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PILRA человека, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, 30, 32 или 34.

[0018] В некоторых аспектах выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PILRA человека содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, 31, 33 или 35.

[0019] В некоторых аспектах антител или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в данном документе, которые подавляют PILRA клеточной поверхности, подавление является дозозависимым.

[0020] В некоторых аспектах представленных в настоящем документе антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые блокируют связывание PILRA с одним или более его лигандами, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокируют связывание остатка Arg126 PILRA человека (SEQ ID NO:1) к одному или более лигандам PILRA.

[0021] В некоторых аспектах представленных в данном документе антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые блокируют связывание PILRA с одним или более его лигандами, блокирование является дозозависимым.

[0022] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент активируют миелоидные клетки. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способствует дифференцировке миелоидных клеток. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент увеличивают продукцию MIP1b миелоидными клетками. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание PILRA с NPDC1. В некоторых аспектах активация миелоидных клеток, стимулирование дифференцировки миелоидных клеток, увеличение продукции MIP1b и/или блокирование связывания лиганда являются дозозависимыми.

[0023] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с PILRA яванского макака. В некоторых аспектах указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не связывается с PILRB человека. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с внеклеточным доменом PILRA человека. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в аминокислотах 20-197 SEQ ID NO:1.

[0024] В некоторых аспектах антитело 2175B не ингибирует конкурентно связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с PILRA человека.

[0025] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи. В некоторых аспектах константная область

тяжелой цепи представляет собой изотип, выбранный из группы, состоящей из изотипов человека IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат Fc-домен, который сконструирован для снижения эффекторной функции.

[0026] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, при этом константная область тяжелой цепи представляет собой константную область тяжелой цепи IgG₁ человека, и при этом константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи IgG_k человека.

[0027] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой мышиное, химерное, гуманизированное или человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0028] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂, одноцепочечное Fv (scFv), дисульфидносвязанное Fv, домен V-NAR, IgNar, интраантитело, IgGΔCH2, миниантитело, F(ab')₃, тетратело, триатело, диатело, однодоменное антитело, DVD-Ig, Fcab, mAb², (scFv)₂ или scFv-Fc.

[0029] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-34, дополнительно содержит обнаруживаемую метку.

[0030] В некоторых аспектах, представленных в данном документе, выделенный полинуклеотид содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в данном документе. В некоторых аспектах молекула нуклеиновой кислоты кодирует VH SEQ ID NO: 28, 30, 32 или 34.

[0031] В некоторых аспектах выделенный полинуклеотид содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи или легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в данном документе. В некоторых аспектах молекула нуклеиновой кислоты кодирует VL SEQ ID NO: 29, 31, 33 или 35.

[0032] В некоторых аспектах выделенный полинуклеотид содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в данном документе, и переменную область легкой цепи или легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0033] В некоторых аспектах, представленных в данном документе, выделенный вектор содержит полинуклеотид, представленный в данном документе.

[0034] В некоторых аспектах, представленных в настоящем документе, клетка-хозяин содержит (a) полинуклеотид, представленный в данном документе, (b) вектор, представленный в данном документе, или (c) первый вектор, содержащий переменную область легкой цепи или полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, представленный в данном документе, и второй вектор, содержащий переменную область тяжелой цепи или полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, по данному изобретению. В некоторых аспектах клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, дрожжей, CHO, YB/20, NS0, PER-C6, HEK-293T, NIH-3T3, HeLa, BHK, Hep G2, SP2/0, R1.1, BW, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, клеток BMT10, растительных клеток, клеток насекомых и клеток человека в культуре тканей.

[0035] В некоторых аспектах, представленных в данном документе, способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с PILRA человека, включает культивирование клетки-хозяина, представленной в данном документе, таким образом, чтобы молекула нуклеиновой кислоты экспрессировалась и продуцировалось антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах способ дополнительно включает выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из культуры.

[0036] В некоторых аспектах, представленных в данном документе, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PILRA человека, кодируются полинуклеотидом, представленным в данном документе, или продуцируются способом, представленным в данном документе.

[0037] В некоторых аспектах, представленных в данном документе, фармацевтическая композиция содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0038] В некоторых аспектах, представленных в данном документе, способ подавления PILRA клеточной поверхности включает приведение в контакт клетки, экспрессирующей PILRA на своей поверхности, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном документе, или фармацевтической композицией, представленной в данном документе.

[0039] В некоторых аспектах способ ингибирования связывания PILRA с лигандом PILRA включает приведение в контакт PILRA с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном документе, или фармацевтической композицией, представленной в данном документе, в присутствии лиганда PILRA, необязательно, при этом PILRA и/или лиганд PILRA экспрессируется на клетке. В некоторых аспектах лиганд PILRA представляет собой NPDC1. В некоторых аспектах лиганд PILRA экспрессируется на Т-клетке.

[0040] В некоторых аспектах способ усиления активации миелоидных клеток включает приведение миелоидных клеток в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном документе, или фармацевтической композицией, представленной в данном документе. В некоторых аспектах активация миелоидных клеток опосредована рецептором Fc.

[0041] В некоторых аспектах способ стимуляции дифференцировки миелоидных клеток включает приведение миелоидных клеток в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном документе, или фармацевтической композицией, представленной в данном документе.

[0042] В некоторых аспектах способ усиления продукции MIP1b миелоидными клетками включает приведение миелоидных клеток в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в данном документе, или фармацевтической композицией, представленной в данном документе.

[0043] В некоторых аспектах приведение в контакт происходит *in vitro*. В некоторых аспектах приведение в контакт происходит у субъекта.

[0044] В некоторых аспектах способ лечения рака у пациента включает введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в данном документе, или фармацевтической композиции, предложенной в данном документе. В некоторых аспектах рак представляет собой солидную опухоль, в которой миелоидные клетки проникли в микроокружение опухоли. В некоторых аспектах рак выбирают из глиобластомы, рака головы и шеи, рака

почки (необязательно, при этом рак почки представляет собой светлоклеточный рак почки), рака поджелудочной железы и рака молочной железы. В некоторых аспектах способ дополнительно включает введение антагониста молекулы ингибирующей иммунную контрольную точку. В некоторых аспектах молекула иммунной контрольной точки представляет собой PD-1 или PD-L1. В некоторых аспектах антагонист PD-1 представляет собой антитело к PD-1 или его фрагмент антитела. В некоторых аспектах антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент выбирают из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба, MEDI-0680 (AMP-514), камрелизумаба (SHR-1210), тислелизумаба (BGB-A317) и спартализумаба (NPVPDR001, NVS240118, PDR001). В некоторых аспектах антагонист PD-L1 представляет собой антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах антитело анти-PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из атезолизумаба, дурвалумаба (MEDI4736), BMS-936559, MSB0010718C и tHigM12B7. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PILRA человека, и антагонист молекулы ингибирующей иммунную контрольную точку вводят одновременно. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PILRA человека, и антагонист молекулы ингибирующей иммунную контрольную точку вводят последовательно.

[0045] В некоторых аспектах способ лечения заболевания или состояния, при котором миелоидные клетки являются дисфункциональными или недостаточными у пациента, включает введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в данном документе, или фармацевтической композиции, представленной в данном документе. В некоторых аспектах заболевание или патологическое состояние представляет собой нейродегенеративное заболевание. В некоторых аспектах нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера. В некоторых аспектах пациент является носителем варианта G78 PILRA.

[0046] В некоторых аспектах способ активации врожденной иммунной системы у пациента включает введение пациенту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в данном документе, или фармацевтической композиции, предложенной в данном документе.

[0047] В некоторых аспектах способ обнаружения PILRA в образце включает приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предложенным в данном документе, или фармацевтической композицией, предложенной в данном документе. В некоторых аспектах образец получают от человека. В некоторых аспектах образец представляет собой образец рака.

4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0048] На фиг. 1A показано связывание первичных CD4+ Т-клеток или клеток Jurkat с PILRA Fc или IgG1 изотипического контроля. (См. Пример 1.)

[0049] На фиг. 1B показано, что антитело к PILRA ингибирует связывание PILRA Fc с CD4+ Т-клетками. (См. Пример 1.)

[0050] На фиг. 2A показаны репрезентативные графики FACS, показывающие экспрессию CD14 по сравнению с CD86 на супрессорных клетках миелоидного происхождения (MDSC), обработанных носителем, mIgG1 или PILRA Fc mIgG1. (См. Пример 2.)

[0051] На фиг. 2B показывает процент активированных миелоидных клеток от трех разных доноров после обработки mIgG1 изотипического контроля или PILRA Fc по отношению к клеткам, обработанным носителем. (См. Пример 2.)

[0052] На **фиг. 3** показывает влияние PILRA Fc на продукцию MIP1b с помощью MDSC. (См. Пример 3).

[0053] На **фиг. 4** показано влияние антител к PILRA мыши на связывание NPDC1 Fc с PILRA мыши. (См. Пример 5).

[0054] На **фиг. 5** показано влияние антител к PILRA человека на связывание Fc PILRA с Т-клетками человека. (См. Пример 7).

[0055] На **фиг. 6** показано влияние антител к PILRA человека на PILRA клеточной поверхности. (См. Пример 8).

[0056] На **фиг. 7** показаны уровни экспрессии мРНК PILRA опухоли (точки и незакрашенные прямоугольники в левой части каждого столбца) и соответствующих здоровых образцов (точки и закрашенные прямоугольники в правой части каждого столбца). * обозначает $p < 0,01$. (См. Пример 9).

[0057] На **фиг. 8** показан эффект PILRA Fc в комбинации с антителом к PD-L1 в сингенной модели опухоли MC38. (См. Пример 10).

[0058] На **фиг. 9** показано, что hPA-002, hPA-005 и hPA-004 демонстрируют конкурентное связывание с PILRA-экспрессирующими клетками, тогда как Ab 2175B - нет. (См. Пример 12).

[0059] На **фиг. 10А** показывает график, демонстрирующий относительное количество PILRA в родительских клетках U937, контрольных клетках U937 и клетках PILRA OE U937. (См. Пример 13).

[0060] На **фиг. 10В** показано продукцию MCP-1 в родительских клетках U937, контрольных клетках U937 и клетках U937 PILRA OE, обработанных IgG, hPA-002, hPA-005 и hPA-004. (См. Пример 13).

[0061] На **фиг. 10С** показано продукцию RANTES в родительских клетках U937, контрольных клетках U937 и клетках U937 PILRA OE, обработанных IgG, hPA-002, hPA-005 и hPA-004. (См. Пример 13).

[0062] На **фиг. 11** показано влияние различных концентраций антител к PILRA на продукцию MCP-1 в клетках U937 PILRA OE. (См. Пример 14).

[0063] На **фиг. 12** показано, что hPA-002, hPA-005 и hPA-004 усиливают активацию рецептора Fc в первичных моноцитах человека. (См. Пример 15.)

[0064] На **фиг. 13** показано выравнивание последовательностей белков PILRA человека (SEQ ID NO: 1) и PILRB человека (SEQ ID NO: 68).

[0065] На **фиг. 14А и 14В** представлены схемы структуры PILRA (аминокислоты 32-150 с Met, добавленным к N-концу) (на основе Kuroki *et al.* PNAS 111: 877-8882 (2014); structure code 3WV0) с аминокислотами, которые отличаются от меченых PILRB.

5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0066] В данном документе предложены антитела (например, моноклональные антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PILRA, например, PILRA человека. Антитела к PILRA человека и их антигенсвязывающие фрагменты могут, например, блокировать связывание PILRA человека с лигандом и/или подавлять PILRA клеточной поверхности человека. В данном документе предложены иллюстративные антитела к PILRA человека, которые демонстрируют эти активности. Блокирование связывания PILRA человека с лигандом и/или подавление PILRA клеточной поверхности человека снижает ингибирующую передачу сигналов PILRA, что приводит к активации и дифференцировке миелоидных клеток. Эти действия могут способствовать противоопухолевому иммунитету и противодействовать механизмам нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и другие заболевания, связанные с дисфункцией микроглии.

[0067] Также предложены выделенные нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды), такие как комплементарная ДНК (кДНК), кодирующая такие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, предложены векторы (например, векторы экспрессии) и клетки (например, клетки-хозяева), содержащие нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды), кодирующие такие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Также предложены способы получения таких антител и их антигенсвязывающих фрагментов.

[0068] В других аспектах в данном документе предложены способы применения таких антител, например, для модулирования активности PILRA. Активность PILRA можно модулировать, например, путем изменения связывания PILRA с одним или более его лигандами. В некоторых аспектах антитела к PILRA человека, предложенные в данном документе, используются для блокирования связывания PILRA человека с лигандом и/или для подавления PILRA клеточной поверхности человека.

[0069] В дополнительных аспектах антитела к PILRA человека, предложенные в данном документе, используются для активации *in vitro* или *in vivo* миелоидных клеток, таких как макрофаги, моноциты, дендритные клетки, нейтрофилы и микроглия. В дополнительных аспектах антитела к PILRA человека, предложенные в данном документе, применяют для лечения заболеваний, при которых миелоидные клетки являются дисфункциональными или недостаточными, например, заболеваний, при которых желательна активация миелоидных клеток, дифференцировка миелоидных клеток или активация врожденной иммунной системы. В некоторых аспектах такие заболевания включают, но не ограничиваются этим, рак и нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера. В частности, вариант PILRA R78, который, как сообщается, снижает связывание PILRA с несколькими его лигандами, связан со сниженным риском болезни Альцгеймера. Следовательно, в некоторых аспектах антитела к PILRA человека, которые снижают функцию PILRA (например, путем блокирования связывания PILRA с лигандом и/или подавления активности PILRA клеточной поверхности человека), могут быть полезны для лечения болезни Альцгеймера. Также предложены соответствующие композиции (например, фармацевтические композиции), наборы и способы.

5.1 Терминология

[0070] Используемый в данном документе термин «PILRA» относится к полипептидам PILRA млекопитающих, включая, но не ограничиваясь ими, нативные полипептиды PILRA и изоформы полипептидов PILRA. «PILRA» включает полноразмерные непротессированные полипептиды PILRA, а также формы полипептидов PILRA, которые образуются в результате процессинга внутри клетки. Используемый в данном документе термин «PILRA человека» относится к полипептиду, включающему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; встречающимся в природе вариантам SEQ ID NO: 1, включая, но не ограничиваясь ими, варианты, в которых либо G, либо R присутствует в положении 78 SEQ ID NO: 1; и обработанным формам SEQ ID NO: 1, включая, помимо прочего, SEQ ID NO: 1, в которой отсутствует ее сигнальный пептид, например, из аминокислот 1-19 SEQ ID NO: 1. «Полинуклеотид PILRA», «нуклеотид PILRA» или «нуклеиновая кислота PILRA» относится к полинуклеотиду, кодирующему любой PILRA, включая описанные выше.

[0071] Термин «антитело» означает молекулу иммуноглобулина, которая распознает и специфически связывается с мишенью, такой как белок, полипептид, пептид, углевод, полинуклеотид, липид или их комбинации (например, гликопротеин), по меньшей мере через один сайт распознавания антигена в вариабельной области молекулы иммуноглобулина. Термин «антитело», в контексте данного документа, охватывает поликлональные антитела, моноклональные антитела, химерные антитела, гуманизированные

антитела, антитела человека и любую другую молекулу иммуноглобулина, при условии, что антитела проявляют желаемую биологическую активность. Антитело может принадлежать любому из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM или их подклассов (изотипов) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2), на основании идентичности их константных доменов тяжелой цепи называемых альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, соответственно. Различные классы иммуноглобулинов имеют различные и хорошо известные структуры субъединиц и трехмерные конфигурации. Антитела могут быть «голыми», частью слитого белка или конъюгированы с другими молекулами, такими как токсины, радионуклиды и т. д.

[0072] Термин «фрагмент антитела» относится к части антитела. «Антигенсвязывающий фрагмент», «антигенсвязывающий домен» или «антигенсвязывающая область» относится к части антитела, которая связывается с антигеном. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать определяющие антиген области антитела (например, области, определяющие комплементарность (CDR)). Примеры антигенсвязывающих фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, линейные антитела и одноцепочечные антитела. Антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть получен от любого вида животных, таких как грызуны (например, мышь, крыса или хомяк) и человека, или может быть получен искусственно.

[0073] Термины «антитело к PILRA», «антитело PILRA» и «антитело, которое связывается с PILRA» относятся к антителу, которое способно связывать PILRA с достаточной аффинностью, так что антитело можно использовать в качестве диагностического, терапевтического и/или как модулятор активности PILRA. Степень связывания анти-PILRA антитела с неродственным белком, не являющимся PILRA, составляет менее чем около 10 % от связывания антитела с PILRA, как измерено, например, с помощью радиоиммунологического анализа (РИА). Антитело к PILRA может связываться исключительно с PILRA, а не с PILRB, или антитело к PILRA может связываться как с PILRA, так и с PILRB.

[0074] «Моноклональное» антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к гомогенной популяции антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, вовлеченной в высокоспецифическое распознавание и связывание одной антигенной детерминанты, или эпитопа. Этим они отличаются от поликлональных антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против различных антигенных детерминант. Термин «моноклональное» антитело или его антигенсвязывающий фрагмент охватывает как интактные, так и полноразмерные моноклональные антитела, а также фрагменты антител (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные (scFv) мутанты, слитые белки, содержащие часть антитела, и любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина, содержащую сайт распознавания антигена. Кроме того, «моноклональное» антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к таким антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, полученным любым количеством способов, включая, но не ограничиваясь, гибридомой, селекцией с помощью фагового дисплея, рекомбинантной экспрессией и трансгенными животными.

[0075] В контексте данного документа термины «варибельная область» или «варибельный домен» используются взаимозаменяемо и являются общими в данной области техники. Указанная варибельная область обычно относится к фрагменту антитела, как правило, к фрагменту легкой или тяжелой цепи, обычно около аминоконцевого участка от 110 до 120 аминокислот или от 110 до 125 аминокислот в зрелой тяжелой цепи и от около 90 до 115 аминокислот в зрелой легкой цепи, которые сильно различаются по последовательности среди антител и используются для связывания и специфичности конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Варибельность последовательности сосредоточена в тех областях, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), в то время как более

высококонсервативные области в вариабельном домене называются каркасными областями (FR). Не желая быть связанными каким-либо конкретным механизмом или теорией, полагают, что CDR легкой и тяжелой цепей в первую очередь ответственны за взаимодействие и специфичность антитела с антигеном. В некоторых аспектах вариабельная область представляет собой вариабельную область человека. В некоторых аспектах вариабельная область включает CDR грызунов или мышей и человеческие каркасные области (FR). В некоторых аспектах вариабельная область представляет собой вариабельную область приматов (*например*, приматов, не относящихся к человеку). В некоторых аспектах вариабельная область включает CDR грызунов или мышей и каркасные области (FR) приматов (*например*, приматов, не относящихся к человеку).

[0076] Термины «VL» и «домен VL» используются взаимозаменяемо для обозначения вариабельной области легкой цепи антитела.

[0077] Термины «VH» и «домен VH» используются взаимозаменяемо для обозначения вариабельной области тяжелой цепи антитела.

[0078] Термин «нумерация по Кабат» и подобные термины известны в данной области техники и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков в вариабельных областях тяжелой и легкой цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах CDR могут быть определены в соответствии с системой нумерации по Кабат (*см.*, *например*, Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190: 382-391 and Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Используя систему нумерации по Кабат, CDR в молекуле тяжелой цепи антитела, как правило, присутствуют в положениях аминокислот с 31 по 35, которые необязательно могут включать одну или две дополнительные аминокислоты после 35 (обозначаются в схеме нумерации по Кабат как 35A и 35B). (CDR1), положения аминокислот с 50 по 65 (CDR2) и положения аминокислот с 95 по 102 (CDR3). Используя систему нумерации по Кабат, CDR в молекуле легкой цепи антитела обычно присутствуют в положениях аминокислот с 24 по 34 (CDR1), положениях аминокислот с 50 по 56 (CDR2) и положениях аминокислот с 89 по 97 (CDR3). В некоторых аспектах CDR описанных в данном документе антител были определены в соответствии со схемой нумерации по Кабат.

[0079] Нумерация по Chothia, напротив, относится к расположению структурных петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Chothia при нумерации согласно системе нумерации по Кабат варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что в схеме нумерации по Кабат в H35A и H35B размещаются вставки; если ни 35A ни 35B не присутствуют, петля заканчивается в 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается в 33; если присутствуют оба 35A и 35B, петля заканчивается в 34). Гипервариабельные области по AbM представляют собой компромиссный вариант между CDR по Кабат, и структурными петлями по Chothia, и используются в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM.

Петля	Кабат	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32...34
		(нумерация по Кабат)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		(нумерация по Chothia)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0080] Используемые в данном документе термины «константная область» или «константный домен» являются взаимозаменяемыми и имеют общепринятое в данной области техники значение. Константная область представляет собой часть антитела, например, карбоксиконцевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая непосредственно не участвует в связывании антитела с антигеном, но может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Константная область молекулы иммуноглобулина, как правило, имеет более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с вариабельным доменом иммуноглобулина. В определенных аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область или ее часть, достаточную для антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).

[0081] Термин «тяжелая цепь», в контексте данного документа, когда он используется в отношении антитела, может относиться к любому отдельному типу, *например*, альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), на основе аминокислотной последовательности константного домена, которые дают начало классам антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно, включая подклассы IgG, *например*, IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Аминокислотные последовательности тяжелой цепи хорошо известны в данной области техники. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь человека.

[0082] Термин «легкая цепь», в контексте данного документа, при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, *например*, каппа (κ) или лямбда (λ) на основе аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легкой цепи хорошо известны в данной области техники. В некоторых аспектах легкая цепь представляет собой легкую цепь человека.

[0083] Термин «химерные» антитела или их антигенсвязывающие фрагменты относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, причем аминокислотная последовательность получена из двух или более видов. Как правило, вариабельная область как легких, так и тяжелых цепей соответствует вариабельной области антител или их антигенсвязывающих фрагментов, полученных от одного вида млекопитающих (например, мыши, крысы, кролика и т.д.) с желаемой специфичностью, аффинностью и характеристиками, в то время как константные области гомологичны последовательностям антител или их антигенсвязывающих фрагментов, полученным от другого источника (как правило, человека), чтобы избежать индукции иммунного ответа у этого вида.

[0084] Термин «гуманизированное» антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к формам антител, не являющихся человеческими (например, мышиных) или антигенсвязывающим

фрагментам, которые представляют собой специфические цепи иммуноглобулина, химерные иммуноглобулины или их фрагменты, которые содержат минимальное количество не являющихся человеческими (например, мышиные) последовательностей. Как правило, гуманизированные антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой иммуноглобулины человека, в которых остатки из определяющих комплементарность областей (CDR) заменены остатками из CDR не относящихся к человеку видов (например, мыши, крысы, кролика, хомяка), которые имеют желаемую специфичность, аффинность и характеристики («с привитой CDR») (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534-1536 (1988)). Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно дополнительно модифицировать путем замены дополнительных остатков либо в каркасной области Fv, либо в замещенных нечеловеческих остатках для уточнения и оптимизации специфичности, аффинности и/или способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Как правило, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент будут содержать VH и VL, которые содержат по существу все по меньшей мере одну, а обычно две или три области CDR, которые соответствуют иммуноглобулину нечеловеческого происхождения, тогда как все или по существу все области FR являются областями консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может также содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Примеры способов, используемых для получения гуманизированных антител, описаны в патенте США №№ 5225539; Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3):969-973 (1994), и Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904 (1996). В некоторых аспектах «гуманизированное антитело» представляет собой антитело с измененной поверхностью.

[0085] Термин «антитело человека» или его антигенсвязывающий фрагмент означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из локуса гена иммуноглобулина человека, где такое антитело или антигенсвязывающий фрагмент получают с использованием любого способа, известного в данной области техники. Это определение антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента включает интактные или полноразмерные антитела и их фрагменты.

[0086] «Аффинность связывания» обычно относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (*например*, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом) и ее партнером по связыванию (*например*, антигеном). Если не указано иное, в контексте настоящего описания «аффинность связывания» относится к действительной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие в соотношении 1:1 между членами связывающей пары (*например*, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно может быть представлена константой диссоциации (K_D). Аффинность может быть измерена и/или выражена рядом способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, равновесную константу диссоциации (K_D) и равновесную константу ассоциации (K_A). K_D рассчитывается как соотношение k_{off}/k_{on} , тогда как K_A рассчитывается как соотношение k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости ассоциации, *например*, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном, а k_{off} относится к константе диссоциации, *например*, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента от антигена. k_{on} и k_{off} можно определить методами, известными специалистам в данной области техники, такими как BIAcore® или KinExA.

[0087] «Блокирующее» антитело, или антитело которое «блокирует» или которое является «ингибирующим» или которое «ингибирует», представляет собой антитело, которое уменьшает или

ингибирует (частично или полностью) связывание своего белка-мишени с одним или более лигандами, когда антитело связывается с белком-мишенью и/или которое уменьшает или ингибирует (частично или полностью) одну или более активностей или функций белка-мишени, когда антитело связывается с белком-мишенью.

[0088] Антитело, которое «подавляет» свой белок-мишень, снижает экспрессию белка-мишени на клеточной поверхности.

[0089] Используемый в данном документе термин «эпитоп» представляет собой термин в данной области техники и относится к локализованной области антигена, с которой может специфически связываться антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или смежный эпитоп), или эпитоп может, например, объединяться из двух или более несмежных участков полипептида или полипептидов (конформационных, нелинейных, прерывистый или несмежный эпитоп). В некоторых аспектах, указанный эпитоп, с которым связывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть определен, *например*, с помощью ЯМР-спектроскопии, исследований дифракционной рентгеновской кристаллографии, ИФА, анализов обмена водорода/дейтерия в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографией с масс-спектрометрией с электрораспылением), анализы сканирования массива олигопептидов и/или картирование мутагенеза (*например*, картирование направленного мутагенеза). Для рентгеновской кристаллографии кристаллизацию можно осуществить с использованием любого из известных в данной области техники методов (например, Giegé R *et al.*, (1994) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) Eur J Biochem 189: 1-23; Chayen NE (1997) Structure 5: 1269-1274; McPherson A (1976) J Biol Chem 251: 6300-6303). Кристаллы антитела/его антигенсвязывающего фрагмента и их антигена могут быть изучены с использованием хорошо известных рентгенографических методов и могут быть уточнены с помощью компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Йельский университет, 1992, распространяется Molecular Simulations, Inc.; *см.*, например, Meth Enzymol (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW *et al.*; U.S. 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) Meth Enzymol 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P *et al.*, (2000) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56(Pt 10): 1316-1323). Картирование посредством мутагенеза может быть выполнено с использованием любого метода, известного специалисту в данной области техники. *См.*, *например*, Champe M *et al.*, (1995) J Biol Chem 270: 1388-1394 и Cunningham BC & Wells JA (1989) Science 244: 1081-1085 для описания методов мутагенеза, включая методы аланин-сканирующего мутагенеза.

[0090] Антитело к PILRA, которое «связывается с тем же эпитопом», что и эталонное антитело к PILRA, относится к антителу, которое контактирует с теми же аминокислотными остатками PILRA, что и эталонное антитело к PILRA. Способность антитела к PILRA связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к PILRA, определяют с использованием пептидного сканирующего мутагенеза или высокопроизводительного аланинового сканирующего мутагенеза (*см.* Davidson and Doranz, 2014 Immunology 143, 13-20). В последнем методе полная библиотека мутаций PILRA или ее часть (например, внеклеточный домен) может быть создана путем мутации каждого отдельного аминокислотного остатка в аланин (или, если аминокислотный остаток представляет собой аланин, то в другой остаток, такой как, серин) и тестирование каждого мутанта на связывание с антителом к PILRA или его антигенсвязывающим фрагментом. Аминокислоты, необходимые для связывания и, следовательно, являющиеся остатками эпитопа, идентифицируются по потере иммунореактивности.

[0091] Используемые в данном документе термины «иммуноспецифически связывает», «иммуноспецифически распознает», «специфически связывает» и «специфически распознает» являются

аналогичными терминами в контексте антител или их антигенсвязывающих фрагментов. Эти термины указывают на то, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом через его антигенсвязывающий домен и что связывание влечет за собой комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Соответственно, антитело, которое «специфически связывается» с PILRA человека (например, SEQ ID NO: 1), может также связываться с PILRA других видов (например, PILRA яванского макака) и/или белками PILRA, полученными из других аллелей человека, но степень связывания с неродственным белком, не относящимся к PILRA (например, с другими иммуномодулирующими белками, содержащими домены ITIM), составляет чем около 10 % от связывания антитела с PILRA, измеренного, например, с помощью радиоиммуноанализа (РИА).

[0092] Считается, что антитело «конкурентно ингибирует» связывание эталонного антитела с данным эпитопом, если оно преимущественно связывается с этим эпитопом или перекрывающимся эпитопом до такой степени, что оно блокирует связывание эталонного антитела с эпитопом. Конкурентное ингибирование может быть определено любым способом, известным в данной области техники, например, конкурентным ИФА. Можно сказать, что антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом на по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 60 %, или по меньшей мере 50 %.

[0093] Полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка, или композиция, которые являются «выделенными», представляют собой полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетку, или композицию, которая присутствует в форме, не встречающейся в природе. Выделенные полипептиды, антитела, полинуклеотиды, векторы, клетки или композиции включают те, которые были очищены до такой степени, что они больше не присутствуют в той форме, в которой они находятся в природе. В некоторых аспектах выделенные антитело, полинуклеотид, вектор, клетка, или композиция являются по существу чистой. Используемый в данном документе термин «по существу чистый» относится к материалу, который чистый по меньшей мере на 50 % (то есть без загрязнений), чистый по меньшей мере на 90 %, чистый по меньшей мере на 95 %, чистый по меньшей мере на 98 % или чистый по меньшей мере на 99 %.

[0094] Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может быть разделен не аминокислотами. Кроме того, указанные термины включают аминокислотный полимер, который был модифицирован природным путем или путем вмешательства, например, образованием дисульфидных связей, гликозилированием, липидацией, ацетилированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями или модификациями, такие как конъюгация с меченым компонентом. Также термин включает, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включающие, например, неприродные аминокислоты и т. д.), а также другие модификации известные в данной области техники. Понятно, что, поскольку полипептиды по данному изобретению основаны на антителах, в некоторых аспектах полипептиды могут встречаться в виде отдельных цепей или связанных цепей.

[0095] Используемый в данном документе термин «клетка-хозяин» может относиться к любому типу клеток, например, первичной клетке, клетке в культуре или клетке из клеточной линии. В некоторых аспектах термин «клетка-хозяин» относится к клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, и потомству или потенциальному потомству такой клетки. Потомство такой клетки может не быть идентичным с родительской клеткой, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, например, вследствие

мутаций или влияния окружения, которые могут возникать в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

[0096] Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечить биологическую активность активного ингредиента, чтобы быть эффективным, и который не содержит каких-либо дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться состав. Состав может быть стерильным.

[0097] Термины «ввести», «вводить», «введение» и т.п., используемые в данном документе, относятся к способам, которые могут использоваться для обеспечения доставки лекарственного средства, например, антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента в желаемый участок биологического действия. Методы введения, которые можно использовать с описанными в настоящем документе агентами и способами, можно найти в, например, Goodman and Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, current edition, Pergamon; and Remington's, *Pharmaceutical Sciences*, current edition, Mack Publishing Co., Easton, Pa.

[0098] В контексте данного документа термины «субъект» и «пациент» употребляются взаимозаменяемо. Субъект может представлять собой млекопитающее, такое как животное, не являющееся человеком (например, корова, свинья, лошадь, кошка, собака, крыса, мышь, обезьяна или другой примат и т.д.). В некоторых аспектах указанным субъектом является яванский макак. В некоторых аспектах субъектом является человек.

[0099] Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству лекарственного средства, например, антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективного для лечения заболевания или патологического состояния у субъекта. В случае злокачественного новообразования, терапевтически эффективное количество лекарственного средства может уменьшить количество раковых клеток; уменьшить размер или массу опухоли; ингибировать (т. е., замедлить до некоторой степени и в некоторых аспектах остановить) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (т. е., замедлить до некоторой степени и в некоторых аспектах остановить) метастазирование опухоли; ингибировать до некоторой степени рост опухоли; облегчить в некоторой степени один или более симптомов, связанных с раком; и/или привести к положительному ответу, такому как увеличенная выживаемость без прогрессирования (PFS), безрецидивная выживаемость (DFS), или общая выживаемость (OS), полный ответ (CR), частичный ответ (PR), или, в некоторых случаях, стабильное заболевание (SD), уменьшение прогрессирования заболевания (PD), уменьшенное время до прогрессирования (TTP) или любой их комбинации. В той степени, в которой лекарственное средство может предотвращать рост и/или убивать существующие раковые клетки, оно может быть цитостатическим и/или цитотоксическим.

[0100] Такие термины, как «лечение», или «лечат», или «лечить», или «облегчение», или «облегчить» относятся к терапевтическим мерам, которые излечивают, замедляют, уменьшают симптомы и/или останавливают прогрессирование диагностируемого патологического состояния или расстройства. Таким образом, те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже с диагнозом или подозрением на заболевание. В некоторых аспектах у субъекта успешно «лечат» злокачественное новообразование в соответствии со способами по данному изобретению, если пациент демонстрирует одно или более из следующего: уменьшение количества или полное отсутствие раковых клеток; уменьшение размера опухоли; ингибирование или отсутствие инфильтрации раковых клеток в периферические органы, включая, например, распространение рака в мягкие ткани и кости; ингибирование или отсутствие метастазов опухоли; ингибирование или отсутствие роста опухоли; облегчение одного или более симптомов, ассоциированных с конкретным онкологическим заболеванием; снижение заболеваемости и смертности; улучшение качества

жизни; уменьшение туморогенности, частоты развития опухолей или туморогенного потенциала опухоли; уменьшение количества или частоты раковых стволовых клеток в опухоли; дифференциацию туморогенных клеток в нетуморогенное состояние; увеличение выживаемости без прогрессирования (PFS), безрецидивной выживаемости (DFS), или общей выживаемости (OS), полного ответа (CR), частичного ответа (PR), или стабильного заболевания (SD), уменьшение прогрессирования заболевания (PD), уменьшенное время до прогрессирования (TTP) или любую их комбинацию.

[0101] Термины «рак» и «раковый» относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, при котором популяция клеток характеризуется нерегулируемым клеточным ростом. Такие виды рака могут включать солидные опухоли, например солидные опухоли, при которых миелоидные клетки (моноциты, макрофаги, дендритные клетки, гранулоциты, нейтрофилы, микроглия или другие врожденные иммунные клетки) проникли в микроокружение опухоли. Примеры таких видов рака включают, но не ограничиваются ими, глиобластома, рак головы и шеи, рак почки (например, светлоклеточный рак почки), рак поджелудочной железы и рак молочной железы. Рак может быть «PILRA-положительным раком». Этот термин относится к раку, содержащему клетки (например, миелоидные клетки, инфильтрировавшие рак), которые экспрессируют мРНК или белок PILRA. Рак может быть раком с «повышенным уровнем мРНК или белка PILRA». Это относится к раку, который имеет больше PILRA (например, на миелоидных клетках, проникших в рак), чем здоровая версия той же ткани.

[0102] Как используется в данном описании и формуле изобретения, формы единственного числа включают формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное.

[0103] Следует понимать, что в тех случаях, когда аспекты описаны в настоящем документе с формулировкой «содержащий», в ином способе также предложены аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по существу из». В данном изобретении «содержит», «содержащий», «включающий» и «имеющий» и т.п. может означать «включает», «включает в себя» и т.п.; «состоящий в основном из» или «состоящий по существу из» являются открытыми, допуская присутствие большего, чем то, что цитируется, при условии, что основные или новые характеристики того, что цитируется, не изменяются присутствием большего, чем то, что цитируется, но исключают аспекты предшествующего уровня техники.

[0104] Если специально не указано или не очевидно из контекста, как используется в настоящем документе, термин «или» понимается как включающий. Предполагается, что термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А и/или В», включает как «А, так и В», «А или В», «А» и «В». Аналогично, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В, и С; А, В, или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (только); В (только); и С (только).

[0105] Используемые в настоящем документе термины «около» и «приблизительно» при использовании для изменения числового значения или числового диапазона указывают, что отклонения до 10% больше и до 10% меньше значения или диапазона остаются в предполагаемых пределах приведенного значения или диапазона. Подразумевается, что везде, где аспекты описаны в данном документе с формулировкой «около» или «приблизительно» числового значения или диапазона, в противном случае также предоставляются аналогичные аспекты, относящиеся к конкретному числовому значению или диапазону.

[0106] Любые композиции или способы, представленные в настоящем документе, могут быть объединены с одной или более из любых других композиций и способов, представленных в настоящем документе.

5.2 Антитела

[0107] В одном аспекте в данном документе предложены антитела (например, моноклональные антитела, такие как химерные, гуманизированные или человеческие антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PILRA, таким как PILRA человека, мыши или яванского макака. В конкретном аспекте в данном документе предложены антитела (например, моноклональные антитела, такие как химерные, гуманизированные или человеческие антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PILRA человека. Аминокислотные последовательности PILRA человека, яванского макака и мыши известны в данной области и также предложены в данном документе, как представлено SEQ ID NO: 1-3 соответственно.

PILRA человека:

MGRPLLLPLLLPLLLPPAFLQPSGSTGSGPSYLYGVTQPKHLSASMGGSV EIPFSFYYPWELATAPDVRISWRR
GHFHRQSFYSTRPPSIHKDYVNRLFLNWTEGQKSGFLRISNLQKQDQSVYFCRVELDTRSSGRQQWQSIEG
TKLSITQAVTTTTQRPSMTTWTWRLSSTTTTTGLRVTQGKRSDSWHISLETAVGVAVAVTVLGIMILGLIC
LLRWRRRKGGQQRTKATTPAREPFQNTTEEPYENIRNEGQNTDPKLNPKDDGIVYASLALSSSTSPRAPPSHRP
LKSPQNETLYSVLKA (SEQ ID NO:1)

[0108] В некоторых аспектах предполагается, что указанная выше последовательность PILRA человека не имеет своей сигнальной последовательности. Например, последовательность PILRA человека может содержать аминокислоты 20-303 SEQ ID NO: 1. Вышеупомянутая последовательность PILRA человека (SEQ ID NO: 1) представляет собой вариант последовательности, в которой аргинин (R) присутствует в положении 78 и кодируется аллелем, ассоциированным с защитой от болезни Альцгеймера. В некоторых аспектах рассматривается вариантная последовательность PILRA, в которой положение 78 занято глицином (G). Другие признаки PILRA человека, как показано в SEQ ID NO: 1, содержат внеклеточный домен (ECD) примерно из аминокислот 20-197 с доменом IgV примерно из аминокислот 32-150 и мотивы ITIM примерно из аминокислот 267-272 и 296-301.

PILRA яванского макака:

MGRPLLLPLLLPLLLPPAFLQPGGSAGSGPSGPYGV TQRKHL SAPMGGSV EIPFSFYHPWELAAAPNMK
ISWRRGNFHGEFFYRTRPAFIHEDYSNRLLLNWTEGQDRG LLRIWNLRKEDQSVYFCRVELDTRRSGRQR
WQSIEGTKLTITQAVTTTTQRPSMTTTRRPSSATTTAGLRVTQGKRHSDSWHLSLKTAVGVTVAVAVLGI
MILGLICLLRWRRRKGGQQRTKATTPAKEPFQNTTEEPYENIRNEGQNTDPKPNPKDDGIVYASLALSSSTSPR
VPPSHHPLKSPQNETLYSVLKV (SEQ ID NO:2)

[0109] В некоторых аспектах предполагается, что указанная выше последовательность PILRA яванского макака не имеет своей сигнальной последовательности. Например, последовательность PILRA яванского макака может содержать аминокислоты 24-307 SEQ ID NO: 2.

PILRA мыши

MALLISLPGGTPAMAQILLLLSSAC LHAGNSERSNRKNGFGVNQPESCSGVQGGSIDIPFSFYFPWKLAKDP
QMSIAWRWKDFHGEFIYNSSLPIHEHF KGRLLNLNWTEGQGTSGVLRILNLKESDQTRYFGRVFLQTTEGIQF
WQSIPGTQLNVTNATCTPTLPSTTAATSAHTQNDITEVK SANIGGLDLQTTVGLATAAAVFLVGVLGLIVF
LWWKRRRQGGQKTKAEIPAREPLETSEKHESVGHEGQCMDPKENPKDNNIVYASISLSSPTSPGTAPNLPVH
GNPQEETVYSIVKAK (SEQ ID NO:3)

[0110] В некоторых аспектах предполагается, что указанная выше последовательность PILRA мыши не имеет своей сигнальной последовательности. Например, последовательность PILRA мыши может содержать аминокислоты 32-302 SEQ ID NO: 3.

[0111] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с PILRA человека (например, SEQ ID NO: 1 или аминокислотами 20-303 SEQ ID NO: 1, или любой из вышеуказанных последовательностей, в которой R или G находится в положении 78). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с PILRA человека и PILRA яванского макака (например, SEQ ID NO: 2 или аминокислотами 24-307 SEQ ID NO: 2). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с PILRA человека, но не связывается с PILRA яванского макака (например, SEQ ID NO: 2 или аминокислотами 24-307 SEQ ID NO: 2). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с PILRA человека, но не связывается с PILRA мыши (например, SEQ ID NO: 3 или аминокислотами 32-302 SEQ ID NO: 3). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с PILRA человека (и необязательно с PILRA яванского макака) и с PILRB человека (например, SEQ ID NO: 68, как показано ниже, или аминокислотами 20-227 SEQ ID NO: 68). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с PILRA человека (и необязательно с PILRA яванского макака), но не связывается с PILRB человека.

[0112] Последовательность PILRB человека представлена ниже как SEQ ID NO: 68.
MGRPLLLPLLLLQPPAFLQPGGSTGSGPSYLYGVTQPKHLSASMGGSVEIPFSFYYPWELAIVPNVRISWR
RGHFHGGQSFYSTRPPSIHKDYVNRLFLNWTEGQESGFLRISNLRKEDQSVYFCRVELDTRRSGRQQLQSIKG
TKLTITQAVTTTTTWRPSSTTTIAGLRVTESKGHSESWHLSLDTAIRVALAVAVLKTVILGLLCLLLWRRR
RKGSRAPSSDF (SEQ ID NO: 68)

[0113] В некоторых аспектах предполагается, что указанная выше последовательность PILRB человека не имеет своей сигнальной последовательности. Например, последовательность PILRB человека может содержать аминокислоты 20-227 SEQ ID NO: 68. Выравнивание аминокислотных последовательностей PILRA человека и PILRB человека представлено на фигуре 13. Следующие аминокислоты PILRA отличаются от таковых в PILRB: P11 (в сигнальной последовательности), L14 (в сигнальной последовательности), S22 (в сигнальной последовательности), T63, A64, D66, R78, K106, Q116, Q118, S133, W139, E143, S148, T156-M163, L169, T175, T176, Q182, G183, R185, R186, D188, I192 и E195.

[0114] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с внеклеточным доменом PILRA человека (аминокислоты 20-197 SEQ ID NO: 1).

[0115] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с PILRA человека и содержат шесть CDR антитела, перечисленные в таблицах 1 и 2 (т. е. три CDR VH антитела, перечисленных в таблице 1, и три CDR VL того же антитела, перечисленных в таблице 2).

Таблица 1. Аминокислотные последовательности CDR¹ VH

Антитело	CDR1 VH (SEQ ID NO:)	CDR2 VH (SEQ ID NO:)	CDR3 VH (SEQ ID NO:)
hPA-002	TFGMGVG (SEQ ID NO:4)	HIWDDDDKYNPALKS (SEQ ID NO:5)	VEDYGNPFDY (SEQ ID NO:6)
hPA-005	TFGMGVG (SEQ ID NO:10)	HIWDDDDKFYNPALKS (SEQ ID NO:11)	IEDYGSYFAY (SEQ ID NO:12)

hPA-004	SFGVAVG (SEQ ID NO:16)	HIWWDDDKSYNPALKS (SEQ ID NO:17)	IADYGNHFDY (SEQ ID NO:18)
hPA-001	TFGMGVG (SEQ ID NO:22)	HIWWDDDKYYNPALKS (SEQ ID NO:23)	IEDYGNPFDY (SEQ ID NO:24)

¹ CDR VH в Таблице 1 определены согласно Kabat.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности CDR² VL

Антитело	CDR1 VL (SEQ ID NO:)	CDR2 VL (SEQ ID NO:)	CDR3 VL (SEQ ID NO:)
hPA-002	HASQNIHVWLN (SEQ ID NO:7)	KASNLHT (SEQ ID NO:8)	QQGQSYPLT (SEQ ID NO:9)
hPA-005	HASQNIHVWLN (SEQ ID NO:13)	KASNLHT (SEQ ID NO:14)	QQGQSYPYT (SEQ ID NO:15)
hPA-004	HASQNSHVWLS (SEQ ID NO:19)	KASNLHT (SEQ ID NO:20)	QQGQTPFT (SEQ ID NO:21)
hPA-001	HASQNIHVWLS (SEQ ID NO:25)	KASNLHT (SEQ ID NO:26)	QQGQSYPLT (SEQ ID NO:27)

² CDR VL в Таблице 2 определены согласно Kabat.

[0116] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с PILRA человека и содержат VH антитела, приведенные в Таблице 3.

Таблица 3: Аминокислотные последовательности вариабельной тяжелой цепи (VH)

Антитело	Аминокислотная последовательность VH (SEQ ID NO)
hPA-002	QVTLQESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTFGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWW DDDKYYNPALKSRLTISKDTSKNQVFLKIASVDTADIATYYCARVEDYGNPFDY WGQGTTTL (SEQ ID NO:28)
hPA-005	QVILKESGPGILQSSQTLSTCSFSGFSLSTFGMGVGWIRQPSGKGLESLAHIWWD DDKFYNPALKSRLTISKDTSKSQVFLKIANVDTADIATYYCTRIEDYGSYFAYWG QGTTTLTVSS (SEQ ID NO:30)
hPA-004	QVTLKESGPGMLQPSQTLSLACSFSGFSLNSFGVAVGWIRQPSGKGLEWLAHIW WDDDKSYNPALKSRLTISKDTSKNQVFLKLANVDTADTATYYCTRIADYGNHFD YWGQGTALT TVSS (SEQ ID NO:32)
hPA-001	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLTTFGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWW DDDKYYNPALKSRLTISKDISKNQVFLKIANVDTADTATYYCARIEDYGNPFDYW GQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:34)

[0117] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с PILRA человека и содержат VL антитела, приведенные в Таблице 4.

Таблица 4: Аминокислотные последовательности вариабельной легкой цепи (VL)

Анти тело	Аминокислотная последовательность VL (SEQ ID NO)
-----------	--

hPA-002	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNIHVWLNWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTVTISLQPEDATYYCQQGQSYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:29)
hPA-005	DVQMNQSPSSLSASLGDPITITCHASQNIHVWLNWYQQKPGNIPRLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDATYYCQQGQSYPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:31)
hPA-004	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNSHVWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISGLQPEDATYYCQQGQTYPTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:33)
hPA-001	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNIHVWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDATYYCQQGQSYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:35)

[0118] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с PILRA человека и содержат VH и VL антитела, приведенные в Таблицах 3 и 4 (т.е. VH антитела, перечисленные в Таблице 3, и VL того же антитела, указанные в таблице 4).

[0119] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с PILRA человека и содержат одну, две, три или все каркасные области VH антитела, перечисленные в таблице 5.

Таблица 5. Аминокислотные последовательности FR VH ³

Анти тело	FR1 VH (SEQ ID NO:)	FR2 VH (SEQ ID NO:)	FR3 VH (SEQ ID NO:)	FR4 VH (SEQ ID NO:)
hPA-002	QVTLQESGPGILQPSQTL SLTCSFSGFSLS (SEQ ID NO:36)	WIRQPSGKGLE WLA (SEQ ID NO:37)	RTISKDTSKNQVFLKIASV DTADIATYYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTLTV SS (SEQ ID NO:39)
hPA-005	QVILKESGPGILQSSQTL LTCSFSGFSLS (SEQ ID NO:44)	WIRQPSGKGLE SLA (SEQ ID NO:45)	RTISKDTSKSNQVFLKIANV DTADIATYYCTR (SEQ ID NO:46)	WGQGTTLTV SS (SEQ ID NO:47)
hPA-004	QVTLKESGPGMLQPSQT LSLACFSGFSLN (SEQ ID NO:52)	WIRQPSGKGLE WLA (SEQ ID NO:53)	RTISKDTSKNQVFLKLAN VDTADTATYYCTR (SEQ ID NO:54)	WGQGTALT TVSS (SEQ ID NO:55)
hPA-001	QVTLKESGPGILQPSQTL SLTCSFSGFSLT (SEQ ID NO:60)	WIRQPSGKGLE WLA (SEQ ID NO:61)	RTISKDISKNQVFLKIANV DTADTATYYCAR (SEQ ID NO:62)	WGQGTTLTV SS (SEQ ID NO:63)

³Каркасные области VH, описанные в Таблице 5, определены на основе границ системы нумерации по Кабат для CDR. Другими словами, CDR VH определяются по Кабат, а каркасные области представляют собой аминокислотные остатки, окружающие CDR в варибельной области в формате FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

[0120] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с PILRA человека и содержат одну, две, три или все каркасные области VL антитела, перечисленные в таблице 6.

Таблица 6. Аминокислотные последовательности VL FR ⁴

Антитело	FR1 VL (SEQ ID NO:)	FR2 VL (SEQ ID NO:)	FR3 VL (SEQ ID NO:)	FR4 VL (SEQ ID NO:)
hPA-002	DIQMNQSPSSLSASL GDTITITC (SEQ ID NO:40)	WYQQKPGNIPKL LIY (SEQ ID NO:41)	GVPSRFSGSGSGTGFTVTISS LQPEDIATYYC (SEQ ID NO:42)	FGAGTKLELK (SEQ ID NO:43)
hPA-005	DVQMNQSPSSLSASL GDPITITC (SEQ ID NO:48)	WYQQRPGNIPRL LIY (SEQ ID NO:49)	GVPSRFSGSGSGTGFTLTISL QPEDIATYYC (SEQ ID NO:50)	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:51)
hPA-004	DIQMNQSPSSLSASL GDTITITC (SEQ ID NO:56)	WYQQKPGNIPKL LIY (SEQ ID NO:57)	GVPSRFSGSGSGTGFTLTISG LQPEDIATYYC (SEQ ID NO:58)	FGSGTKLEIK (SEQ ID NO:59)
hPA-001	DIQMNQSPSSLSASL GDTITITC (SEQ ID NO:64)	WYQQKPGNIPKL LIY (SEQ ID NO:65)	GVPSRFSGSGSGTGFTLTISL QPEDIATYYC (SEQ ID NO:66)	FGAGTKLELK (SEQ ID NO:67)

⁴Каркасные области VL, описанные в Таблице 6, определены на основе границ системы нумерации по Kabat для CDR. Другими словами, CDR VL определяются по Kabat, а каркасные области представляют собой аминокислотные остатки, окружающие CDR в варибельной области в формате FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

[0121] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связываются с PILRA человека и содержат четыре каркасных участка VH и четыре каркасных участка VL антитела, приведенные в таблицах 5 и 6 (т.е. четыре каркасных участка VH антитела, указанное в таблице 5, и четыре каркасных участка VL того же антитела, указанные в таблице 6.)

[0122] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут быть описаны только его доменом VL, или только его доменом VH, или только его 3 CDR VL, или только его 3 CDR VH. См., например, публикацию Rader C et al. (1998) PNAS 95: 8910-8915, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки, описывающий гуманизацию мышиного антитела к $\alpha\beta 3$ путем идентификации комплементарной легкой цепи или тяжелой цепи, соответственно, из библиотеки легкой цепи или тяжелой цепи человека, что приводит к вариантам гуманизированного антитела, имеющие сродство выше или еще выше, чем сродство исходного антитела. См. также Clackson T et al., (1991) Nature 352: 624-628, которая полностью включена в данный документ в качестве ссылки, и описывает способы получения антител, которые связывают конкретный антиген, с использованием определенного домена VL (или домена VH) и скрининг библиотеки на наличие комплементарных варибельных доменов. Скрининг выявил 14 новых партнеров для определенного домена VH и 13 новых партнеров для определенного домена VL, которые были сильными связующими, как определено с помощью ИФА. См. также Kim SJ & Hong HJ, (2007) J Microbiol 45: 572-577, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки, описывающий способы получения антител, которые связываются со специфическим антигеном, с использованием специфического домена VH и скрининга библиотеки (например, библиотеки VL человека) на предмет комплементарных доменов VL; выбранные домены VL, в свою очередь, можно использовать для выбора дополнительных комплементарных (например, человека) доменов VH.

[0123] В некоторых аспектах указанные CDR антитела или их антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены в соответствии со схемой нумерации по Chothia, которая относится к расположению структурных петель иммуноглобулина (см., например, Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B et al., (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C et al., (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A et al., (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; и патент США № 7709226). Обычно при использовании системы нумерации по Kabat петля по Chothia CDR-H1 присутствует на аминокислотах тяжелой цепи с 26 по 32, 33 или 34, петля по Chothia CDR-H2 присутствует на аминокислотах тяжелой цепи с 52 по 56, и петля по Chothia CDR-H3 присутствует в аминокислотах тяжелой цепи с 95 по 102, тогда как петля по Chothia CDR-L1 присутствует в аминокислотах легкой цепи с 24 по 34, петля по Chothia CDR-L2 присутствует в аминокислотах легкой цепи с 50 по 56 и петля по Chothia CDR-L3 присутствует на аминокислотах легкой цепи с 89 по 97. Конец петли CDR-H1 по Chothia при нумерации согласно системе нумерации по Kabat варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что в схеме нумерации по Kabat в H35A и H35B размещаются вставки; если ни 35A ни 35B не присутствуют, петля заканчивается в 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается в 33; если присутствуют оба 35A и 35B, петля заканчивается в 34).

[0124] В некоторых аспектах в данном документе предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PILRA человека и содержат CDR VH и VL антитела по Chothia, приведенные в таблицах 3 и 4. В некоторых аспектах антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PILRA человека, содержат одну или более CDR, в которых CDR Chothia и Kabat имеют одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых аспектах в данном документе предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PILRA человека и содержат комбинации CDR Kabat и CDR Chothia.

[0125] В некоторых аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены в соответствии с системой нумерации IMGT, как описано в Lefranc M-P, (1999) The Immunologist 7: 132-136 and Lefranc M-P et al. (1999) Nucleic Acids Res 27: 209-212. Согласно схеме нумерации IMGT, VH-CDR1 находится в положениях с 26 по 35, VH-CDR2 находится в положениях с 51 по 57, VH-CDR3 находится в положениях с 93 по 102, VL-CDR1 находится в положениях с 27 по 32, VL-CDR2 находится в положениях с 50 по 52, а VL-CDR3 находится в положениях с 89 по 97. В некоторых аспектах в данном документе предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PILRA человека и содержат CDR VH и VL IMGT антитела, приведенные в таблицах 3 и 4, например, как описано в Lefranc M-P (1999) выше, а также Lefranc M-P et al., (1999) выше).

[0126] В некоторых аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены согласно MacCallum RM et al. (1996) J Mol Biol 262: 732-745. См. также, например, Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," in Antibody Engineering, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001). В некоторых аспектах в данном документе предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PILRA человека и содержат CDR VH и VL антитела, приведенные в таблицах 3 и 4, как определено методом, описанным в MacCallum RM et al.

[0127] В определенных аспектах CDR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены в соответствии со схемой нумерации AbM, которая относится к гипервариабельным областям по AbM, которые представляют собой компромиссный вариант между CDR по Kabat и структурными петлями по Chothia, и используются в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM

(Oxford Molecular Group, Inc.). В некоторых аспектах в данном документе предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PILRA человека и содержат CDR VH и VL антитела, приведенные в таблицах 3 и 4, как определено по схеме нумерации AbM.

[0128] В некоторых аспектах в данном документе предложены антитела, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь. Что касается тяжелой цепи, в некоторых аспектах тяжелая цепь антитела, описанного в данном документе, может быть тяжелой цепью альфа- (α), дельта- (δ), эпсилон- (ϵ), гамма- (γ) или мю-типа (μ). В некоторых аспектах тяжелая цепь описанного антитела может содержать тяжелую цепь человека альфа- (α), дельта- (δ), эпсилон- (ϵ), гамма- (γ) или мю-типа (μ). В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, содержит тяжелую цепь, где аминокислотная последовательность домена VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в таблице 3, и где константная область тяжелой цепи содержит аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи гамма (γ) человека. В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, содержит тяжелую цепь, где аминокислотная последовательность домена VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в таблице 3, и где константная область тяжелой цепи содержит аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1. В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, содержит тяжелую цепь, где аминокислотная последовательность домена VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в таблице 3, и где константная область тяжелой цепи содержит аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG2 (например, IgG2a или IgG2b). В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, содержит тяжелую цепь, где аминокислотная последовательность домена VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в таблице 3, и где константная область тяжелой цепи содержит аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG4. В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, содержит тяжелую цепь, где аминокислотная последовательность домена VH содержит последовательность, указанную в таблице 3, и где константная область тяжелой цепи содержит аминокислоту тяжелой цепи человека, описанную в настоящем документе или известную в данной области. Неограничивающие примеры последовательностей константной области человека были описаны в данной области, например, см. патент США № 5693780 и Kabat EA et al., (1991) выше.

[0129] Что касается легкой цепи, в некоторых аспектах легкая цепь антитела, описанного в данном документе, представляет собой легкую цепь каппа-типа. В некоторых аспектах легкая цепь антитела, описанного в данном документе, представляет собой легкую цепь ламбда-типа. В некоторых аспектах легкая цепь антитела, описанного в данном документе, представляет собой легкую цепь человека каппа- или ламбда-типа.

[0130] В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, содержит легкую цепь, где аминокислотная последовательность домена VL содержит последовательность, указанную в таблице 4, и где константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области легкой цепи каппа человека. В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, содержит легкую цепь, где аминокислотная последовательность домена VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в таблице 4, и где константная область легкой цепи

содержит аминокислотная последовательность константной области легкой цепи лямбда человека. В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, содержит легкую цепь, где аминокислотная последовательность домена VL содержит последовательность, указанную в таблице 4, и где константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области легкой каппа или лямбда человека. Неограничивающие примеры последовательностей константных областей человека описаны в данной области техники, например, см. патент США № 5693780 и Kabat EA et al, (1991) выше.

[0131] В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, содержит домен VH и домен VL, содержащие аминокислотную последовательность любого из антител к PILRA человека, описанных в данном документе, и где константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY или молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY человека. В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, содержит домен VH и домен VL, содержащие аминокислотные последовательности любого из антител к PILRA человека, описанных в данном документе, и при этом константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b) молекулы иммуноглобулина. В некоторых аспектах константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY человека любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, и IgA2) или любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b) молекулы иммуноглобулина.

[0132] Неограничивающие примеры константных областей человека описаны в данной области, например, см. Kabat EA et al., (1991) выше.

Иллюстративные домены Fc

[0133] В некоторых аспектах антитело к PILRA и, в частности, антитело к PILRA человека, предложенное в данном документе, может содержать домен Fc. В некоторых аспектах домен Fc относится к изотипу человеческого IgG1, IgG2, IgG3 и/или IgG4.

[0134] В определенных аспектах домен Fc имеет изотип IgG1. В некоторых аспектах антитело к PILRA содержит домен Fc IgG1 мыши. В некоторых аспектах антитело к PILRA человека содержит домен Fc IgG1 человека (hIgG1), например, как представлено в SEQ ID NO: 69.

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:69)

[0135] В некоторых аспектах домен Fc IgG1 человека антитела к PILRA человека связывается с активирующим рецептором Fc. В определенных аспектах активирующий Fc-рецептор выбран из любого одного или более из FcγRI, FcγRIIa и IIc и FcγRIIIa и IIIb..

[0136] В некоторых аспектах домен Fc IgG1 человека антитела к PILRA человека не связывается или имеет сниженное связывание с FcγRIII(CD16) и/или C1q. В некоторых аспектах домен Fc IgG1 человека

антитела к PILRA человека обладает сниженной антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ) и/или активностью связывания комплемента, соответственно, что в каждом случае может уменьшать нежелательное уничтожение клеток, например, миелоидных клеток, с которыми связывается антитело к PILRA. Вышеупомянутые эффекты могут быть достигнуты некоторыми модификациями аминокислот, например, мутациями «NSLF», при которых домен Fc IgG1 человека содержит мутации N325S и L328F (по нумерации EU домена Fc IgG1), как показано, например, в SEQ ID NO: 70. В другом аспекте домен Fc IgG1 человека содержит мутацию, соответствующую K322A (нумерация EU), например, как представлено в SEQ ID NO: 71.

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFAPAEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:70)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:71)

[0137] Иллюстративные модификации домена Fc IgG1 человека приведены ниже в Таблице 7.

Таблица 7: Иллюстративные модификаций домена Fc IgG1 человека

Мутация (схема нумерации EU)
N325S и L328F (“NSLF”)
S267E и L328F (“SELF”)
P331S (“PS”)
P331S и E430G (“PSEG”)
K322A
L234A, L235A и P331S (“LALAPS”) (Существенно устраняет связывание Fc с FcR)

[0138] В определенных аспектах представленного в данном документе антитела к PILRA домен Fc имеет изотип IgG2. В некоторых аспектах антитело к PILRA содержит домен Fc мышинного IgG2, например, IgG2a мыши (mIgG2a). В некоторых аспектах антитело к PILRA человека содержит домен Fc IgG2 человека (hIgG2). В некоторых аспектах домен Fc IgG2 человека антитела к PILRA человека связывается с активирующим рецептором Fc. В определенных аспектах активирующий Fc-рецептор выбран из любого одного или более из FcγRI, FcγRIIa и IIc и FcγRIIIa и IIb..

[0139] В определенных аспектах представленного в данном документе антитела к PILRA домен Fc имеет изотип IgG4. В некоторых аспектах антитело к PILRA человека содержит домен Fc IgG4 человека (hIgG4), например, как представлено в SEQ ID NO: 72. В некоторых аспектах область Fc человеческого IgG4 антитела к PILRA человека связывается с активирующим Fc-рецептором. В определенных аспектах активирующий Fc-рецептор выбран из любого одного или более из FcγRI, FcγRIIa и IIc и FcγRIIIa и IIb.. В определенных аспектах область Fc IgG4 человека содержит мутацию, соответствующую S228P (нумерация EU), например, как представлено в SEQ ID NO: 73.

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK

NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:72)

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:73)

[0140] В некоторых аспектах любая из мутаций или модификаций константной области, описанных в данном документе, может быть введена в одну или обе константные области тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, имеющего две константные области тяжелой цепи.

[0141] В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где (i) тяжелая цепь содержит домен VH, содержащий аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VH, и VH CDR3 антитела, приведенные в таблице 1 (например, SEQ ID NO: 4-6, 10-12, 16-18 или 22-24); (ii) легкая цепь содержит домен VL, содержащий аминокислотные последовательности VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 одного и того же антитела, приведенные в таблице 2 (например, SEQ ID NO: 7-9, 13-15, 19-21 или 25-27); (iii) тяжелая цепь дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена тяжелой цепи IgG1 человека; и (iv) легкая цепь дополнительно содержит константный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена легкой цепи каппа человека.

[0142] В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где (i) тяжелая цепь содержит домен VH, содержащий аминокислотную последовательность антитела, приведенные в таблице 3 (например, SEQ ID NO: 28, 30, 32 или 34); (ii) легкая цепь содержит домен VL, содержащий аминокислотную последовательность того же антитела, что и указанная в таблице 4 (например, SEQ ID NO: 29, 31, 33 или 35); (iii) тяжелая цепь дополнительно содержит константный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена тяжелой цепи IgG1 человека; и (iv) легкая цепь дополнительно содержит константный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность константного домена легкой цепи каппа человека.

[0143] В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, содержит каркасные области (например, каркасные области домена VH и/или домена VL), которые представляют собой каркасные области человека или происходят из каркасных областей человека. Неограничивающие примеры каркасных областей человека описаны в данной области, например, см. Kabat EA et al. (1991) выше). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, содержат каркасные области (например, каркасные области домена VH и/или домена VL), которые являются каркасными областями примата (например, примата, отличного от человека) или происходят от примата (например, каркасные области приматов, отличных от человека).

[0144] В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, содержит один, два, три или четыре каркасных участка VH (FR), имеющих аминокислотные последовательности, описанные в данном документе для антитела, представленного в таблице. 5, см. выше (например, SEQ ID NO: 36-39, 44-47, 52-55 или 60-63).

В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, содержит один, два, три или четыре каркасных участка VL (FR), имеющих аминокислотные последовательности, описанные в данном документе для антитела, представленного в таблице. 6, см. выше (например, SEQ ID NO: 40-43, 48-51, 56-59 или 64-67). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифически связываются с PILRA человека, содержат один, два, три или четыре каркасных участка VH, имеющих аминокислотные последовательности, описанные в данном документе для антитела, представленного в Таблице 5 выше, и один, два, три или четыре каркасных участка VL, имеющих аминокислотные последовательности, описанные в данном документе для одного и того же антитела, указанные в таблице 6 выше (например, (i) SEQ ID NO: 36-39, 44-47, 52- 55 или 60-63 и (ii) SEQ ID NOs40-43, 48-51, 56-59 или 64-67).

Активность антител

[0145] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифически связываются с PILRA человека, подавляют PILRA клеточной поверхности. Антитело к PILRA человека, которое подавляет PILRA, будет иметь эффект снижения ингибирующей передачи сигналов, который в противном случае возник бы в результате взаимодействия PILRA на клеточной поверхности с его лигандом.

[0146] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифически связываются с PILRA человека, подавляют PILRA клеточной поверхности (например, PILRA человека, который эктопически экспрессируется на клетках 293) по сравнению с уровнем экспрессии PILRA клеточной поверхности в отсутствие антитела или его фрагмента или в присутствии контрольного антитела или его фрагмента. В некоторых аспектах PILRA клеточной поверхности подавляется по меньшей мере на 10 %, по меньшей мере на 20 %, по меньшей мере на 30 %, по меньшей мере на 40 % или по меньшей мере на 50 % в присутствии антитела к PILRA человека через 30 минут при 37 °C, по сравнению с уровнем PILRA клеточной поверхности в отсутствие антитела или его фрагмента или в присутствии контрольного антитела или фрагмента через 30 минут при 37 °C. В некоторых аспектах PILRA клеточной поверхности подавляется на около 10-50 % в присутствии антитела к PILRA человека через 30 минут при 37 °C, по сравнению с уровнем PILRA клеточной поверхности в отсутствие антитела или его фрагмента или в присутствии контрольного антитела или фрагмента через 30 минут при 37 °C. В некоторых аспектах PILRA клеточной поверхности подавляется по меньшей мере на 30 %, по меньшей мере на 40 %, по меньшей мере на 50 % или по меньшей мере на 60 % в присутствии антитела к PILRA человека через 2 часа при 37 °C, по сравнению с уровнем PILRA клеточной поверхности в отсутствие антитела или его фрагмента или в присутствии контрольного антитела или фрагмента через 2 часа при 37 °C. В некоторых аспектах PILRA клеточной поверхности подавляется на около 30-60% в присутствии антитела к PILRA человека через 2 часа при 37 °C, например, по сравнению с уровнем PILRA клеточной поверхности в отсутствие антитела или его фрагмента или в присутствии контрольного антитела или его фрагмента через 2 часа при 37 °C. Процент подавления может быть рассчитан, например, путем нормализации уровней PILRA на клеточной поверхности, обнаруженных после инкубации в указанные моменты времени на льду, по сравнению с 37 °C, в присутствии или в отсутствие антитела к PILRA человека или в присутствии антитела к PILRA человека или контрольного антитела.

[0147] Подавление можно измерить, например, с помощью анализа, раскрытого в Примере 8. Подавление можно измерить, например, путем инкубации обработанных сиализидой клеток 293, эктопически экспрессирующих PILRA человека, с антителом к PILRA человека или без антитела или с контрольным антителом (например, в течение 30 минут при 37 °C) и определением PILRA клеточной поверхности человека. PILRA клеточной поверхности человека может быть обнаружен, например, с помощью FACS. Подавление может зависеть от дозы антитела к PILRA человека.

[0148] В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, блокирует связывание PILRA-Fc с Т-клетками человека. Предполагается, что антитело к PILRA человека, которое связывается с PILRA-Fc и блокирует связывание PILRA-Fc с Т-клетками, блокирует связывание PILRA-Fc с лигандом PILRA на Т-клетках. Аналогичным образом можно ожидать, что антитело с такой активностью блокирует связывание эндогенного PILRA с лигандом PILRA, тем самым подавляя ингибирующий сигналинг эндогенной PILRA.

[0149] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифически связываются с PILRA человека, блокируют связывание PILRA-Fc с Т-клетками человека по меньшей мере на 70 %, например, по сравнению со связыванием PILRA-Fc с человеческими Т-клетками в отсутствие антитела или его фрагмента или в присутствии контрольного антитела или его фрагмента. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифически связываются с PILRA человека, блокируют связывание PILRA-Fc с Т-клетками человека по меньшей мере на 75 %, например, по сравнению со связыванием PILRA-Fc с человеческими Т-клетками в присутствии контрольного антитела. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифически связываются с PILRA человека, блокируют связывание PILRA-Fc с Т-клетками человека по меньшей мере на 80 %, например, по сравнению со связыванием PILRA-Fc с человеческими Т-клетками в отсутствие антитела или его фрагмента или в присутствии контрольного антитела или его фрагмента. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифически связываются с PILRA человека, блокируют связывание PILRA-Fc с Т-клетками человека по меньшей мере на 85 %, например, по сравнению со связыванием PILRA-Fc с человеческими Т-клетками в отсутствие антитела или его фрагмента или в присутствии контрольного антитела или его фрагмента. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифически связываются с PILRA человека, блокируют связывание PILRA-Fc с Т-клетками человека по меньшей мере на 90 %, например, по сравнению со связыванием PILRA-Fc с человеческими Т-клетками в отсутствие антитела или его фрагмента или в присутствии контрольного антитела или его фрагмента. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифически связываются с PILRA человека, блокируют связывание PILRA-Fc с Т-клетками человека по меньшей мере на 95 %, например, по сравнению со связыванием PILRA-Fc с человеческими Т-клетками в отсутствие антитела или его фрагмента или в присутствии контрольного антитела или его фрагмента. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифически связываются с PILRA человека, блокируют связывание PILRA-Fc с Т-клетками человека на 100 %, например, по сравнению со связыванием PILRA-Fc с человеческими Т-клетками в отсутствие антитела или его фрагмента или в присутствии контрольного антитела или его фрагмента. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифически

связываются с PILRA человека, блокируют связывание PILRA-Fc с Т-клетками человека на около 70-95% или на около 70-98%, например, по сравнению со связыванием PILRA-Fc с Т-клетками человека в присутствии контрольного антитела или его фрагмента. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифически связываются с PILRA человека, блокируют связывание PILRA-Fc с Т-клетками человека на около 80-95 %, например, по сравнению со связыванием PILRA-Fc с человеческими Т-клетками в присутствии контрольного антитела или его фрагмента.

[0150] Блокирование связывания можно измерить, например, с помощью анализа, раскрытого в Примере. 7. Блокирование связывания можно измерить, например, путем инкубации антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента примерно с 5 мкг/мл PILRA Fc в течение 30 минут при 4 °C, затем добавлением Т-клеток человека в течение 30 минут при 4 °C, промыванием клеток и обнаружение связанного PILRA Fc. Связанный PILRA Fc можно обнаружить, например, с помощью проточной цитометрии. Блокирование связывания может зависеть от дозы антитела к PILRA человека.

[0151] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифически связываются с PILRA человека, блокируют связывание PILRA с одним или более лигандами PILRA. Лиганды PILRA включают гликозилированные белки, такие как белки с мотивом PTPXP, PTPXXP, PXTPXP или PXTPXXP. Примеры лигандов включают COLEC12, NPDC1, CLEC4G и PIANP, а также гликопротеин В ВПГ-1. Хорошо известно, что аминокислота Arg126 в PILRA (SEQ ID NO:1) необходима для взаимодействия с сиаловой кислотой (см., например, Rathore *et al.*, *PLOS Genetics* 14: e1007427 (2018)), а аминокислоты Arg78, Trp139 и Glu143, которые отличаются от соответствующих аминокислот в PILRB (см. фиг. 13), расположены в непосредственной близости от Arg126 (около 9,17 Å, около 4,40 Å и около 12,40 Å соответственно) (см. фиг.14А и В). Дополнительные аминокислоты, которые различаются между PILRA человека и PILRB человека, которые находятся в кристаллической структуре, представленной на фиг. 14А и 14В представляют собой T63, A64, D66, K106, Q116, Q118, S133 и S148.

[0152] В некоторых аспектах антитело к PILRA человека, которое блокирует связывание PILRA с одним или более его лигандами, может быть идентифицировано путем тестирования способности антитела блокировать связывание PILRA-Fc с одним или более лигандами PILRA, где такой лиганд экспрессируется в растворимой форме или экспрессируется на клеточной поверхности. В некоторых аспектах антитело к PILRA человека, которое блокирует связывание PILRA с одним или более его лигандами, может быть идентифицировано путем тестирования способности антитела блокировать связывание клеток, экспрессирующих PILRA на клеточной поверхности, с одним или более лигандами PILRA, где такой лиганд экспрессируется в растворимой форме или экспрессируется на клеточной поверхности.

[0153] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытое в данном документе, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, блокируют связывание PILRA-Fc с одним или более лигандами PILRA (включая лиганды, представленные выше, но не ограничиваясь ими), например, по сравнению со связыванием в отсутствие антитела или его фрагмента или в присутствии контрольного антитела или его фрагмента. Блокирование связывания можно измерить, например, с помощью анализа, раскрытого в Примере 5. Блокирование связывания можно измерить, например, путем инкубации клеток, экспрессирующих PILRA (например, в течение примерно 30 минут при температуре примерно 4 °C), с примерно 5 мкг/мл лиганда, с повторной инкубацией (например, в течение примерно 30 минут при температуре примерно 4 °C), промыванием клеток и обнаружением связанного лиганда. Связанный лиганд можно обнаружить, например, с помощью проточной цитометрии. Блокирование связывания может зависеть от дозы антитела к PILRA человека.

[0154] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанное в данном документе, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, активируют миелоидные клетки (например, макрофаги (такие как макрофаги «M1»), микроглию, дендритные клетки, нейтрофилы, гранулоциты и другие миелоидные клетки), производные клетки, такие как супрессорные клетки миелоидного происхождения («MDSC»). Активируя миелоидные клетки, антитело к PILRA человека способно активировать врожденную иммунную систему, например, что может способствовать противоопухолевому ответу и, в случае микроглии, может способствовать созданию среды в ЦНС, противодействующей нейродегенеративным состояниям.

[0155] В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, активирует миелоидные клетки (например, описанные выше) по сравнению с активацией миелоидных клеток в отсутствие антитела или его фрагмента или в присутствии контрольного антитела или его фрагмента. Анализ, описанный в Примере 2 или 3, можно использовать для оценки активации миелоидных клеток (например, MDSC). Активацию миелоидных клеток (например, MDSC) можно оценить, например, путем определения количества MIP1b, продуцируемого клетками в присутствии антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, по сравнению с активацией в отсутствие антитела или его фрагмента или в присутствии контрольного антитела или его фрагмента. Активация миелоидных клеток (например, MDSC) может зависеть от дозы антитела к PILRA человека.

[0156] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые иммуноспецифически связываются с PILRA человека, способствует дифференцировке миелоидных клеток (например, способствует дифференцировке моноцитов в макрофаги (такие как макрофаги «M1») или дендритные клетки, или способствует дифференцировке других миелоидных предшественников в микроглию, дендритные клетки, нейтрофилы и другие клетки миелоидного происхождения, такие как супрессорные клетки миелоидного происхождения («MDSC»)). Способствуя дифференцировке миелоидных клеток, антитело к PILRA человека способно активировать врожденную иммунную систему, например, что может способствовать противоопухолевому ответу (например, через макрофаги M1 в микроокружении опухоли) и, в случае микроглии, может способствовать созданию в ЦНС среды, противодействующей нейродегенеративным состояниям.

[0157] В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека, способствует дифференцировке миелоидных клеток (таких как описанные выше) по сравнению с дифференцировкой миелоидных клеток в отсутствие антитела или фрагмента или в присутствии контрольного антитела или фрагмента. Анализ, описанный в Примере 2, можно использовать для оценки дифференциации миелоидных клеток (например, MDSC). Дифференциацию миелоидных клеток (например, MDSC) можно оценить, например, путем определения количества клеток CD14^{lo}CD86^{hi} в присутствии антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента по сравнению с дифференцировкой в отсутствие антитела или его фрагмента или в присутствии контрольного антитела или его фрагмента. Дифференциация миелоидных клеток (например, MDSC) может зависеть от дозы антитела к PILRA человека.

Антитела, которые связывают один и тот же эпитоп/конкурентно ингибируют

[0158] В другом аспекте в данном документе предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом PILRA человека, что и антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе (например, hPA-002, hPA-005, hPA-004 или hPA-001).

[0159] В другом аспекте в данном документе предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с перекрывающимся эпитопом PILRA человека, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе (например, hPA-002, hPA-005, hPA-004 или hPA-001). Антитела с перекрывающимися эпитопами связываются по меньшей мере с одним или более одинаковыми аминокислотными остатками PILRA.

[0160] Анализы конкурентного связывания можно использовать для определения того, связываются ли два антитела с перекрывающимися эпитопами. Конкурентное связывание можно определить в анализе, в котором тестируемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном, таким как PILRA (например, PILRA человека). Известны многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммунный анализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (ИФА), сэндвич-конкурентный анализ (см. Stahl C et al., (1983) *Methods Enzymol* 9: 242-253); твердофазный прямой биотин-авидиновый ИФА (см. Kirkland TN et al., (1986) *J Immunol* 137: 3614-9); твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (см. Harlow E & Lane D, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); РИА с прямой меткой в твердой фазе с использованием метки I-125 (см. Morel GA et al., (1988) *Mol Immunol* 25(1): 7-15); твердофазный прямой биотин-авидиновый ИФА (Cheung RC et al., (1990) *Virology* 176: 546-52); и RIA с прямым мечением (Moldenhauer G et al., (1990) *Scand J Immunol* 32: 77-82). Как правило, такой анализ включает использование очищенного антигена (например, PILRA, такого как PILRA человека), связанного с твердой поверхностью или клетками, несущими такой антиген, немеченого тестируемого иммуноглобулина и меченого эталонного иммуноглобулина. Конкурентное ингибирование можно измерить путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого иммуноглобулина. Как правило, тестируемый иммуноглобулин присутствует в избытке. Как правило, когда конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или больше. Анализ конкурентного связывания можно проводить в большом количестве различных форматов с использованием либо меченого антигена, либо меченого антитела. В обычной версии этого анализа антиген иммобилизуют на 96-луночном планшете. Способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител с антигеном затем измеряют с использованием радиоактивных или ферментных меток. Для получения дополнительной информации см., например, Wagener C et al., (1983) *J Immunol* 130: 2308-2315; Wagener C et al., (1984) *J Immunol Methods* 68: 269-274; Kuroki M et al., (1990) *Cancer Res* 50: 4872-4879; Kuroki M et al., (1992) *Immunol Invest* 21: 523-538; Kuroki M et al., (1992) *Hybridoma* 11: 391-407 и *Antibodies: A Laboratory Manual*, Ed Harlow E & Lane D editors supra, pp. 386-389.

[0161] В некоторых аспектах анализ конкурентного связывания проводят с использованием поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore®), например, с помощью «тандемного подхода», такого как описанный Abdiche YN et al., (2009) *Analytical Biochem* 386: 172-180, при этом антиген PILRA иммобилизуют на поверхности чипа, например, сенсорного чипа CM5, и затем на чип наносят антитела к PILRA. Чтобы определить, ингибирует ли антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентное связывание антитела к PILRA, описанного в данном документе, антитело к PILRA сначала проводят по поверхности чипа для достижения насыщения, а затем добавляют потенциальное конкурирующее антитело. Затем можно

определить и количественно определить связывание конкурирующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента относительно неконкурирующего контроля.

[0162] В некоторых аспектах конкурентное связывание Fortebio Octet используется для определения того, что антитело к PILRA или его антигенсвязывающий фрагмент конкурентно ингибирует связывание другого антитела к PILRA или его антигенсвязывающего фрагмента с PILRA.

[0163] В другом аспекте в данном документе предложены антитела, которые конкурентно ингибируют (например, дозозависимым образом) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе (например, hPA-002, hPA-005, hPA-004 или hPA-001) от связывания с PILRA человека, как определено с использованием анализов, известных специалисту в данной области или описанных в данном документе (например, конкурентные анализы ELISA, или анализ суспензионной матрицы, или анализ поверхностного плазмонного резонанса). Антитело, которое «конкурентно ингибирует», также может называться антителом, которое «конкурирует за связывание» с эталонным антителом.

[0164] В конкретных аспектах в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурентно ингибируют (например, дозозависимым образом) связывание антитела с PILRA человека, причем антитело содержит домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ. ID NO:28, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:29.

[0165] В конкретных аспектах в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурентно ингибируют (например, дозозависимым образом) связывание антитела с PILRA человека, причем антитело содержит домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ. ID NO:30, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:31.

[0166] В конкретных аспектах в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурентно ингибируют (например, дозозависимым образом) связывание антитела с PILRA человека, причем антитело содержит домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ. ID NO:32, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:33.

[0167] В конкретных аспектах в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурентно ингибируют (например, дозозависимым образом) связывание антитела с PILRA человека, причем антитело содержит домен VH, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ. ID NO:34, и домен VL, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35.

[0168] В некоторых аспектах в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с PILRA человека и не ингибирует конкурентно связывание 2175B с PILRA человека.

Антигенсвязывающие фрагменты

[0169] В некоторых аспектах предложен антигенсвязывающий фрагмент антитела к PILRA, описанного в данном документе, такого как антитело к PILRA человека. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab', F(ab')₂ и scFv, где Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи и последовательность вариабельной области легкой цепи антитела к PILRA человека, как описано в данном документе. Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv могут быть

получены любым способом, известным специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, способы, обсуждаемые в разделе 5.3 ниже. В некоторых аспектах антигенсвязывающий фрагмент, такой как Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv, дополнительно содержит фрагмент, который продлевает период полувыведения антитела *in vivo*. Указанный фрагмент также называют «фрагмент, увеличивающий период полувыведения». Можно использовать *in vivo* любой фрагмент, известный специалистам в данной области для продления периода полувыведения антигенсвязывающего фрагмента, такой как Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv. Например, фрагмент, увеличивающий период полувыведения, может включать Fc-область, полимер, альбумин или связывающий альбумин белок или соединение. Указанный полимер может включать природный или синтетический, необязательно замещенный полиалкилен с линейной или разветвленной цепью, полиалкенилен, полиоксипалкилен, полисахарид, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, поливиниловый спирт, метоксиполиэтиленгликоль, лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные. Заместители могут включать одну или более гидроксильных, метильных или метоксигрупп. В некоторых аспектах антигенсвязывающий фрагмент, такой как Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv, можно модифицировать путем добавления одной или более С-концевых аминокислот для присоединения части, увеличивающей период полувыведения. В некоторых аспектах указанный фрагмент, увеличивающий период полувыведения, представляет собой полиэтиленгликоль или сывороточный альбумин человека. В некоторых аспектах антигенсвязывающий фрагмент, такой как Fab, Fab', F(ab')₂ или scFv, слит с Fc-областью.

[0170] Антитело к PILRA (такое как антитело к PILRA человека) или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть слиты или конъюгированы (например, ковалентно или нековалентно связаны) с обнаруживаемой меткой или веществом. Примеры обнаруживаемых меток или веществ включают ферментные метки, такие как глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как йод (¹²⁵I, ¹²¹I), углерод (¹⁴C), сера (³⁵S), тритий (³H), индий (¹²¹In) и технеций (⁹⁹Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, и биотин. Такие меченые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для обнаружения белка PILRA (например, PILRA человека). См., например, разделы 5.4 и 5.5 ниже.

5.3 Получение антител

[0171] Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые иммуноспецифически связываются с PILRA человека, могут быть получены любым способом, известным в данной области техники для синтеза антител и антигенсвязывающих фрагментов, например, путем химического синтеза или методами рекомбинантной экспрессии. В способах, описанных в данном документе, используются, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантной ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и смежных областей в рамках уровня техники. Эти методики описаны, например, в ссылках, цитируемых в данном документе, и полностью объяснены в литературе. См., например, Sambrook J et al., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates); Eckstein(ed.)(1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B et al., (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[0172] В определенном аспекте в данном документе предложен способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с PILRA человека,

включающий культивирование клетки или клетки-хозяина, описанной в данном документе (например, клетки или клетки-хозяина, содержащей полинуклеотиды, кодирующие антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанное в данном документе). В определенном аспекте в данном документе предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который иммуноспецифически связывается с PILRA человека, включающий экспрессию (например, рекомбинантную экспрессию) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с использованием клетки или клетки-хозяина, описанных в данном документе (например, клетки или клетки-хозяина, содержащей полинуклеотиды, кодирующие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанных в данном документе). В некоторых аспектах клетка представляет собой выделенную клетку. В некоторых аспектах кодирующие полинуклеотиды были введены в клетку. В некоторых аспектах способ дополнительно включает стадию очистки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полученного из клетки или клетки-хозяина.

[0173] Способы получения поликлональных антител известны в данной области техники (см., например, главу 11 в: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al. eds., John Wiley and Sons, New York).

[0174] Моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием широкого спектра методов, известных в данной области, включая использование технологий гибридомы, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея, технологий презентации на основе дрожжей или их комбинации. Например, моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием гибридных методов, в том числе известных в данной области и описанных, например, в Harlow E & Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling GJ et al., в: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981), или как описано в Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495. Примеры способов презентации на основе дрожжей, которые можно использовать для отбора и получения описанных в данном документе антител, включают способы, раскрытые, например, в WO2009/036379A2; WO2010/105256; и WO2012/009568, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0175] В некоторых аспектах моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, продуцируемый клональной клеткой (например, гибридомой или клеткой-хозяином, продуцирующей рекомбинантное антитело или антигенсвязывающий фрагмент), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент иммуноспецифически связывается с PILRA человека, как определено, например, с помощью ELISA или других анализов связывания антигена, известных в данной области или в приведенных в данном документе примерах. В некоторых аспектах моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут представлять собой химерное или гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут представлять собой Fab-фрагмент или F(ab')₂-фрагмент. Моноклональные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут быть получены, например, методом гибридомы, как описано в Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495, или могут быть, например, выделены из фаговых библиотек с использованием, например, способов, описанных в данном документе. Другие способы получения клональных клеточных линий и экспрессируемых ими моноклональных антител и их антигенсвязывающих фрагментов хорошо известны в данной области техники (см., например, главу 11 в: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al., выше).

[0176] Антигенсвязывающие фрагменты описанных в данном документе антител могут быть получены любым методом, известным специалистам в данной области техники. Например, описанные в данном документе фрагменты Fab и F(ab')₂ могут быть получены путем протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина с использованием таких ферментов, как папаин (для получения фрагментов Fab) или пепсин (для получения фрагментов F(ab')₂). Фрагмент Fab соответствует одному из двух идентичных плеч молекулы тетрамерного антитела и содержит полную легкую цепь, спаренную с доменами VH и CH1 тяжелой цепи. Фрагмент F(ab')₂ содержит два антигенсвязывающих плеча тетрамерной молекулы антитела, связанные дисульфидными связями в шарнирной области.

[0177] Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, также могут быть получены с использованием различных методов фагового дисплея и/или презентации на основе дрожжей, известных в данной области техники. В методах фагового дисплея белки экспонируют на поверхности фаговых частиц, которые несут кодирующие их полинуклеотидные последовательности. В частности, последовательности ДНК, кодирующие домены VH и VL, амплифицируют из библиотек кДНК животных (например, библиотек кДНК человека или мышцы пораженных тканей). ДНК, кодирующую домены VH и VL, рекомбинируют вместе с линкером scFv с помощью ПЦР и клонируют в фагмидный вектор. Вектор электропорируют в *E. coli*, и *E. coli* инфицируют хелперным фагом. Фаг, используемый в этих методах, обычно представляет собой нитчатый фаг, включая fd и M13, а домены VH и VL, как правило, рекомбинантно сливаются либо с геном III, либо с геном VIII фага. Фаг, экспрессирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с конкретным антигеном, может быть отобран или идентифицирован с антигеном, например, с использованием меченого антигена или антигена, связанного или захваченного твердой поверхностью или частицей. Примеры методов фагового дисплея, которые можно использовать для получения описанных в данном документе антител или фрагментов, включают способы, описанные в Brinkman U et al., (1995) *J Immunol Methods* 182: 41-50; Ames RS et al., (1995) *J Immunol Methods* 184: 177-186; Kettleborough CA et al., (1994) *Eur J Immunol* 24: 952-958; Persic L et al., (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) *Advan Immunol* 57: 191-280; заявку PCT № PCT/GB91/001134; международные публикации №№ WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401, и WO 97/13844; и патенты США №№ 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743, и 5969108.

[0178] Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть выбрано из любого класса иммуноглобулинов IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

5.3.1 Полинуклеотид

[0179] В некоторых аспектах в данном документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанное в данном документе, или его домен (например, вариабельный участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи), который иммуноспецифически связывается с PILRA человека, и векторы, например, векторы, содержащие такие полинуклеотиды для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, клетках *E. coli* и млекопитающих).

[0180] В конкретных аспектах в данном документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые иммуноспецифически связываются с PILRA человека и содержат аминокислотную последовательность, как

описано в данном документе, а также антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с такими антителами или антигенсвязывающие фрагменты для связывания с PILRA человека (например, дозозависимым образом), или которые связываются с тем же эпитопом, что и у таких антител или антигенсвязывающих фрагментов.

[0181] Также в данном документе предложен полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:28-35. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие полипептид, иммуноспецифически связывается с PILRA человека.

[0182] Также в данном документе предложены наборы, векторы или клетки-хозяева, содержащие (i) первый полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 28, и (ii) второй полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 29. Также в данном документе предложены наборы, векторы или клетки-хозяева, содержащие (i) первый полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 30, и (ii) второй полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 31. Также в данном документе предложены наборы, векторы или клетки-хозяева, содержащие (i) первый полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 32, и (ii) второй полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 33. Также в данном документе предложены наборы, векторы или клетки-хозяева, содержащие (i) первый полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 34, и (ii) второй полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 35. В наборе, содержащем такие первый и второй полинуклеотиды, первый и второй полинуклеотиды могут быть в одном векторе или могут быть в разных векторах. В клетке-хозяине, содержащей такие первый и второй полинуклеотиды, первый и второй полинуклеотиды могут быть в одном векторе или могут быть в разных векторах.

[0183] В некоторых аспектах в данном документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую три CDR домена VH, например, полипептид, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH любого из антител, описанных в данном документе (например, см. Таблицу 1), например, где три CDR домена VH находятся в контексте VH. В некоторых аспектах в данном документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую три CDR домена VL, например, полипептид, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL любого из антител, описанных в данном документе (например, см. Таблицу 2), например, где три CDR домена VL находятся в контексте VL. В некоторых аспектах в данном документе предложены полинуклеотиды (или комбинации полинуклеотидов), содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело к PILRA человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее (i) три CDR домена VH, например, полипептид, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH, и CDR3 VH любого из антител, описанных в данном документе (например, см. Таблицу 1), например, где три CDR домена VH находятся в контексте VH и (ii) три CDR домена VL, например, полипептид, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL любого из антител, описанных в данном документе (например, см. Таблицу 2), например, где три CDR домена VL находятся в контексте VL.

[0184] В некоторых аспектах в данном документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело к PILRA человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фрагмент, содержащий домен VH, например, содержащий FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, содержащий аминокислотную последовательность, описанную в данном документе (например, см. Таблицы 1 и 5, например, VH CDR и VH FR конкретного антитела, идентифицированного по названию в

таблицах). В некоторых аспектах в данном документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело к PILRA человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фрагмент, содержащий домен VL, например, содержащий FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, содержащий аминокислотную последовательность, описанную в данном документе (например, см. Таблицы 2 и 6, например, VL CDR и VL FR конкретного антитела, идентифицированного по названию в таблицах).

[0185] В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи (например, VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, 30, 32 или 34) и константную область тяжелой цепи, например, константную область тяжелой цепи гамма (γ) человека.

[0186] В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи (например, VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, 31, 33 или 35) и константную область легкой цепи, например, константную область легкой цепи лямбда или каппа человека.

[0187] В данном документе также предложены полинуклеотиды, кодирующие антитело к PILRA человека или его антигенсвязывающий фрагмент, описанное в данном документе, или его домен, оптимизированные, например, путем оптимизации кодонов/РНК, замены гетерологичными сигнальными последовательностями и устранения элементов нестабильности мРНК. Способы создания оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих антитело к PILRA человека или его антигенсвязывающий фрагмент или его домен (например, тяжелую цепь, легкую цепь, домен VH или домен VL), для рекомбинантной экспрессии путем внесения изменений в кодоны (например, изменение кодона, кодирующего ту же аминокислоту из-за вырожденности генетического кода) и/или устранение ингибирующих областей в мРНК может быть выполнено путем адаптации методов оптимизации, описанных, например, в патентах США № 5965726; 6174666; 6291664; 6414132; и 6794498, соответственно.

[0188] Полинуклеотид, кодирующий описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или его домен, может быть получен из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с использованием методов, хорошо известных в данной области (например, ПЦР и других методов молекулярного клонирования). Например, ПЦР-амплификацию с использованием синтетических праймеров, способных гибридизоваться с 3'- и 5'-концами известной последовательности, можно проводить с использованием геномной ДНК, полученной из клеток гибридомы, продуцирующих интересующее антитело. Такие способы ПЦР-амплификации можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Такие способы ПЦР-амплификации можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Амплифицированные нуклеиновые кислоты могут быть клонированы в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования, например, для получения химерных и гуманизированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

[0189] Предложенные в данном документе полинуклеотиды могут быть, например, в форме РНК или в форме ДНК. ДНК включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК, причем ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной. Если ДНК одноцепочечная, она может быть кодирующей или не кодирующей (антисмысловой) цепью. В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой кДНК или

ДНК, в которой отсутствует еще один эндогенный интрон. В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой неприродный полинуклеотид. В некоторых аспектах полинуклеотид получают рекомбинантным путем. В некоторых аспектах полинуклеотиды являются выделенными. В некоторых аспектах полинуклеотиды являются по существу чистыми. В некоторых аспектах полинуклеотид очищают от природных компонентов.

5.3.2 Клетки и векторы

[0190] В определенных аспектах в данном документе предложены векторы (например, векторы экспрессии), содержащие полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела к PILRA человека, и их антигенсвязывающие фрагменты или их домены для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, предпочтительно в клетках млекопитающих. Также в данном документе предложены клетки, например клетки-хозяева, содержащие такие векторы для рекомбинантной экспрессии антител к PILRA человека или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе (например, человеческие или гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты). В некоторых аспектах в данном документе предложены способы получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, включающие экспрессию такого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке-хозяине.

[0191] В некоторых аспектах рекомбинантная экспрессия антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или его домена, описанного в данном документе (например, тяжелой или легкой цепи, описанной в данном документе), которая специфически связывается с PILRA человека, включает конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его домен. После получения полинуклеотида, кодирующего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его домен (например, варибельный домен тяжелой или легкой цепи), описанный в данном документе, вектор для продукции антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может быть получен с помощью технологии рекомбинантной ДНК с использованием методов, хорошо известных в данной области. Таким образом, в данном документе описаны способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его домен (например, легкую цепь или тяжелую цепь), кодирующую нуклеотидную последовательность. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, могут быть использованы для конструирования векторов экспрессии, содержащих кодирующие последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или домена (например, легкой или тяжелой цепи) и соответствующие транскрипционные и трансляционные контрольные сигналы. Эти методы включают, например, методы рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза и методы генетической рекомбинации *in vivo*. Также предложены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, тяжелую или легкую цепь, варибельный домен тяжелой или легкой цепи или CDR тяжелой или легкой цепи, функционально связанные с промотором. Такие векторы могут, например, включать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (см., например, международные публикации № WO 86/05807 и WO 89/01036 и патент США № 5122464), и варибельные домены антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть клонированы в такой вектор для экспрессии всей тяжелой цепи, всей легкой цепи или как всей тяжелой, так и легкой цепи.

[0192] Вектор экспрессии может быть перенесен в клетку (например, клетку-хозяин) обычными методами, и полученные клетки могут быть затем культивированы обычными методами для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем документе (*например*, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего указанные шесть CDR, указанный VH, указанный VL, указанный VH и указанный VL, указанный тяжелую цепь, указанный легкую цепь или указанные тяжелую и легкую цепи hPA-002, hPA-005, hPA-004 или hPA-001) или их домен (*например*, указанный VH, указанный VL, указанный VH и указанный VL, указанную тяжелую цепь или указанную легкую цепь hPA-002, hPA-005, hPA-004 или hPA-001). Таким образом, в данном документе предложены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанное в данном документе (*например*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие шесть CDR, VH, VL, VH и VL, тяжелую цепь, легкую цепь или тяжелую и легкую цепи hPA-002, hPA-005, hPA-004 или hPA-001) или их домен (*например*, VH, VL, VH и VL, тяжелую цепь или легкую цепь hPA-002, hPA-005, hPA-004 или hPA-001), функционально связанные с промотором для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. В некоторых аспектах для экспрессии двухцепочечных антител или их антигенсвязывающих фрагментов векторы, кодирующие как тяжелую, так и легкую цепи по отдельности, могут быть коэкспрессированы в клетке-хозяине для экспрессии всего иммуноглобулина, как подробно описано ниже. В некоторых аспектах клетка-хозяин содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий как тяжелую цепь, так и легкую цепь антитела, описанного в данном документе (*например*, тяжелую и легкую цепи hPA-002, hPA-005, hPA-004 или hPA-001), или ее домен (*например*, VH и VL of hPA-002, hPA-005, hPA-004 или hPA-001). В некоторых аспектах клетка-хозяин содержит два разных вектора: первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела, описанного в данном документе (*например*, антитела, содержащего шесть CDR hPA-002, hPA-005, hPA-004 или hPA-001), или их домен. В некоторых аспектах первая клетка-хозяин содержит первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, а вторая клетка-хозяин содержит второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе (*например*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие шесть CDR hPA-002, hPA-005, hPA-004 или hPA-001). В некоторых аспектах переменная область тяжелой цепи/тяжелая цепь, экспрессируемая первой клеткой, связана с переменной областью легкой цепи/легкой цепью второй клетки с образованием человеческого антитела к PILRA или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе (*например*, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего шесть CDR hPA-002, hPA-005, hPA-004 или hPA-001). В некоторых аспектах в данном документе предложена популяция клеток-хозяев, включающая такую первую и такую вторую клетку-хозяин.

[0193] В некоторых аспектах в данном документе предложена популяция векторов, содержащая первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/переменную область легкой цепи антитела к PILRA человека, или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи/тяжелую цепь антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе (*например*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR hPA-002, hPA-005, hPA-004, или hPA-

001). В качестве альтернативы можно использовать один вектор, который кодирует и способен экспрессировать полипептиды как тяжелой, так и легкой цепи.

[0194] Для экспрессии антител и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих CDR hPA-002, hPA-005, hPA-004 или hPA-001) (см., например, патент США № 5807715), можно использовать различные векторные системы экспрессии хозяина. Такие системы экспрессии хозяина представляют собой носители, с помощью которых могут быть получены и впоследствии очищены представляющие интерес кодирующие последовательности, а также представляют собой клетки, которые при трансформации или трансфекции соответствующими нуклеотидными кодирующими последовательностями могут экспрессировать описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент *in situ*. Они включают, но не ограничиваются ими, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные векторами экспрессии рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими последовательности, кодирующие антитело; дрожжи (например, *Saccharomyces Pichia*), трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии дрожжей, содержащими последовательности, кодирующие антитело; системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирусом), содержащими последовательности, кодирующие антитело; клеточные системы растений (например, зеленые водоросли, такие как *Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирус мозаики цветной капусты, CaMV; вирус табачной мозаики, TMV) или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, плазмидой Ti), содержащими кодирующие антитела последовательности; или системы клеток млекопитающих (например, COS (например, COS1 или COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 и клетки BM10), содержащие рекомбинантные экспрессионные конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотioneина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор 7,5 кДа вируса коровьей оспы). В некоторых аспектах клетки для экспрессии антител и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих CDR hPA-002, hPA-005, hPA-004 или hPA-001), представляют собой CHO клетки, например клетки CHO из CHO GS System™ (Lonza). В некоторых аспектах клетки для экспрессии описанных в данном документе антител представляют собой клетки человека, например, линии клеток человека. В некоторых аспектах вектор экспрессии млекопитающих представляет собой pOptiVEC™ или pcDNA3.3. В некоторых аспектах бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих), особенно для экспрессии всей молекулы рекомбинантного антитела, используются для экспрессии молекулы рекомбинантного антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как основной промежуточный элемент раннего промотора гена из цитомегаловируса человека, представляют собой эффективную систему экспрессии антител (Foecking MK & Hofstetter H (1986) Gene 45: 101-105 и Cockett MI et al. (1990) Biotechnology 8: 662-667). В некоторых аспектах антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, продуцируются клетками CHO или клетками NS0.

[0195] Кроме того, можно выбрать штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию вставленных последовательностей или модифицирует и обрабатывает продукт гена желаемым специфическим образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например,

расщепление) белковых продуктов могут быть важными для функционирования белка. С этой целью можно использовать эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным механизмом для правильного процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования продукта гена. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O и T47D, NS0 (линия клеток миеломы мыши, которая не продуцирует эндогенно какие-либо цепи иммуноглобулинов), CRL7O3O, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB / 20, BMT10 и HsS78Bst клетки. В некоторых аспектах антитела к PILRA человека или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR hPA-002, hPA-005, hPA-004 или hPA-001) продуцируются в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO.

[0196] Сразу после получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента методом рекомбинантной экспрессии, его можно очистить любым способом, известным в данной области техники, для очистки молекулы иммуноглобулина, например, хроматографией (например, ионный обмен, аффинность, в частности, по аффинности к специфическому антигену после белка А и колоночная хроматография с распределением по размерам), центрифугированием, дифференциальной растворимостью или любой другой стандартной методикой очистки белков. Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в данном документе или иным образом известными в данной области, для облегчения очистки.

[0197] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, является выделенным или очищенным. Как правило, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело, которое по существу не содержит других антител или их антигенсвязывающих фрагментов с другой антигенной специфичностью, чем выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Например, в некоторых аспектах состав антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанный в настоящем документе, по существу не содержит клеточного материала и/или химических предшественников.

5.4 Фармацевтические композиции

[0198] В данном документе предложены композиции, содержащие антитело к PILRA (такое как антитело к PILRA человека) или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющие желаемую степень чистоты, присутствуют в составе, включающем, например, физиологически приемлемый носитель, эксципиент или стабилизатор (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях. Составы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные, изотонические стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические вещества и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим с кровью предполагаемого реципиента, а также водные и неводные стерильные суспензии, которые могут содержать суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты.

[0199] В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит антитело к PILRA человека или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель (см., например, Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)). Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, в некоторых аспектах предназначены для применения в качестве лекарственного средства. Композиции, используемые для введения *in vivo*, могут быть стерильными. Данное условие легко достижимо проведением фильтрации, например, через мембраны для стерильной фильтрации.

[0200] Описанная в данном документе фармацевтическая композиция может быть использована для оказания биологического эффекта(ов) *in vivo* или *in vitro*. Например, фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может быть использована для активации миелоидных клеток, стимуляции дифференцировки миелоидных клеток, ингибирования связывания PILRA с одним или более его лигандами и/или с клетками, экспрессирующими такие лиганды (например, Т-клетками), и/или подавления PILRA клеточной поверхности.

[0201] Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, можно использовать для лечения заболевания или состояния, такого как заболевание или состояние, которое можно облегчить путем активации миелоидных клеток, стимуляции дифференцировки миелоидных клеток, ингибирования связывания PILRA с одним или более его лигандами и/или с клетками, экспрессирующими такие лиганды (например, Т-клетками), и/или подавления PILRA клеточной поверхности. Фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может быть использована для лечения заболевания или состояния, при котором миелоидные клетки являются дисфункциональными (например, гипоактивными) или недостаточными, например, заболевания или состояния, при котором желательна активация или дифференцировка миелоидных клеток, или при котором желательна активация врожденной иммунной системы.

[0202] В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, предложенная в данном документе, используется для лечения заболеваний или состояний, таких как рак. Примеры видов рака, которые могут быть лечены, включают солидные опухоли, например солидные опухоли, при которых миелоидные клетки (моноциты, макрофаги, дендритные клетки, гранулоциты, нейтрофилы, микроглия (в ЦНС) или другие врожденные иммунные клетки) проникли в микроокружение опухоли. Примеры таких видов рака, которые можно лечить фармацевтическими композициями, предложенными в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, глиобластома, рак головы и шеи, рак почки (например, светлоклеточный рак почки), рак поджелудочной железы и рак молочной железы. Другие виды рака включают, помимо прочего, рак яичников, саркому, колоректальный рак, рак легких, меланому, рак мочевого пузыря, рак печени и рак матки. В некоторых аспектах рак представляет собой рак кроветворной ткани, такой как лейкоз, лимфома или миелома. В некоторых аспектах рак может представлять собой рак на ранней стадии или рак на поздней стадии. В некоторых аспектах рак представляет собой первичную опухоль. В некоторых аспектах рак представляет собой метастатическую опухоль во втором участке, происходящую от любого из вышеуказанных типов рака. В некоторых аспектах рак представляет собой PILRA-положительный рак. В некоторых аспектах рак представляет собой рак с повышенным уровнем PILRA (например, повышенным уровнем мРНК PILRA и/или повышенным уровнем белка PILRA).

[0203] В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, предложенная в данном документе, применяется для лечения нейродегенеративного заболевания. В некоторых аспектах нейродегенеративное заболевание характеризуется дисфункциональными (например, гипоактивными) или дефектными миелиноидными клетками, такими как микроглия. В некоторых аспектах нейродегенеративное заболевание представляет собой иммуноопосредованное нейродегенеративное заболевание. В некоторых аспектах нейродегенеративное заболевание выбрано из болезни Альцгеймера, деменции, лобно-височной деменции (ЛВД), сосудистой деменции, легких когнитивных нарушений, болезни Паркинсона, бокового амиотрофического склероза (БАС), болезни Гентингтона, таупатии, рассеянного склероза, иммуноопосредованной невропатии (например, невропатической боли), болезни Насу-Хакола, лейкоэнцефалопатии с началом в детском возрасте, лейкоэнцефалопатии с началом во взрослом возрасте с аксональными сфероидными и пигментированной глией (ALSP) и возрастной энцефалопатии TDP43 с лимбическим преобладанием (LATE).

[0204] В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, предложенная в данном документе, используется для ингибирования инфекции ВПП-1. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, предложенная в данном документе, используется для ингибирования повторного появления ВПП-1.

5.5 Применения и способы

[0205] В различных аспектах в данном документе предложены способы *in vitro* и *in vivo* применения антител к PILRA человека или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в данном документе, или их фармацевтических композиций, как описано в данном документе. В одном аспекте предложен способ активации миелиноидной клетки, включающий воздействие на клетку антителом к PILRA человека или его антигенсвязывающим фрагментом, или его фармацевтической композицией. В другом аспекте предложен способ стимуляции дифференцировки миелиноидной клетки, включающий воздействие на клетку антителом к PILRA человека или его антигенсвязывающим фрагментом, или его фармацевтической композицией. В другом аспекте предложен способ ингибирования связывания PILRA с одним или более его лигандами, включающий приведение в контакт PILRA с антителом к PILRA человека или его антигенсвязывающим фрагментом, или его фармацевтической композицией в присутствии одного или более его лигандов. Примеры лигандов включают гликозилированные белки, такие как белки с мотивом РТРХР, РТРХХР, РХТРХР или РХТРХХР. Примеры лигандов включают, например, COLEC12, NPDC1, CLEC4G и PIANP, а также гликопротеин В ВПП-1. В определенных аспектах PILRA и/или один или более его лигандов экспрессируются на клетках. В другом аспекте предложен способ подавления PILRA клеточной поверхности, включающий воздействие на клетку, экспрессирующую PILRA на ее поверхности, антителом к PILRA человека или его антигенсвязывающим фрагментом, или его фармацевтической композицией.

5.5.1 Терапевтическое применения и способы

[0206] В некоторых аспектах в данном документе предложены способы повышения активации миелиноидных клеток у нуждающегося в этом субъекта (например, человека), включающие введение субъекту антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе. В некоторых аспектах в данном документе предложены способы стимулирования дифференцировки миелиноидных клеток у нуждающегося в этом субъекта (например, человека), включающие введение субъекту антитела к PILRA человека или его

антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе.

[0207] В некоторых аспектах предложены способы, в которых антитело к PILRA человека или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, или фармацевтическая композиция, как описано в данном документе, вводят субъекту (например, субъекту-человеку), нуждающемуся в этом, для ингибирования взаимодействия PILRA с одним или более его лигандами (например, NPDC1) у субъекта. В некоторых аспектах предложены способы, в которых антитело к PILRA человека или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, или его фармацевтическую композицию, как описано в данном документе, вводят субъекту (например, субъекту-человеку), нуждающемуся в этом, для подавления PILRA клеточной поверхности у субъекта.

[0208] В некоторых аспектах антитело к PILRA человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фармацевтическую композицию вводят для достижения любых двух или более из вышеуказанных эффектов.

[0209] В некоторых аспектах в данном документе предложены способы лечения заболевания или состояния, которые можно облегчить путем активации миелоидных клеток, стимуляции дифференцировки миелоидных клеток, ингибирования связывания PILRA с одним или более его лигандами и/или подавления PILRA клеточной поверхности. Такие способы могут включать введение антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, пациенту (например, пациенту-человеку), нуждающемуся в этом.

[0210] В некоторых аспектах в данном документе предложены способы лечения заболевания или состояния, при котором миелоидные клетки являются дисфункциональными (например, гипоактивными) или недостаточными, например, заболевания или состояния, при котором желательна активация или дифференцировка миелоидных клеток, или при котором желательна активация врожденной иммунной системы. Такие способы могут включать введение антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, пациенту (например, пациенту-человеку), нуждающемуся в этом. Заболевание или состояние, при котором миелоидные клетки являются дисфункциональными, может включать рак или нейродегенеративные заболевания, как дополнительно описано в данном документе.

[0211] В некоторых аспектах в данном документе предложены способы лечения рака. Способ лечения рака может включать введение антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, пациенту (например, пациенту-человеку), нуждающемуся в этом. В некоторых аспектах в данном документе предложены способы лечения рака, где рак представляет собой солидную опухоль. Сплошные опухоли включают те, в которых миелоидные клетки (моноциты, макрофаги, дендритные клетки, гранулоциты, нейтрофилы, микроглия (в ЦНС) или другие врожденные иммунные клетки) проникли в микроокружение опухоли. Примеры таких видов рака, которые можно лечить как предложено в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, глиобластома, рак головы и шеи, рак почки (например, светлоклеточный рак почки), рак поджелудочной железы и рак молочной железы. Другие виды рака включают, помимо прочего, рак яичников, саркому, колоректальный рак, рак легких, меланому, рак мочевого пузыря, рак печени и рак матки.

[0212] В некоторых аспектах рак, подлежащий лечению способами по данному изобретению, включает, без ограничения, рак кроветворной ткани, такой как лейкоз, лимфома или миелома. В некоторых аспектах

рак, подлежащий лечению способами по данному изобретению, может представлять собой рак на ранней стадии или рак на поздней стадии. В некоторых аспектах рак может представлять собой первичную опухоль. В некоторых аспектах злокачественное новообразование может представлять собой метастатическую опухоль во втором месте, происходящую от любого из вышеуказанных типов злокачественного новообразования.

[0213] В некоторых аспектах рак, подлежащий лечению способами по данному изобретению, представляет собой PILRA-положительный рак. В некоторых аспектах рак, подлежащий лечению способами по данному изобретению, представляет собой рак с повышенным уровнем PILRA (например, повышенным уровнем мРНК PILRA и/или повышенным уровнем белка PILRA).

[0214] В некоторых аспектах предложен способ лечения рака, включающий введение антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, или его фармацевтической композиции, и при этом способ дополнительно включает введение антагониста молекула ингибирующей иммунную контрольную точку. В некоторых аспектах молекула ингибиторной контрольной точки представляет собой PD-1 (белок-1 запрограммированной гибели клеток) или его лиганд PD-L1 (лиганд-1 запрограммированной гибели клеток). В некоторых аспектах антагонист PD-1 представляет собой антитело к PD-1. Антитела к PD-1 включают, например, OPDIVO (ниволумаб), KEYTRUDA (пембролизумаб), MEDI-0680 (AMP-514; WO2012/145493), камрелизумаб (SHR-1210), тислелизумаб (BGB-A317) или спартализумаб (NPVPDR001, NVS240118, PDR001). Рекомбинантный белок, состоящий из внеклеточного домена PD-L2 (B7-DC), слитого с Fc-фрагментом IgG1, называемый AMP-224, также можно использовать для антагонизма рецептору PD-1. В некоторых аспектах антагонист PD-L1 представляет собой антитело к PD-L1. Антитела к PD-L1 включают, например, TECENTRIQ (атезолизумаб), дурвалумаб (MEDI4736), BMS-936559 (WO2007/005874), MSB0010718C (WO2013/79174) или gHigM12B7. В некоторых аспектах антитело к PILRA человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или его фармацевтическую композицию вводят в комбинации с лучевой терапией и/или химиотерапевтическим агентом.

[0215] В некоторых аспектах в данном документе предложены способы ингибирования инфекции ВПГ-1 и/или рецидива ВПГ-1. Способ ингибирования инфекции и/или рецидива ВПГ-1 может включать введение антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, пациенту (например, пациенту-человеку), нуждающемуся в этом.

[0216] В некоторых аспектах в данном документе предложены способы лечения нейродегенеративного заболевания. Способ лечения нейродегенеративного заболевания может включать введение антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, или его фармацевтической композиции, как описано в данном документе, пациенту (например, пациенту-человеку), нуждающемуся в этом. В некоторых аспектах нейродегенеративное заболевание характеризуется дисфункциональными (например, гипоактивными) или дефектными миелидными клетками, такими как микроглия. Микроглия — это врожденные иммунные клетки, которые находятся в основном в головном мозге и функционируют как макрофаги, удаляя остатки и мертвые нейроны в процессе фагоцитоза и обеспечивая другие вспомогательные функции для поддержания здоровья мозга. В некоторых аспектах у пациента наблюдаются симптомы нейродегенеративного заболевания, и для лечения нейродегенеративного заболевания вводят антитело к PILRA человека или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, или его фармацевтическую композицию, как описано в данном документе. В некоторых аспектах пациент подвергается риску развития нейродегенеративного заболевания, и антитело к PILRA человека,

антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят для снижения риска, замедления развития или предотвращения нейродегенеративного заболевания.

[0217] В некоторых аспектах нейродегенеративное заболевание представляет собой иммуноопосредованное нейродегенеративное заболевание. В некоторых аспектах нейродегенеративное заболевание выбрано из болезни Альцгеймера, деменции, лобно-височной деменции (ЛВД), сосудистой деменции, легких когнитивных нарушений, болезни Паркинсона, бокового амиотрофического склероза (БАС), болезни Гентингтона, таупатии, рассеянного склероза (РС), иммуноопосредованной невропатии (например, невропатической боли), болезни Насу-Хакола, лейкоэнцефалопатии с началом в детском возрасте, лейкоэнцефалопатии с началом во взрослом возрасте с аксональными сфероидными и пигментированной глией (ALSP) и возрастной энцефалопатии TDP43 с лимбическим преобладанием (LATE).

Болезнь Альцгеймера

[0218] Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой наиболее распространенную форму деменции. Нет никакого лечения от этой болезни, которая по мере прогрессирования усугубляется и в конечном итоге приводит к смерти. Чаще всего БА диагностируется у людей старше 65 лет. Однако менее распространенная болезнь Альцгеймера с ранним началом может возникнуть намного раньше. Общие симптомы болезни Альцгеймера включают поведенческие симптомы, такие как трудности с запоминанием недавних событий; когнитивные симптомы, спутанность сознания, раздражительность и агрессия, перепады настроения, проблемы с языком и потеря долговременной памяти. По мере прогрессирования болезни функции организма утрачиваются, что в конечном итоге приводит к смерти. Болезнь Альцгеймера развивается в течение неизвестного и варьируемого периода времени, прежде чем станет полностью очевидной, и может прогрессировать недиагностированной в течение многих лет.

[0219] В некоторых аспектах введение антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, как предложено в данном документе, или его фармацевтической композиции, как предложено в данном документе, может предотвращать, снижать риск и/или лечить болезнь Альцгеймера. В некоторых аспектах введение антитела к PILRA человека, антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции может модулировать одну или более активностей PILRA у индивидуума, страдающего болезнью Альцгеймера.

Деменция

[0220] Деменция представляет собой неспецифический синдром (то есть набор признаков и симптомов), который проявляется как серьезная потеря общих когнитивных способностей у ранее здорового человека, сверх того, что можно было бы ожидать при физиологическом старении. Деменция может быть статической в результате уникальной обширной травмы головного мозга. С другой стороны, деменция может прогрессировать, что приводит к долгосрочному ухудшению из-за повреждения или болезни организма. Хотя деменция гораздо чаще встречается в гериатрической популяции, она также может возникнуть в возрасте до 65 лет. Когнитивные области, затронутые деменцией, включают, помимо прочего, память, концентрацию внимания, язык и решение проблем. Как правило, симптомы должны присутствовать не менее шести месяцев до того, как у человека будет диагностирована деменция.

[0221] Иллюстративные формы деменции включают, без ограничения, лобно-височную деменцию, болезнь Альцгеймера, сосудистую деменцию, семантическую деменцию и деменцию с тельцами Леви.

[0222] В некоторых аспектах введение антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, как предложено в данном документе, или его фармацевтической композиции, как предложено в данном документе, может предотвращать, снижать риск и/или лечить деменцию. В некоторых аспектах

введение антитела к PILRA человека, антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции может модулировать одну или более активностей PILRA у индивидуума, страдающего деменцией.

Лобно-височная деменция

[0223] Лобно-височная деменция (ЛВД) представляет собой патологическое состояние, возникающее в результате прогрессирующего разрушения лобной доли головного мозга. Со временем дегенерация может перейти на височную долю. Уступая только болезни Альцгеймера (БА) по распространенности, на ЛВД приходится 20% случаев пресенильной деменции. Клинические признаки ЛВД включают дефицит памяти, поведенческие аномалии, изменения личности и нарушения речи (Cruts, M. & Van Broeckhoven, C., Trends Genet. 24:186-194 (2008); Neary, D., et al., Neurology 51:1546-1554 (1998); Ratnavalli, E., Brayne, C., Dawson, K. & Hodges, J. R., Neurology 58:1615-1621 (2002)).

[0224] Значительная часть случаев ЛВД наследуется по аутосомно-доминантному типу, но даже в одной семье симптомы могут охватывать спектр от ЛВД с поведенческими нарушениями до первичной прогрессирующей афазии и кортикобазальной ганглионарной дегенерации. ЛВД, как и большинство нейродегенеративных заболеваний, может характеризоваться патологическим присутствием определенных белковых агрегатов в пораженном мозге. Исторически в первых описаниях ЛВД отмечали присутствие внутринейрональных скоплений гиперфосфорилированного Тау-белка в нейрофибрилярных клубках или тельцах Пика. Причинная роль ассоциированного с микротрубочками Тау-белка была подтверждена идентификацией мутаций в гене, кодирующем Тау-белок, в нескольких семьях (Hutton, M., et al., Nature 393:702-705 (1998)). Однако в большинстве образцов головного мозга с ЛВД не наблюдается накопления гиперфосфорилированного белка тау, но проявляется иммунореактивность к убиквитину (Ub) и ДНК-связывающему белку TAR (TDP43) (Neumann, M., et al., Arch. Neurol. 64:1388-1394 (2007)). Было показано, что в большинстве случаев ЛВД с включениями убиквитина (ЛВД-У) есть мутации в гене програнулина.

[0225] В некоторых аспектах введение антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, как предложено в данном документе, или его фармацевтической композиции, как предложено в данном документе, по данному изобретению, может предотвращать, снижать риск и/или лечить ЛВД. В некоторых аспектах введение антитела к PILRA человека, антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции может модулировать одну или более активностей PILRA у индивидуума, страдающего ЛВД.

Болезнь Паркинсона

[0226] Болезнь Паркинсона, которую можно назвать идиопатическим или первичным паркинсонизмом, ригидно-гипокинетическим синдромом (HRS) или дрожательным параличом, представляет собой нейродегенеративное заболевание головного мозга, которое влияет на двигательную систему. Прогрессирующая гибель клеток мозга, продуцирующих дофамин, приводит к основным симптомам болезни Паркинсона. Чаще всего болезнь Паркинсона диагностируется у людей старше 50 лет. Болезнь Паркинсона является идиопатической (без известной причины) у большинства людей. Однако генетические факторы также играют роль в заболевании.

[0227] Симптомы болезни Паркинсона включают, помимо прочего, тремор кистей, рук, ног, челюсти и лица, ригидность мышц конечностей и туловища, замедленность движений (брадикинезию), постуральную неустойчивость, затруднения при ходьбе, психоневрологические проблемы, изменения в речи или поведении, депрессию, тревожность, боль, психоз, деменцию, галлюцинации и проблемы со сном.

[0228] В некоторых аспектах введение антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, как предложено в данном документе, или его фармацевтической композиции, как предложено в

данном документе, может предотвращать, снижать риск и/или лечить болезнь Паркинсона. В некоторых аспектах введение антитела к PILRA человека, антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции может модулировать одну или более активностей PILRA у индивидуума, страдающего болезнью Паркинсона.

Боковой амиотрофический склероз (БАС)

[0229] В контексте данного документа термины «боковой амиотрофический склероз (БАС)» или «заболевание двигательных нейронов», или «болезнь Лу Герига» используются взаимозаменяемо и относятся к изнурительному заболеванию различной этиологии, характеризующемуся быстро прогрессирующей слабостью, мышечной атрофией и фасцикуляциями, мышечной спастичностью, затруднением речи (дизартрией), затрудненным глотанием (дисфагией) и затрудненным дыханием (одышкой).

[0230] В некоторых аспектах введение антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, как предложено в данном документе, или его фармацевтической композиции, как предложено в данном документе, может предотвращать, снижать риск и/или лечить БАС. В некоторых аспектах введение антитела к PILRA человека, антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции может модулировать одну или более активностей PILRA у индивидуума, страдающего боковым амиотрофическим склерозом.

Болезнь Хантингтона

[0231] Болезнь Хантингтона (БХ) представляет собой наследственное нейродегенеративное заболевание, вызываемое аутосомно-доминантной мутацией в гене хантингтина (HTT). Экспансия триплетного повтора цитоксин-аденин-гуанин (CAG) в гене хантингтина приводит к продукции мутантной формы белка хантингтина (Htt), кодируемой этим геном. Этот мутантный белок хантингтин (mHtt) токсичен и способствует гибели нейронов. Симптомы болезни Хантингтона чаще всего проявляются в возрасте от 35 до 44 лет, хотя могут появиться в любом возрасте.

[0232] Симптомы болезни Хантингтона включают, помимо прочего, проблемы моторного контроля, прерывистые, случайные движения (хорею), аномальные движения глаз, нарушение равновесия, судороги, затрудненное жевание, затрудненное глотание, когнитивные проблемы, измененную речь, дефицит памяти, трудности мышления, бессонницу, утомляемость, слабоумие, изменения личности, депрессию, тревожность и компульсивное поведение.

[0233] В некоторых аспектах введение антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, как предложено в данном документе, или его фармацевтической композиции, как предложено в данном документе, может предотвращать, снижать риск и/или лечить болезнь Хантингтона (БХ). В некоторых аспектах введение антитела к PILRA человека, антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции может модулировать одну или более активностей PILRA у индивидуума, страдающего болезнью Хантингтона.

Таупатические заболевания

[0234] Таупатии представляют собой класс нейродегенеративных заболеваний, вызванных агрегацией Тау-белка, связанного с микротрубочками, в головном мозге. Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее известной таупатией и включает накопление Тау-белка в нейронах в форме нерастворимых нейрофибриллярных клубков (НФК). К другим таупатическим заболеваниям и расстройствам относятся прогрессирующий надъядерный паралич, путилистическая деменция (хромовая травматическая энцефалопатия), лобно-височная деменция и паркинсонизм, связанный с хромосомой 17, болезнь Литико-Бодига (комплекс болезни Паркинсона и деменции Гуама), деменция с преобладанием клубочков,

ганглиоглиома и ганглиоцитомы, менингиоангиоматоз, подострый склерозирующий панэнцефалит, свинцовая энцефалопатия, туберозный склероз, болезнь Халлервордена-Шпатца, липофусциноз, болезнь Пика, кортикобазальная дегенерация, заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен (AGD), болезнь Хантингтона и лобно-височная долевая дегенерация.

[0235] В некоторых аспектах введение антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, как предложено в данном документе, или его фармацевтической композиции, как предложено в данном документе, может предотвращать, снижать риск и/или лечить таупатию. В некоторых аспектах введение антитела к PILRA человека, антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции может модулировать одну или более активностей PILRA у индивидуума, страдающего таупатией.

Рассеянный склероз

[0236] Рассеянный склероз (РС) также называют диссеминированным склерозом или диссеминированным энцефаломиелитом. РС представляет собой воспалительное заболевание, при котором жировые миелиновые оболочки вокруг аксонов головного и спинного мозга повреждаются, что приводит к демиелинизации и рубцеванию, а также к широкому спектру признаков и симптомов. РС влияет на способность нервных клеток головного и спинного мозга эффективно взаимодействовать друг с другом. Нервные клетки общаются, посылая электрические сигналы, называемые потенциалами действия, по длинным волокнам, называемым аксонами, которые содержатся в изолирующем веществе, называемом миелином. При РС собственная иммунная система организма атакует и повреждает миелин. Когда аксоны утрачивают миелин, они больше не могут эффективно проводить сигналы. Начало РС обычно возникает у молодых людей и чаще встречается у женщин.

[0237] Симптомы рассеянного склероза включают, без ограничения, изменения в чувствительности, такие как потеря чувствительности или пощипывание; покалывание или онемение, такое как гипестезия и парестезия; мышечная слабость; клоническая судорога; мышечные спазмы; затруднение в движении; трудности с координацией и равновесием, например, атаксия; проблемы с речью, например, дизартрия, или проблемы с глотанием, например, дисфагия; проблемы со зрением, такие как нистагм, неврит зрительного нерва, включая фосфены, и двоение в глазах; усталость; острая или хроническая боль; и проблемы с мочевым пузырем и кишечником; когнитивные нарушения разной степени; эмоциональные симптомы депрессии или нестабильного настроения; феномен Утхоффа, который представляет собой обострение существующих симптомов из-за воздействия более высоких, чем обычно, температур окружающей среды; и симптом Лермитта, который представляет собой ощущение прохождения электрического тока, которое проходит по спине при сгибании шеи.

[0238] В некоторых аспектах введение антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, как предложено в данном документе, или его фармацевтической композиции, как предложено в данном документе, может предотвращать, снижать риск и/или лечить РС. В некоторых аспектах введение антитела к PILRA человека, антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции может модулировать одну или более активностей PILRA у индивидуума, страдающего РС.

Введение и дозирование

[0239] Антитело к PILRA человека или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в данном документе, или его фармацевтическую композицию, предложенную в данном документе, можно вводить любым подходящим способом, включая парентеральное, внутривенное, интраназальное, интратрахеальное, интраспинальное введение, интрасиновиальное введение, интратекальное, пероральное, местное или ингаляционное пути введения.

Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное введение в виде болюса или непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, внутриартериальное, внутрисуставное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых аспектах введение представляет собой внутривенное введение. В некоторых аспектах введение осуществляется подкожно.

[0240] Соответствующая дозировка и режим дозирования антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в данном документе, или его фармацевтической композиции, предложенной в данном документе, при применении отдельно или в комбинации с одним или более другими дополнительными терапевтическими агентами будут зависеть от заболевания, подлежащего лечению, тяжести и течения заболевания, способа введения и других факторов.

[0241] В некоторых аспектах в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическая композиция, предложенная в данном документе для применения в качестве лекарственного средства.

[0242] В некоторых аспектах в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическая композиция, предложенные в данном документе, для применения в способе лечения рака. В некоторых аспектах в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическая композиция, предложенные в данном документе, для применения в способе лечения рака у субъекта, включающем введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции, предложенных в данном документе.

[0243] В некоторых аспектах в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическая композиция, предложенные в данном документе, для применения в способе лечения нейродегенеративного заболевания. В некоторых аспектах в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическая композиция, предложенные в данном документе, для применения в способе лечения нейродегенеративного заболевания у субъекта, включающем введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции, предложенных в данном документе.

5.5.2 Обнаружение и диагностическое применение

[0244] Антитело к PILRA человека или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе (см., например, раздел 5.2), можно использовать для анализа уровней белка PILRA (например, белка PILRA человека) в биологическом образце с использованием классических методов, известных специалистам в данной области техники, включая иммунологические анализы, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммунопреципитацию или вестерн-блоттинг. Подходящие метки для анализа антител известны в данной области и включают ферментные метки, такие как глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как йод (^{125}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{121}In) и технеций (^{99}Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, и биотин. Такие метки можно использовать для мечения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе. Альтернативно, второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые распознают антитело к PILRA человека или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут быть помечены и использованы в комбинации с антителом к PILRA человека или его антигенсвязывающим фрагментом для обнаружения белка PILRA (например, человеческого белка PILRA).

[0245] Анализ уровня экспрессии белка PILRA (например, белка PILRA человека) включает качественное или количественное измерение или оценку уровня белка PILRA (например, белка PILRA

человека) в первом биологическом образце либо непосредственно (например, путем определения или оценка абсолютного уровня белка) или относительно (например, путем сравнения с уровнем белка, ассоциированного с заболеванием, во втором биологическом образце). Уровень экспрессии белка PILRA (например, белка PILRA человека) в первом биологическом образце можно измерить или оценить и сравнить с уровнем стандартного белка PILRA (например, белка PILRA человека), при этом стандарт берут из второго биологического образца, полученного от индивида не страдающего расстройством или определяемые усреднением уровней из популяции лиц, не страдающих расстройством. Как будет понятно специалистам в данной области, как только станет известен уровень «стандартного» белка PILRA (например, человеческого белка PILRA), его можно многократно использовать в качестве стандарта для сравнения.

[0246] Используемый в данном документе термин «биологический образец» относится к любому биологическому образцу, полученному от субъекта, клеточной линии, ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующих белок PILRA (например, белок PILRA человека). Способы получения биоптатов тканей и биологических жидкостей животных (например, людей) хорошо известны в данной области техники.

[0247] Антитело к PILRA человека, описанное в данном документе, можно использовать для прогностических, диагностических, мониторинговых и скрининговых применений, включая применения *in vitro* и *in vivo*, хорошо известные и стандартные для специалистов в данной области и основанные на настоящем описании. Прогностические, диагностические, мониторинговые и скрининговые анализы и наборы для оценки *in vitro* и оценки состояния иммунной системы и/или иммунного ответа могут использоваться для прогнозирования, диагностики и мониторинга для оценки образцов пациентов, включая тех, у которых известно или есть подозрение на наличие дисфункции иммунной системы, рака или нейродегенеративного заболевания, такого как болезнь Альцгеймера.

[0248] Антитела к PILRA человека и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут нести обнаруживаемую или функциональную метку. Когда используются флуоресцентные метки, для идентификации и количественного определения членов специфического связывания можно использовать доступную в настоящее время микроскопию и анализ с помощью флуоресцентно-активированного клеточного сортера (FACS) или комбинацию обоих методов, процедур, известных в данной области. Антитела к PILRA человека или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут нести флуоресцентную метку. Примеры флуоресцентных меток включают, например, реактивные и конъюгированные зонды, например, аминокумарин, флуоресцеин и техасский красный, красители Alexa Fluor, красители Cy и красители DyLight. Антитело к PILRA человека может нести радиоактивную метку, такую как изотопы ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac и ^{186}Re . Когда используются радиоактивные метки, доступные в настоящее время процедуры подсчета, известные в данной области, могут быть использованы для идентификации и количественной оценки специфического связывания антитела к PILRA человека или его антигенсвязывающего фрагмента с белком PILRA (например, белком PILRA человека). В случае, когда метка представляет собой фермент, обнаружение может быть выполнено с помощью любого из используемых в настоящее время колориметрических, спектрофотометрических, флуороспектрофотометрических, амперометрических или газометрических методов, известных в данной области. Этого можно достичь путем приведения в контакт образца или контрольного образца с антителом к PILRA человека или его антигенсвязывающим фрагментом в условиях, которые обеспечивают образование комплекса между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и белком PILRA (например, белок

PILRA человека). Любые комплексы, образованные между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и белком PILRA (например, человеческим белком PILRA), обнаруживают и сравнивают в образце и контроле. В свете специфического связывания антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, с PILRA человека, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для специфического обнаружения экспрессии белка PILRA (например, белка PILRA человека) на поверхности клеток. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, также можно использовать для очистки белка PILRA (например, белка PILRA человека) посредством иммуоаффинной очистки.

[0249] Также в данный документ включена система анализа, которая может быть приготовлена в виде набора для анализа для количественного анализа степени присутствия белка PILRA (например, белка PILRA человека). Система или тест-набор могут содержать меченый компонент, например, меченое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и один или более дополнительных иммунохимических реагентов. См., например, раздел 5.6 ниже для получения дополнительной информации о наборах.

[0250] В некоторых аспектах в данном документе предложены способы обнаружения *in vitro* белка PILRA (например, человеческого белка PILRA) в образце, включающие приведение указанного образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых аспектах в данном документе предложено применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в данном документе, для обнаружения *in vitro* белка PILRA (например, человеческого белка PILRA) в образце. В некоторых аспектах в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или композиция, предложенная в данном документе, для применения при обнаружении белка PILRA (например, белка PILRA человека) у субъекта или в образце, полученном от субъекта. В некоторых аспектах в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в данном документе для применения в качестве диагностического средства. В некоторых аспектах антитело содержит обнаруживаемую метку.

5.6 Наборы

[0251] В данном документе предложены наборы, содержащие одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе. В некоторых аспектах в данном документе предложена фармацевтическая упаковка или набор, содержащий один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами фармацевтических композиций, описанных в данном документе, такими как одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в данном документе. С таким контейнером(ами) необязательно может быть связано уведомление в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических или биологических продуктов, причем уведомление отражает одобрение агентства по производству, использованию или продаже для введения человеку.

[0252] Также в данном документе предложены наборы, которые можно использовать в способах обнаружения. В некоторых аспектах набор содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, предпочтительно очищенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в одном или более контейнерах. В некоторых аспектах наборы, описанные в данном документе, содержат по существу выделенный белок PILRA (например, человеческий белок PILRA), который можно использовать в качестве контроля. В некоторых аспектах наборы, описанные в данном документе,

дополнительно содержат контрольное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые не реагируют с белком PILRA (например, белком PILRA человека). В некоторых аспектах наборы, описанные в данном документе, содержат один или более элементов для обнаружения связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с белком PILRA (например, человеческим белком PILRA) (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы с обнаруживаемым субстратом, таким как флуоресцентное соединение, ферментативный субстрат, радиоактивное соединение или люминесцентное соединение, или вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые распознают первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, могут быть конъюгированы с обнаруживаемым субстратом). В некоторых аспектах предложенный в данном документе набор может включать рекомбинантно полученный или химически синтезированный белок PILRA (например, человеческий белок PILRA). Белок PILRA (например, белок PILRA человека), содержащийся в наборе, также можно прикрепить к твердой подложке. В некоторых аспектах средство детектирования из описанного выше набора включает твердую подложку, к которой присоединен белок PILRA (например, белок PILRA человека). Такой набор может также включать неприкрепленное меченое репортером анти-человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антимышиное/крысиное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент. В этом аспекте связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с белком PILRA (например, белком PILRA человека) можно обнаружить путем связывания указанного антитела, меченого репортером, или его антигенсвязывающего фрагмента.

6. ПРИМЕРЫ

[0253] Примеры в этом разделе (т. е. разделе 6) предложены в качестве иллюстрации, но не в качестве ограничения.

Пример 1. Антитела к PILRA ингибируют связывание PILRA с Т-клетками

[0254] Для проверки способности PILRA человека связываться с Т-клетками использовали растворимую конструкцию Fc hIgG1 PILRA человека («PILRA Fc»). Аминокислотная последовательность PILRA Fc представлена в SEQ ID NO:74.

QPSGSTGSGPSYLYGVTPQKHLASMGGSVEIPFSFYYPWELATAPDVRISWRRGHFHGQSFYSTRPPSIHK
DYVNRLFLNWTEGQKSGFLRISNLQKQDQSVYFCRVELDTRSSGRQQWQSIEGTKLSITQGQQRTKATTPA
REPFQNTTEEPYENIRNEGQNTDPKLNPKLHLTQSTSQPPSPQEPPERDPVLCCLKGLTNGQPSQDADDDDKP
KSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:74)

[0255] PILRA Fc или hIgG1 изотипического контроля инкубировали с первичными CD4⁺ Т-клетками или клетками Jurkat в течение 30 минут при 4 °C. Клетки дважды промывали, а затем определяли связанный PILRA Fc или IgG1 изотипического контроля с помощью Alexa 647-антитела к человеческому IgG1. Клетки собирали на BD FACS Canto и рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции. Как показано на фиг. 1A, связывание PILRA Fc было обнаружено на CD4⁺ Т-клетках и клетках Jurkat.

[0256] Тестировали способность антител к PILRA ингибировать связывание PILRA Fc с Т-клетками. Предполагается, что антитело к PILRA, которое связывается с PILRA-Fc и блокирует связывание PILRA-Fc с

Т-клетками, блокирует связывание PILRA-Fc с лигандом PILRA на Т-клетках. Аналогичным образом можно ожидать, что антитело с такой активностью блокирует связывание эндогенного PILRA с его лигандом на Т-клетках, тем самым подавляя ингибирующий сигналинг эндогенной PILRA.

[0257] Чтобы проверить способность антител к PILRA ингибировать связывание PILRA Fc с Т-клетками, PILRA Fc сначала инкубировали с 10 мкг/мл антител к PILRA, IgG1 изотипического контроля или только буфером FACS в течение 30 минут при 4 °С. . Добавляли Т-клетки CD4⁺ от 2 здоровых доноров и дополнительно инкубировали в течение дополнительных 30 минут. После двукратной промывки PILRA Fc, связанный с CD4⁺ Т-клетками, обнаруживали с помощью Alexa 647-антител к IgG человека. Степень связывания PILRA Fc в присутствии антител к PILRA или изотипического контроля рассчитывали относительно степени связывания PILRA Fc только в присутствии буфера FACS. Антитело 2175B к PILRA человека (R&D Systems) частично ингибировало связывание PILRA Fc (фиг. 1B). Напротив, антитело 2175D к PILRA человека (R&D Systems) не влияло на связывание, а овечье поликлональное антитело к PILRA человека (R&D Systems) увеличивало связывание (фиг. 1B). В заключение, связывание PILRA Fc с Т-клетками может быть ингибировано или усилено в зависимости от используемого антитела к PILRA человека.

Пример 2: PILRA регулирует дифференцировку и активацию клеток-супрессоров миелоидного происхождения

[0258] Чтобы определить роль PILRA в активации и дифференцировке миелоидных клеток, супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) были получены из моноцитов 3 здоровых доноров путем культивирования со 100 нг/мл GM-CSF и 100 нг/мл IL-6 в течение 5 дней. Затем клетки собирали и обрабатывали носителем или возрастающими дозами изотипического контроля mIgG1 или конструкцией человеческого PILRA Fc (mIgG1) («PILRA mFc»). Аминокислотная последовательность конструкции PILRA mFc представлена в SEQ ID NO:75.

QPSGSTGSGPSYLYGVTPQKHLASMGGSVEIPFSFYYPWELATAPDVRI SWRRGHFHGQSFYSTRPPSIHK
DYVNRLFLNWTEGQKSGFLRISNLQKQDQSVYFCRVELDTRSSGRQQWQSIEGTKLSITQAVTTTTTQRPS
MTTTWRLSSTTTTTGLRVTQGKRRSDSWHISLETAGGSGVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLIT
LTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNS
AAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPI
MDTDGSYFIYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO:75)

[0259] PILRA mFc действует как растворимый антагонист, связывая лиганды PILRA, экспрессируемые на этих клетках, и предотвращая их взаимодействие с эндогенным рецептором PILRA на клеточной поверхности. Через 3 дня лечения клетки собирали и активацию MDSC исследовали путем окрашивания на CD14 и CD86. CD14 представляет собой миелоидный маркер, который подавляется при дифференцировке незрелых миелоидных клеток в более зрелые миелоидные клетки. CD86 является маркером активации миелоидных клеток, мощным активатором адаптивного иммунного ответа и прототипичным геном M1.

[0260] На фигуре 2A представлены репрезентативные графики FACS, показывающие экспрессию CD14 и CD86 в MDSC, обработанных носителем, mIgG1 или PILRA mFc. Обработка PILRA mFc увеличивала процент CD14^{lo}CD86^{hi} (активированных) миелоидных клеток, указывая на то, что блокирование ингибирующей передачи сигналов PILRA усиливало дифференцировку этих клеток до более зрелого и

активированного фенотипа. Таким образом, можно ожидать, что блокирующее антитело к PILRA будет иметь сопоставимый эффект в стимулировании активации и дифференцировки миелоидных клеток.

[0261] На фигуре 2В показан процент активированных миелоидных клеток после обработки MDSC от 3 доноров (955, 956 и 957) изотипическим контролем mIgG1 или mFc PILRA по отношению к клеткам, обработанным носителем. PILRA mFc увеличивает количество активированных миелоидных клеток, что измеряется процентным содержанием CD14^{lo}CD86^{hi} (активированных) миелоидных клеток в образцах MDSC от всех 3 доноров.

Пример 3: PILRA Fc индуцирует продукцию MDSC MIP1b

[0262] Чтобы дополнительно изучить роль PILRA в активации миелоидных клеток, миелоидные супрессорные клетки (MDSC) были получены от 2 доноров путем культивирования моноцитов, полученных из крови, со 100 нг/мл GM-CSF и 100 нг/мл IL-6 в течение 5 дней. Затем клетки собирали и обрабатывали носителем или увеличивающимися дозами изотипического контроля hIgG1 или PILRA Fc (как в примере 1). PILRA Fc действует как растворимый антагонист, связывая лиганды PILRA, экспрессируемые на этих клетках, и предотвращая их взаимодействие с эндогенным PILRA на клеточной поверхности. Через 3 дня обработки кондиционированные среды собирали и анализировали на наличие MIP1b (CCL4). MIP1b является хемоаттрактантом, который способствует рекрутингу миелоидных клеток и лимфоцитов. По сравнению с hIgG1 изотипического контроля, антагонизм PILRA с использованием PILRA Fc индуцировал продукцию MIP1b, что согласуется с повышенной активацией миелоидных клеток (фиг. 3).

Пример 4. Антитела к PILRA мыши не связывают PILRA человека

[0263] Антитела к PILRA мыши получали следующим образом. Мышей C57BL/7 PILRA^{-/-} PILRB1^{-/-} PILRB2^{-/-} иммунизировали мышинным белком PILRA (mPILRA) и получали гибридомы стандартными способами. 135 образцов кондиционированных сред, содержащих антитела, оценивали с помощью FACS на связывание с родительскими клетками 293F или клетками 293, эктопически экспрессирующими PILRA человека (hPILRA), PILRB человека (hPILRB), PILRA яванского макака (cPILRA), mPILRA или PILRB мыши (mPILRB1). Вкратце, кондиционированную среду, содержащую антитела, инкубировали с клетками 293 в течение 30 минут при 4 °C, дважды промывали и затем определяли с помощью Alexa 647 к IgG мыши. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на FACS Canto II, и для всех клеточных линий значения MFI по отношению к 293 родительским клеткам рассчитывали для каждой кондиционированной среды. Результаты представлены в таблице 8. 15 антител были идентифицированы как связывающие mPILRA с использованием порога отсечки, равного более чем 5-кратному связыванию. Из этих связывающих агентов 10 антител также продемонстрировали связывание с клетками, экспрессирующими мышинный PILRB (mPILRB) (> 5 кратное), и 1 антитело связывалось с клетками, экспрессирующими PILRA (cPILRA) яванского макака (> 5 кратное). Ни одно из этих 15 связывающих агентов mPILRA не связывалось с клетками, экспрессирующими hPILRA или hPILRB.

Таблица 8: Связывание антимышиных антител с PILRA и PILRB

Клон	293 родительский MF1r	293 hPILRA MF1r	293 hPILRB MF1r	293 cPILRA MF1r	293 mPILRA MF1r	293 mPILRB MF1r
mPA-001	1,0	1,1	1,1	2,4	116,4	7,2
mPA-002	1,0	1,1	1,2	2,4	111,4	8,0
mPA-003	1,0	1,1	1,2	2,3	127,1	6,6
mPA-004	1,0	1,1	1,2	2,0	95,9	3,4
mPA-005	1,0	1,1	1,2	2,1	102,7	5,4
mPA-006	1,0	1,1	1,2	1,8	92,9	2,2
mPA-007	1,0	1,1	1,2	237,3	87,5	3,3
mPA-008	1,0	1,1	1,2	2,0	107,2	2,2
mPA-009	1,0	1,1	1,2	2,1	153,5	4,2
mPA-010	1,0	1,1	1,2	2,0	93,6	7,1
mPA-011	1,0	1,1	1,2	2,0	71,2	8,7
mPA-012	1,0	1,1	1,2	2,2	86,9	9,5
mPA-013	1,0	1,1	1,2	1,9	70,0	6,2
mPA-014	1,0	1,1	1,2	2,2	126,9	9,8
mPA-015	1,0	1,1	1,2	1,9	93,3	6,6

Пример 5. Антитела против PILRA мыши могут увеличивать или уменьшать связывание NPDC1 с PILRA-экспрессирующими клетками

[0264] 135 образцов кондиционированных сред, содержащих антитела, как описано в примере 4 выше, оценивали на модулирование связывания белка 1 дифференцировки и контроля пролиферации нейронов (NPDC1) Fc клетками 293, эктопически экспрессирующими мышиную PILRA. Вкратце, образцы кондиционированной среды, содержащие антитела, инкубировали с клетками 293, экспрессирующими мышиную PILRA, в течение 30 минут при 4 °C, а затем к этой смеси добавляли 5 мкг/мл NPDC1 hIgG1 Fc («NPDC Fc»). После 30-минутной инкубации при 4 °C клетки промывали и определяли связанный с клеткой NPDC1 hIgG1 Fc с помощью Alexa 647-антитела к IgG человека. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на FACS Canto II, и для всех клеточных линий рассчитывали процент связывания NPDC1 Fc в присутствии кондиционированных сред относительно связывания только NPDC1 Fc. Результаты показаны на фиг. 4. Было идентифицировано 10 блокирующих антител к PILRA мыши, которые разрушили NPDC-1 (mPA-001-mPA-009). Было идентифицировано 5 антител к PILRA мыши, которые увеличивали связывание NPDC1 Fc (mPA-011-mPA-015).

Пример 6: Получение антител к PILRA человека

[0265] Антитела к PILRA человека получали следующим образом. Мышей C57BL/7 PILRA^{-/-} PILRB1^{-/-} PILRB2^{-/-} иммунизировали человеческим белком PILRA и получали гибридомы стандартными методами. 300 образцов кондиционированных сред, содержащих антитела, оценивали с помощью FACS на связывание с родительскими клетками 293 или клетками 293, эктопически экспрессирующими hPILRA, hPILRB, cPILRA,

mPILRA или mPILRB. Вкратце, кондиционированную среду, содержащую антитела, инкубировали с клетками 293 в течение 30 минут при 4 °C, дважды промывали и затем определяли с помощью Alexa 647 к IgG мыши. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на FACS Canto II, и для всех клеточных линий значения MFI по отношению к 293 родительским клеткам рассчитывали для каждой кондиционированной среды. Результаты представлены в таблице 9. Шесть антител были идентифицированы как связывающие PILRA человека с использованием порога отсечки, равного более чем 5-кратному связыванию. Из этих связывающих агентов одно антитело также продемонстрировало связывание с 293 клетками, экспрессирующими PILRB человека и PILRA яванского макака. Не было идентифицировано антител, связывающих PILRA мыши.

Таблица 9: Связывание античеловеческих антител с PILRA и PILRB

ID	293 родительский	293 PILRA человека	293 PILRB человека	293 PILRA яванского макака	293 PILRA мыши	293 PILRB мыши
hPA-001	1,0	131,4	1,3	0,5	0,5	0,5
hPA-002	1,0	133,1	1,2	0,3	0,3	0,3
hPA-003	1,0	104,7	1,3	0,5	0,4	0,5
hPA-004	1,0	83,9	1,3	0,6	0,6	0,6
hPA-005	1,0	103,9	1,3	0,5	0,4	0,5
hPA-006	1,0	152,5	4,5	3,3	0,4	0,4

Пример 7: Антитела к PILRA человека ингибируют связывание PILRA с Т-клетками

[0266] Оценивали способность 300 образцов кондиционированных сред, содержащих антитела, как описано в примере 6 выше, ингибировать связывание PILRA Fc с CD3+ Т-клетками человека. Вкратце, образцы кондиционированной среды, содержащие антитела, инкубировали с 1,25 мкг/мл PILRA Fc в течение 30 мин при 4 °C, а затем добавляли к Т-клеткам человека. После 30-минутной инкубации при 4 °C клетки промывали и определяли связанный PILRA Fc с помощью Alexa 647-антитела к IgG человека. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на FACS Canto II, и для всех клеточных линий рассчитывали количество связывания PILRA Fc (MFI) и процент связывания PILRA Fc в присутствии кондиционированных сред по отношению к связыванию только PILRA Fc. Было идентифицировано шесть блокирующих антител к PILRA человека (фиг. 5).

Пример 8: Антитела к PILRA человека подавляют PILRA клеточной поверхности

[0267] Антитела к PILRA человека тестировали на способность подавлять PILRA клеточной поверхности. Очищенные антитела (10 мкг/мл) из гибридомной кампании, описанной выше в примере 6, инкубировали с обработанными синалидазой клетками 293, эктопически экспрессирующими вариант G78 PILRA человека, в течение 30 минут или 2 часов на льду или при 37 °C. Затем поверхностный PILRA обнаруживали с помощью флуоресцентно-меченого овечьего анти-человеческого антитела к PILRA (1 мкг/мл,

R&D Systems) и анализировали с помощью проточной цитометрии на FACS Canto II. Процент подавления PILRA человека рассчитывали путем нормализации уровней поверхностной PILRA, обнаруженных после инкубации в течение указанных временных точек на льду, по сравнению с 37 °C. Результаты, показанные на Фигуре 6, демонстрируют, что антитела к PILRA человека могут подавлять PILRA клеточной поверхности человека.

Пример 9: Экспрессия PILRA в опухолях

[0268] Чтобы сравнить экспрессию PILRA в опухолях по сравнению со здоровой тканью, данные RNAseq из образцов рака из TCGA и нормальных образцов из GTEX были проанализированы на экспрессию PILRA. Результаты показаны на фиг. 7, где каждая точка представляет отдельный образец. Эти результаты показывают, что глиобластома, рак головы и шеи, рак почки и рак поджелудочной железы (левая сторона каждого столбца, показаны точки и незакрашенные прямоугольники) имеют повышенную экспрессию PILRA по сравнению с соответствующими здоровыми тканями (правая сторона каждого столбца, показаны точки и закрашенные прямоугольники). Не ограничиваясь какой-либо теорией, повышенная экспрессия объясняется, по меньшей мере, инфильтрацией PILRA-экспрессирующих миелоидных клеток.

Пример 10: Блокирование передачи сигналов PILRA снижает рост опухоли в сочетании с антителом к PD-L1

[0269] Влияние блокирования передачи сигнала PILRA на рост опухоли исследовали с использованием PILRA-Fc в комбинации с антителом к PD-L1. mPILRA mIgG1 Fc может связываться с лигандами PILRA и предотвращать передачу сигналов с помощью PILRA на клеточной поверхности, таким образом, действуя как антагонист пути PILRA. В этих анализах мышам C57BL/6 подкожно инокулировали клетки карциномы толстой кишки MC38. Мышам вводили антитело изотипического контроля (13 мг/кг), анти-PD-L1 (3 мг/кг) или комбинацию mPILRA mIgG1 Fc (10 мг/кг) и анти-PD-L1 антитела (3 мг/кг) два раза в неделю в течение 3 недель.

[0270] На фиг. 8 показаны полученные объемы опухоли (левый график) и выживаемость (правый график). Тенденция к снижению роста опухоли наблюдалась на 17-й и 20-й день в группе мышей, получавших mPILRA mIgG1 Fc в сочетании с антителом к PD-L1, по сравнению с группой мышей, получавших только антитело к PD-L1. Кроме того, в группе мышей, получавших mPILRA mIgG1 Fc в комбинации с антителом к PD-L1, наблюдалась тенденция к увеличению выживаемости по сравнению с группой мышей, получавших только антитело к PD-L1. Эти данные демонстрируют, что блокирование передачи сигналов PILRA может уменьшить рост опухоли и увеличить выживаемость в сочетании с антителом к PD-L1.

Пример 11: hPA-002 представляет собой сильнодействующий блокатор лигандов.

[0271] Очищенные антитела к hPILRA оценивали на их способность блокировать связывание PILRA Fc с человеческими CD3+ Т-клетками от 3 отдельных доноров, чтобы рассчитать эффективность блокирования лиганда этими антителами. Были рассчитаны значения IC50 (среднее + стандартная ошибка) для каждого антитела, и они показаны в таблице 10.

Таблица 10: Значения IC50 антител для блокирующего связывания лиганда

Антитело	IC50 ± SEM (нМ)
2175B	1,7 ± 0,47

hPA-002	$0,75 \pm 0,08$
hPA-005	$1,9 \pm 0,2$
hPA-004	$1,7 \pm 0,6$

[0272] Антитело hPA-002 более эффективно блокирует связывание PILRA Fc, чем антитело 2175B. hPA-005 и hPA-004 обладают такой же эффективностью, как 2175B.

Пример 12: hPA-002, hPA-005 и hPA-004, но не 2175B, конкурентно связывают PILRA

[0273] Чтобы проверить, конкурентно ли связываются hPA-002, hPA-005, hPA-004 и/или 2175B с PILRA, 293FS hPILRA-экспрессирующие клетки инкубировали с немеченым 2175B, hPA-002, hPA-005 или hPA-004 в течение 30 минут на льду. Затем добавляли конъюгированный с Alexa 647 hPA-002 в концентрации 5 мкг/мл и дополнительно инкубировали в течение 30 минут. После промывки количество связанного hPA-002, конъюгированного с A647, оценивали с помощью проточной цитометрии. Результаты, показанные на Фигуре 9, демонстрируют, что немеченые hPA-002, hPA-005 и hPA-004 блокируют связывание hPA-002 A647, тогда как 2175B не блокирует связывание hPA-002 A647. Эти данные демонстрируют, что hPA-005 и hPA-004 конкурентно ингибируют связывание hPA-002 с hPILRA, но 2175B не ингибирует конкурентно связывание hPA-002 с hPILRA.

Пример 13: hPA-002, hPA-005 и hPA-004 усиливают активацию миелоидных клеток Fc-рецепторами

[0274] Влияние антител к PILRA на активацию, опосредованную рецептором Fc, оценивали с использованием миелоидной клеточной линии U937 и производных, как описано в этом примере. Были созданы родительские клетки U937, клетки U937, экспрессирующие контрольный (скремблированный) вектор (контрольные клетки U937), и клетки U937, эктопически экспрессирующие PILRA человека (клетки PILRA OE). На клетках проводили анализ FACS для определения относительных уровней экспрессии PILRA. Анализ FACS показал, что клетки PILRA OE экспрессируют высокие уровни PILRA, примерно в 17 раз выше, чем родительские клетки U937 или контрольные клетки U937, тогда как родительские клетки U937 и контрольные клетки U937 экспрессируют минимальное количество PILRA. (См. также фиг. 10A.)

[0275] Чтобы определить влияние hPA-002, hPA-005 и hPA-004 на активацию миелоидных клеток Fc-рецепторами, 96-луночные планшеты покрывали в течение ночи 30 мкг/мл мышиного IgG2a (mIgG2a) в PBS, затем промывали PBS. Исходные клетки U937, контрольные клетки U937 и клетки PILRA OE добавляли в лунки, покрытые mIgG2a, или в необработанные лунки. В лунки добавляли растворимый IgG (отрицательный контроль), hPA-002, hPA-005 и hPA-004 в концентрации 10 мкг/мл. Через 48 часов кондиционированную среду оценивали на продукцию хемокинов (MCP-1, фиг. 10B; RANTES, фиг. 10C).

[0276] Родительские клетки U937, контрольные клетки U937 и клетки PILRA OE в лунках, покрытых mIgG2a, показали повышенную продукцию MCP-1 и RANTES по сравнению с клетками в необработанных лунках (сравнение черных столбцов с белыми столбцами на фиг. 10B и фиг. 10C) mIgG2a, который ведет себя аналогично hIgG1, связывается с клетками и активирует их через Fc-рецепторы. Клетки PILRA OE в лунках, покрытых mIgG2a, показали меньшее увеличение продукции MCP-1 и RANTES по сравнению с родительскими клетками U937 и контрольными клетками U937 в лунках, покрытых mIgG2a, что указывает на то, что сверхэкспрессия PILRA ингибирует Fc-опосредованную активацию миелоидных клеток (фиг. 10B и фиг. 10C). Фиг. 10B и фиг. 10C также демонстрируют, что антитела к PILRA (hPA-002, hPA-005 и hPA-004)

увеличивали продукцию MCP-1 и RANTES в клетках PILRA OE с активацией рецептора Fc (в лунках, покрытых mIgG2a), по сравнению с клетками PILRA OE с активацией рецептором Fc в присутствии контрольного IgG или только среды. Антитела к PILRA (hPA-002, hPA-005 и hPA-004) также увеличивали продукцию MCP-1 и RANTES в клетках PILRA OE с активацией Fc-рецептором (в лунках, покрытых mIgG2a) по сравнению с клетками PILRA OE без активации Fc-рецептором (в лунках, не обработанных mIgG2a). Антитела к PILRA не проявляли последовательного действия на родительские клетки U937 или контрольные клетки U937, с обработкой mIgG2a или без нее. Таким образом, эти данные демонстрируют, что сверхэкспрессия PILRA ингибирует опосредованную рецептором Fc активацию миелоидных клеток, а блокирующие антитела к PILRA, такие как hPA-002, hPA-005 и hPA-004, могут усиливать опосредованную рецептором Fc активацию миелоидных клеток.

Пример 14: Эффект доза-эффект антител к PILRA на продукцию MCP-1

[0277] Чтобы изучить влияние зависимости от дозы различных концентраций антител к PILRA на продукцию MCP-1 в клетках U937 PILRA OE, 96-луночные планшеты покрывали в течение ночи 30 мкг/мл mIgG2a в PBS, затем промывали PBS. Клетки U937 PILRA OE добавляли в лунки, покрытые mIgG2a, и в лунки добавляли растворимые антитела IgG (отрицательный контроль), hPA-002, hPA-005, hPA-004 и 2175B в различных концентрациях (фиг. 11). Через 48 часов кондиционированную среду оценивали на продукцию MCP-1.

[0278] На фиг. 11 показано, что антитела к PILRA hPA-002, hPA-005 и hPA-004 дозозависимо увеличивают продукцию MCP-1, но антитело 2175B к PILRA ингибирует продукцию MCP-1. Эти данные позволяют предположить, что hPA-002, hPA-005 и hPA-004 являются антагонистами PILRA, тогда как 2175B является агонистом PILRA. Различная функциональная активность согласуется с данными примера 12 (фиг. 9), которые показывают, что hPA-002, hPA-005 и hPA-004, но не 2175B, демонстрируют конкурентное связывание, предполагая, что hPA-002, hPA-005 и hPA-004 связываются с другой областью PILRA, чем 2175B.

Пример 15: hPA-002, hPA-005 и hPA-004 усиливают активацию рецептора Fc в первичных моноцитах человека

[0279] Чтобы определить влияние антител к PILRA (hPA-002, hPA-005 и hPA-004) на опосредованную рецептором Fc активацию в первичных моноцитах человека, 96-луночные планшеты покрывали в течение ночи 30 мкг/мл mIgG2a в PBS, а затем промывали PBS. Первичные моноциты человека от двух разных доноров добавляли в лунки, покрытые mIgG2a, или в необработанные лунки. В лунки добавляли растворимый IgG (отрицательный контроль), антитела hPA-002, hPA-005 и hPA-004 в концентрации 10 мкг/мл. Через 48 часов кондиционированную среду оценивали на продукцию MCP-1 (фиг. 12).

[0280] На фиг. 12 первичные моноциты человека в лунках, покрытых mIgG2a, показали повышенную продукцию MCP-1 по сравнению с первичными моноцитами человека в необработанных лунках, что указывает на то, что связанный с планшетом mIgG2a активировал первичные моноциты человека через Fc-рецепторы. Антитела к PILRA hPA-002, hPA-005 и hPA-004 увеличивали продукцию MCP-1 в первичных моноцитах человека с активацией, опосредованной рецептором Fc, при этом hPA-002 проявлял самый сильный эффект. Эти данные демонстрируют, что антитела к PILRA могут усиливать опосредованную рецептором Fc активацию в первичных моноцитах человека.

[0281] Объем изобретения не ограничивается описанными в данном документе конкретными аспектами. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к описанным станут очевидными для специалистов в данной области техники из приведенного выше описания и сопроводительных фигур. Предполагается, что такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

[0282] Все ссылки (например, публикации, патенты или патентные заявки), процитированные в настоящем документе, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная ссылка (например, публикация, патент или патентная заявка) была специально и индивидуально указана для включения посредством ссылки в полном объеме и для всех целей.

[0283] Другие варианты осуществления находятся в пределах следующих пунктов формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PILRA человека, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание PILRA с одним или более его лигандами и подавляет PILRA клеточной поверхности.
2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание остатка Arg126 PILRA человека (SEQ ID NO: 1) с одним или более лигандами PILRA.
3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пп. 1 или 2, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание PILRA-Fc с Т-клетками человека по меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 75 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или по меньшей мере на 98 %.
4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент подавляет PILRA клеточной поверхности по меньшей мере на 10 %, по меньшей мере на 20 %, по меньшей мере на 30 %, по меньшей мере на 40 % или по меньшей мере на 50 % через 30 минут при 37 °C.
5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PILRA человека и содержит последовательности определяющей комплементарность области (CDR) 1 варибельной области тяжелой цепи (VH), CDR2 VH, CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области легкой цепи (VL):
 - (a) SEQ ID NO: 4-9, соответственно;
 - (b) SEQ ID NO: 10-15, соответственно;
 - (c) SEQ ID NO: 16-21, соответственно; или
 - (d) SEQ ID NO: 22-27, соответственно.
6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с PILRA человека, при этом эталонное антитело содержит варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности:
 - (a) SEQ ID NO: 28 и 29, соответственно;
 - (b) SEQ ID NO: 30 и 31, соответственно;
 - (c) SEQ ID NO: 32 и 33, соответственно; или
 - (d) SEQ ID NO: 34 и 35, соответственно.
7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с тем же эпитопом PILRA человека, что и антитело, содержащее варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности:
 - (a) SEQ ID NO: 28 и 29, соответственно;

- (b) SEQ ID NO: 30 и 31, соответственно;
 - (c) SEQ ID NO: 32 и 33, соответственно; или
 - (d) SEQ ID NO: 34 и 35, соответственно.
8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PILRA человека, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела, выбранного из группы, состоящей из hPA-002, hPA-005, hPA-004 или hPA-001.
9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, в котором CDR представляют собой CDR, определенные по Kabat, CDR, определенные по Chothia, CDR, определенные по IMGT, или CDR, определенные по AbM.
10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–9, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, 30, 32 или 34.
11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–10, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, 31, 33 или 35.
12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–11, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности:
- (e) SEQ ID NO: 28 и 29, соответственно;
 - (f) SEQ ID NO: 30 и 31, соответственно;
 - (g) SEQ ID NO: 32 и 33, соответственно; или
 - (h) SEQ ID NO: 34 и 35, соответственно.
13. Гуманизованная форма антитела по п. 12.
14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PILRA человека, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, 30, 32 или 34.
15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PILRA человека, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, 31, 33 или 35.
16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 5–15, причем антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание PILRA с одним или более его лигандами и подавляет PILRA клеточной поверхности.

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 16, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание остатка Arg126 PILRA человека (SEQ ID NO: 1) с одним или более его лигандами.
18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пп. 16 или 17, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание PILRA-Fc с Т-клетками человека по меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 75 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 % или по меньшей мере на 98 %.
19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 5-18, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент подавляет PILRA клеточной поверхности по меньшей мере на 10 %, по меньшей мере на 20 %, по меньшей мере на 30 %, по меньшей мере на 40 % или по меньшей мере на 50 % через 30 минут при 37 °C.
20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4 и 16-19, причем подавление является дозозависимым.
21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4 и 16-20, причем блокирование является дозозависимым.
22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-21, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент активирует миелоидные клетки.
23. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-22, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способствует дифференцировке миелоидных клеток.
24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-23, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент увеличивает продукцию MIP1b миелоидными клетками.
25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-24, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание PILRA с NPDC1.
26. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 22-25, причем активация миелоидных клеток, стимулирование дифференцировки миелоидных клеток, увеличение продукции MIP1b и/или блокирование связывания лиганда являются дозозависимыми.
27. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-26, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с PILRA яванского макака.

28. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-27, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не связывается с PILRB человека.
29. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-28, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в аминокислотах 20-197 SEQ ID NO: 1.
30. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-29, причем антитело 2175B конкурентно не ингибирует связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с PILRA человека.
31. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-30, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи.
32. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 31, причем константная область тяжелой цепи представляет собой изотип, выбранный из группы, состоящей из изотипов человека IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄.
33. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 32, которое содержит домен Fc, сконструированный для снижения эффекторной функции.
34. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-33, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, при этом константная область тяжелой цепи представляет собой константную область тяжелой цепи IgG₁ человека, и при этом константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи IgG_κ человека.
35. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-34, причем антитело или его антигенсвязывающий представляет собой моноклональное антитело.
36. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-35, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой мышиное, химерное, гуманизированное или человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
37. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-36, которое представляет собой полноразмерное антитело.
38. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-36, которое представляет собой антигенсвязывающий фрагмент.
39. Антигенсвязывающий фрагмент по п. 38, причем антигенсвязывающий фрагмент представляет собой

Fab, Fab', F(ab')₂, одноцепочечный Fv (scFv), дисульфидносвязанный Fv, домен V-NAR, IgNar, интратело, IgGΔCH2, минитело, F(ab')₃, тетратело, триатело, диатело, однодоменное антитело, DVD-Ig, Fcab, mAb², (scFv)₂ или scFv-Fc.

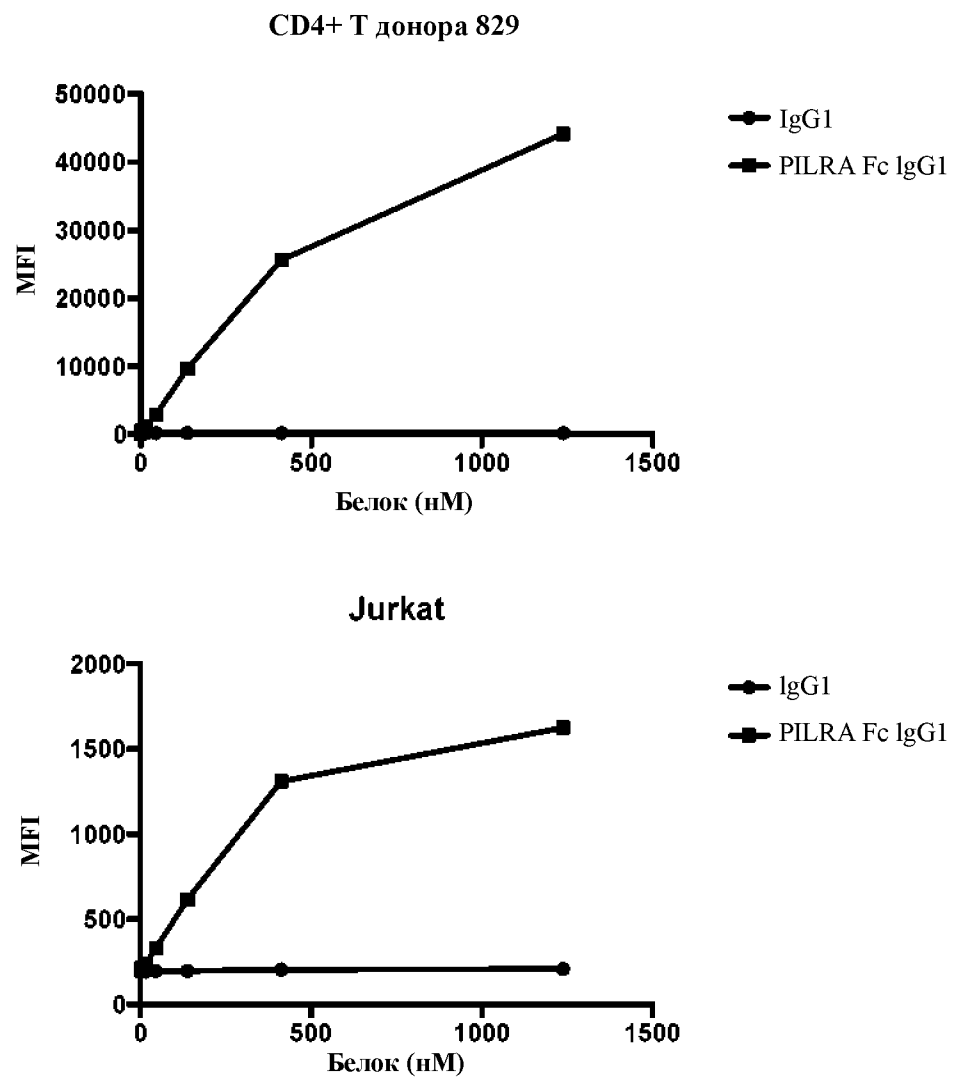
40. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-39, дополнительно содержащее обнаруживаемую метку.
41. Выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-40.
42. Выделенный полинуклеотид по п. 41, в котором молекула нуклеиновой кислоты кодирует VH SEQ ID NO:28, 30, 32 или 34.
43. Выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи или легкую цепь антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-40.
44. Выделенный полинуклеотид по п. 43, в котором молекула нуклеиновой кислоты кодирует VL SEQ ID NO:29, 31, 33 или 35.
45. Выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-35, и переменную область легкой цепи или легкую цепь антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-40.
46. Выделенный вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 41-45.
47. Клетка-хозяин, содержащая (а) полинуклеотид по любому из пп. 41-45, (b) вектор по п. 46 или (с) первый вектор, содержащий полинуклеотид по пп. 41 или 42, и второй вектор, содержащий полинуклеотид по пп. 43 или 44.
48. Клетка-хозяин по п. 47, которая выбрана из группы, состоящей из *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, дрожжей, CHO, YB/20, NS0, PER-C6, HEK-293T, NIH-3T3, HeLa, BHK, Hep G2, SP2/0, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, клеток BMT10, растительных клеток, клеток насекомых и клеток человека в культуре тканей.
49. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с PILRA человека, включающий культивирование клетки-хозяина по пп. 47 или 48, в результате чего происходит экспрессия молекулы нуклеиновой кислоты и получение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, необязательно, при этом способ дополнительно включает выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из культуры.

50. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PILRA человека и кодируется полинуклеотидом по любому из пп. 41-45 или получено способом по п. 49.
51. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-40 и 50 и фармацевтически приемлемый эксципиент.
52. Способ подавления PILRA клеточной поверхности, включающий приведение клетки, экспрессирующей PILRA на своей поверхности, в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-40 и 50 или фармацевтической композицией по п. 51.
53. Способ ингибирования связывания PILRA с лигандом PILRA, включающий приведение PILRA в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-40 и 50 или фармацевтической композицией по п. 51 в присутствии лиганда PILRA, необязательно при этом PILRA и/или лиганд PILRA экспрессируется на клетке.
54. Способ по п. 53, в котором лиганд PILRA представляет собой NPDC1 и/или лиганд PILRA экспрессируется на Т-клетке.
55. Способ усиления активации миелоидных клеток, включающий приведение миелоидных клеток в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-40 и 50 или фармацевтической композицией по п. 51.
56. Способ стимулирования дифференцировки миелоидных клеток, включающий приведение миелоидных клеток в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-40 и 50 или фармацевтической композицией по п. 51.
57. Способ увеличения продукции MIP1b миелоидными клетками, включающий приведение миелоидных клеток в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-40 и 50 или фармацевтической композицией по п. 51.
58. Способ по любому из пп. 52-57, в котором приведение в контакт проводят *in vitro*.
59. Способ по любому из пп. 52-57, в котором приведение в контакт происходит у субъекта.
60. Способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-40 и 50 или фармацевтической композиции по п. 51.
61. Способ по п. 60, причем рак представляет собой солидную опухоль, в которой миелоидные клетки инфильтрировали микроокружение опухоли.

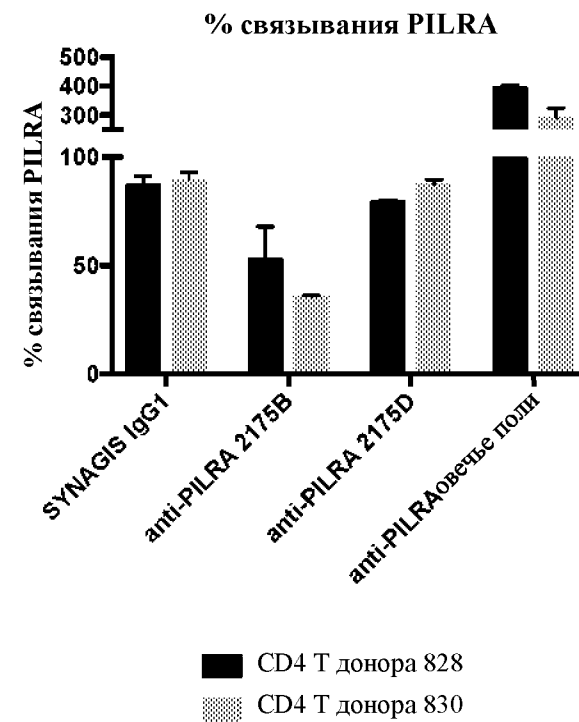
62. Способ по пп. 60 или 61, причем рак выбран из глиобластомы, рака головы и шеи, рака почки (необязательно, при этом рак почки представляет собой светлоклеточный рак почки), рака поджелудочной железы и рака молочной железы.
63. Способ по любому из пп. 60-62, дополнительно включающий введение антагониста ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки, необязательно при этом молекула иммунной контрольной точки представляет собой PD-1 или PD-L1.
64. Способ по п. 63, в котором антагонист представляет собой антагонист PD-1, который представляет собой антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом необязательно антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба, MEDI-0680 (AMP-514), камрелизумаба (SHR-1210), тислелизумаба (BGB-A317) и спартализумаба (NPVPDR001, NVS240118, PDR001).
65. Способ по п. 63, в котором антагонист представляет собой антагонист PD-L1, который представляет собой антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом необязательно антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из атезолизумаба, дурвалумаба (MEDI4736), BMS-936559, MSB0010718C и rHigM12B7.
66. Способ по любому из пп. 63-65, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PILRA человека, и антагонист ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки вводят одновременно.
67. Способ по любому из пп. 63-65, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с PILRA человека, и антагонист ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки вводят последовательно.
68. Способ лечения заболевания или состояния, при котором миелоидные клетки являются дисфункциональными или недостаточными у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-40 и 50 или фармацевтической композиции по п. 51.
69. Способ по п. 68, причем заболевание или состояние представляет собой нейродегенеративное заболевание.
70. Способ по п. 69, причем нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, необязательно при этом пациент является носителем варианта G78 PILRA.
71. Способ активации врожденной иммунной системы у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-40 и 50 или фармацевтической композиции по п. 51.

- 72. Способ обнаружения PILRA в образце, включающий приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-40 и 50 или фармацевтической композицией по п. 51.
- 73. Способ по п. 72, в котором образец получают от субъекта-человека, необязательно, при этом образец представляет собой образец рака.
- 74. Способ по п. 55, в котором активация миелоидных клеток опосредована рецептором Fc.

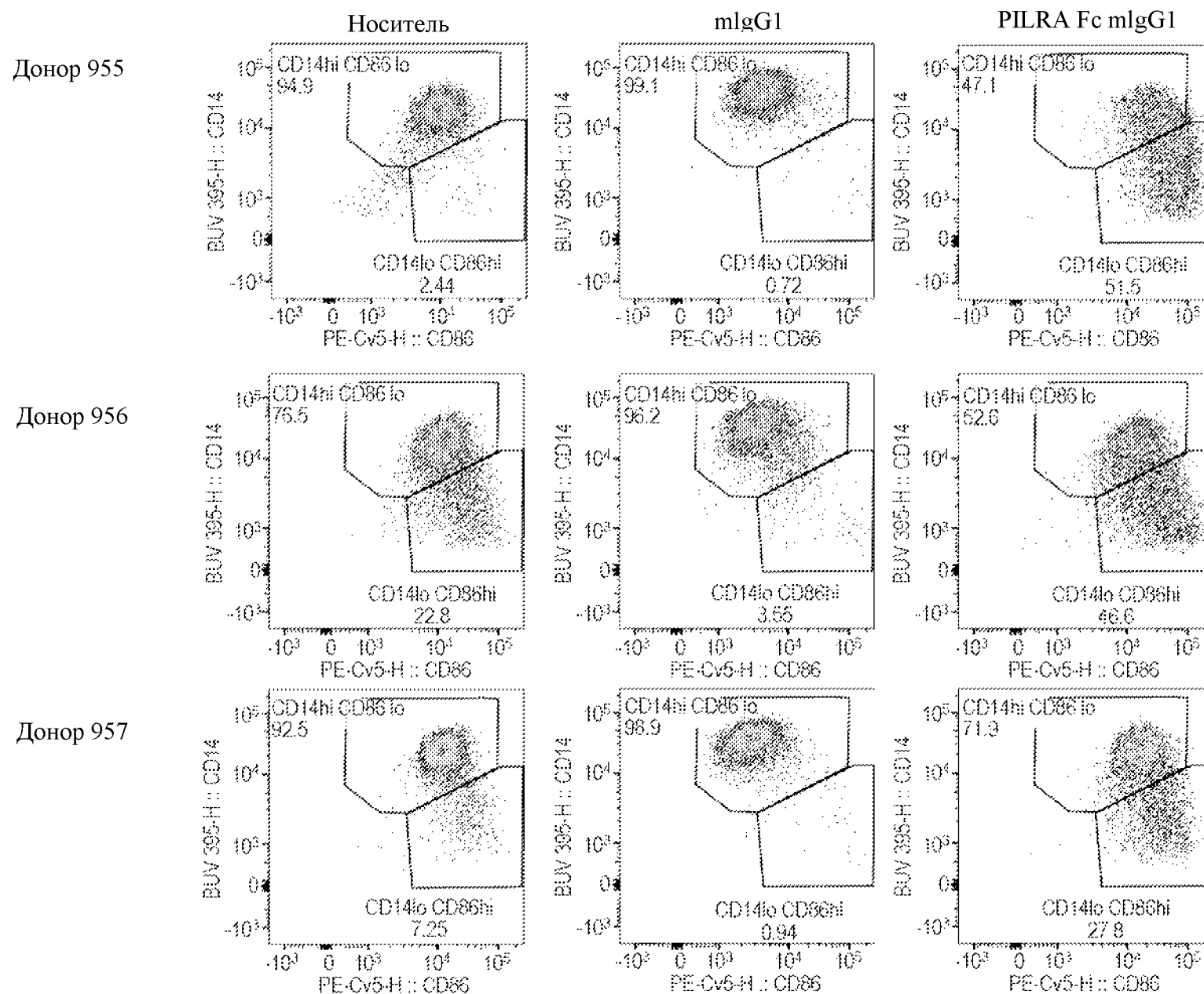
ФИГ. 1А



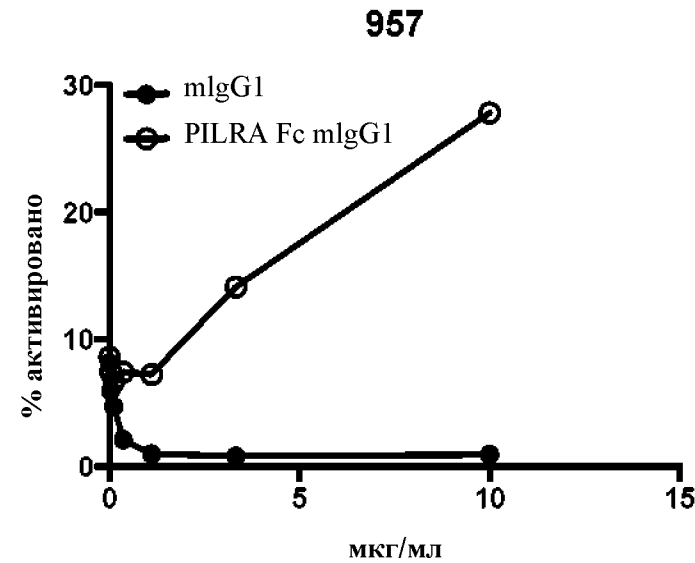
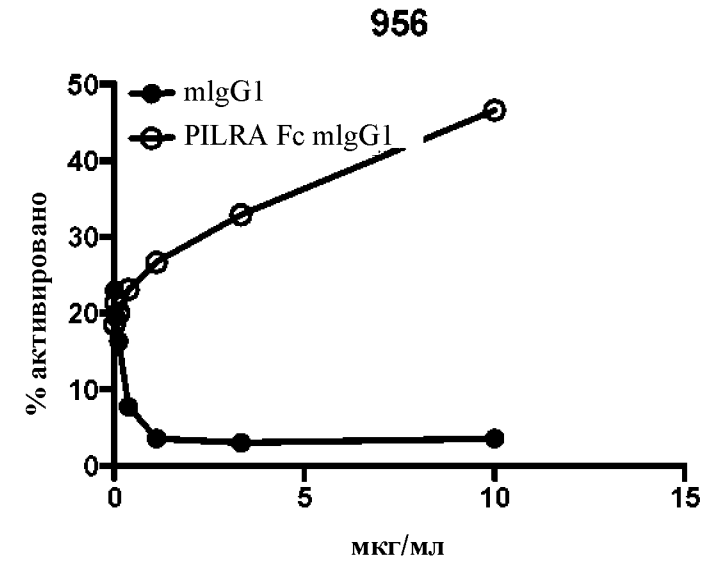
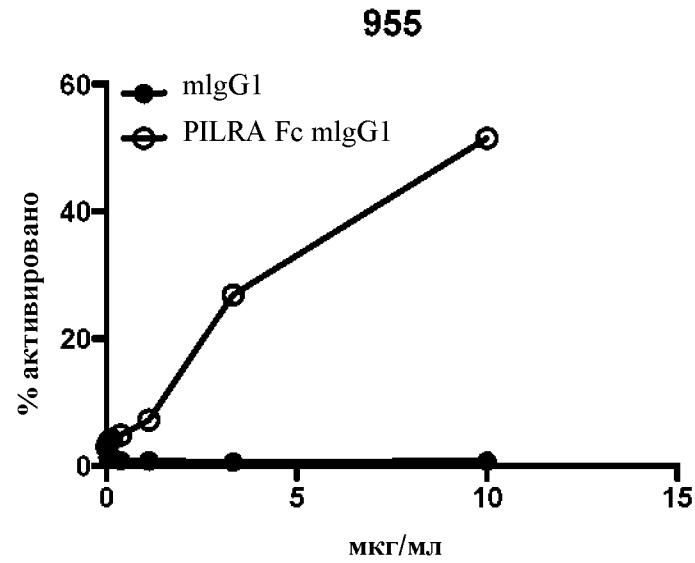
ФИГ. 1В



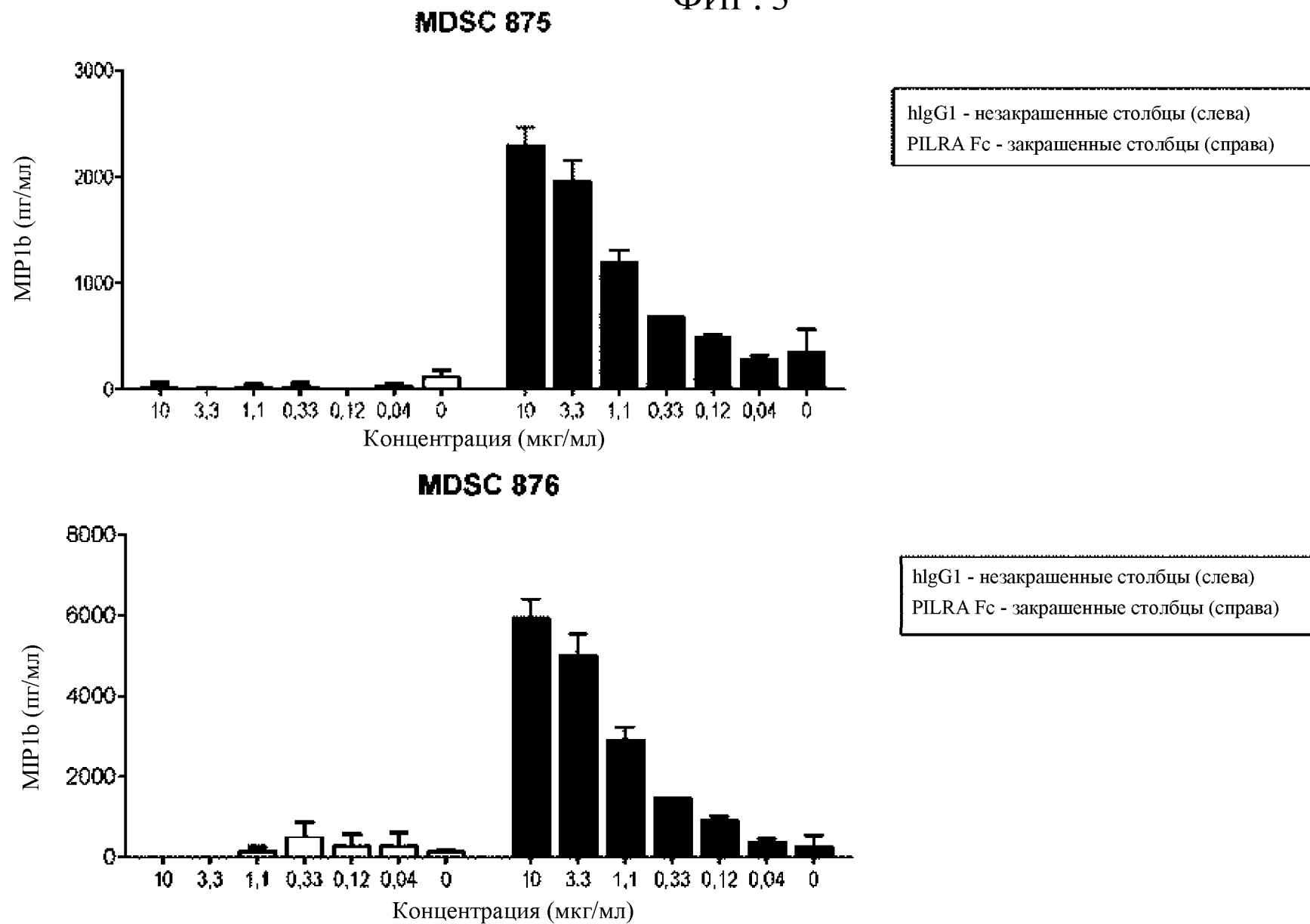
ФИГ. 2А



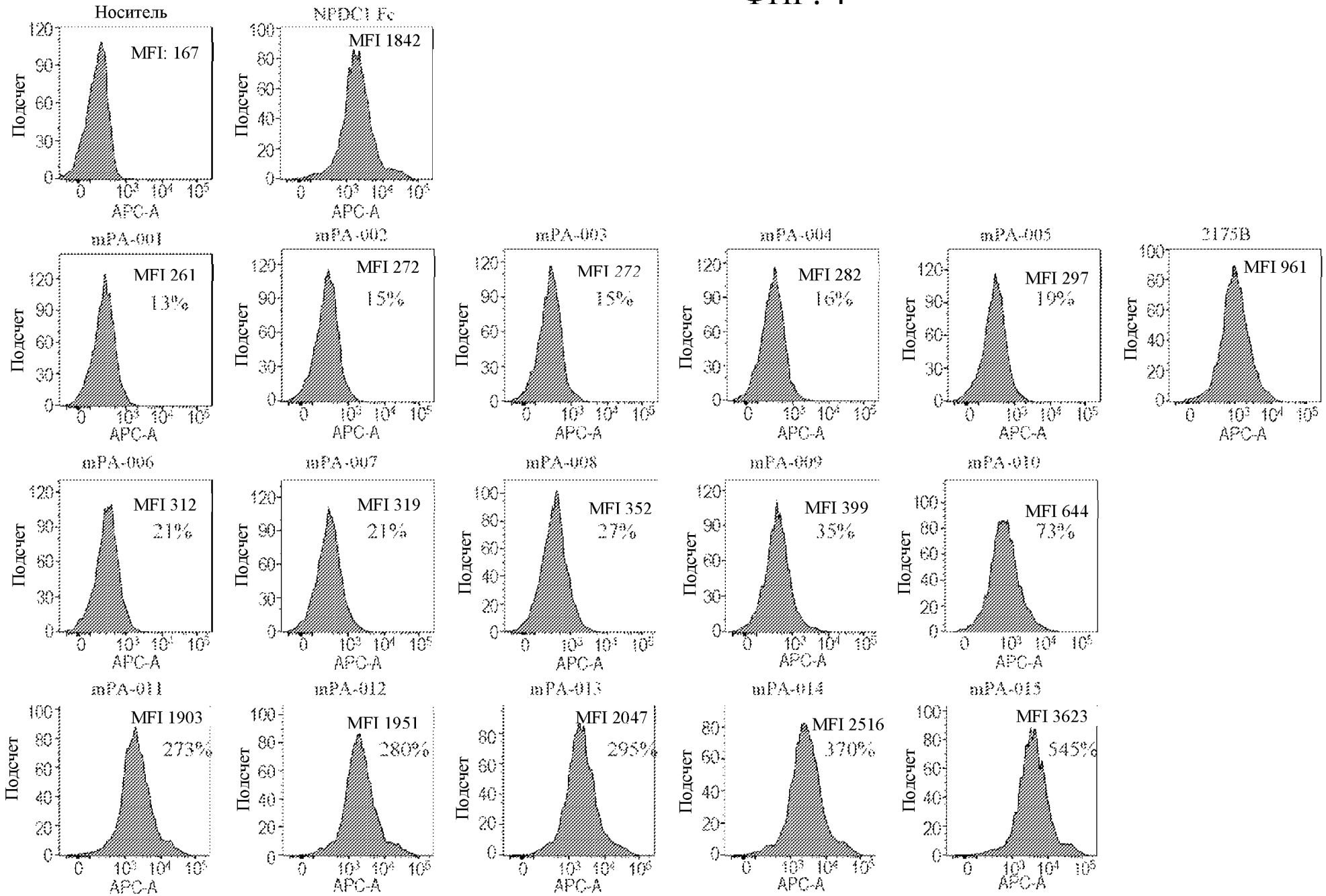
ФИГ. 2В



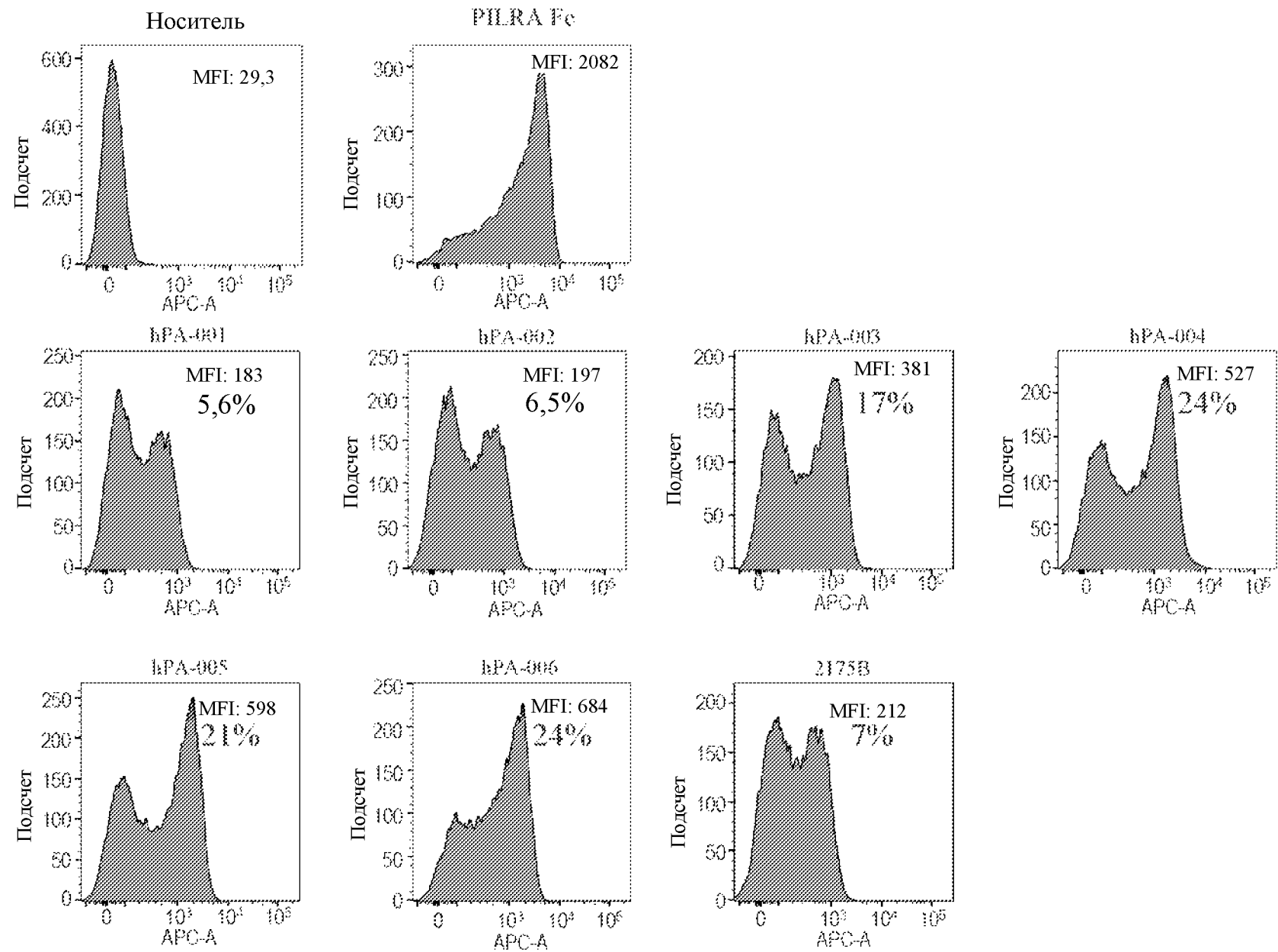
ФИГ. 3



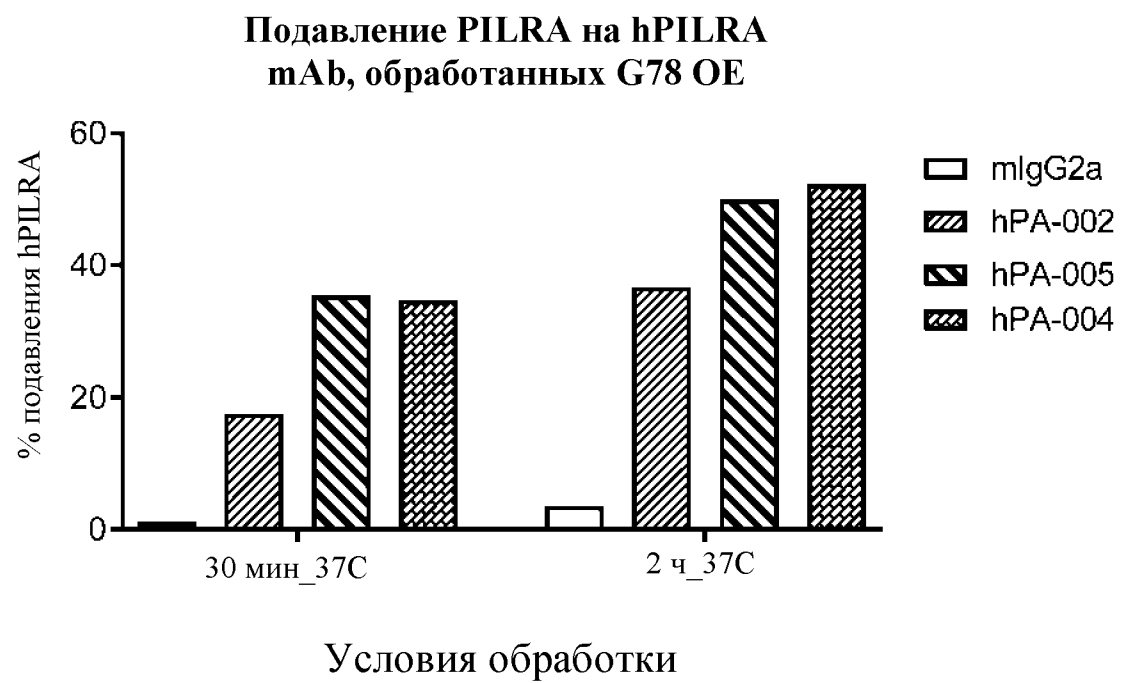
ФИГ. 4



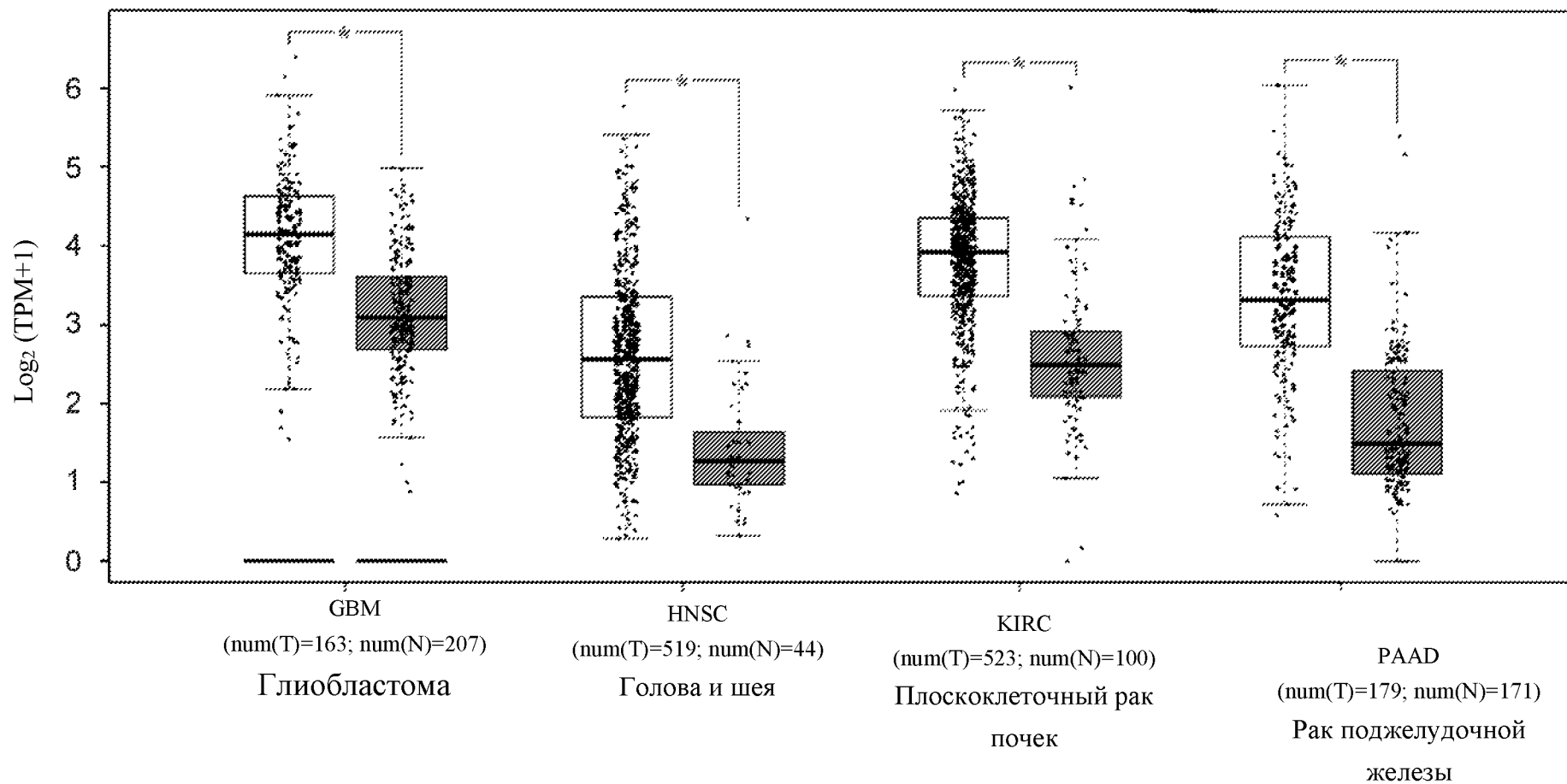
ФИГ. 5



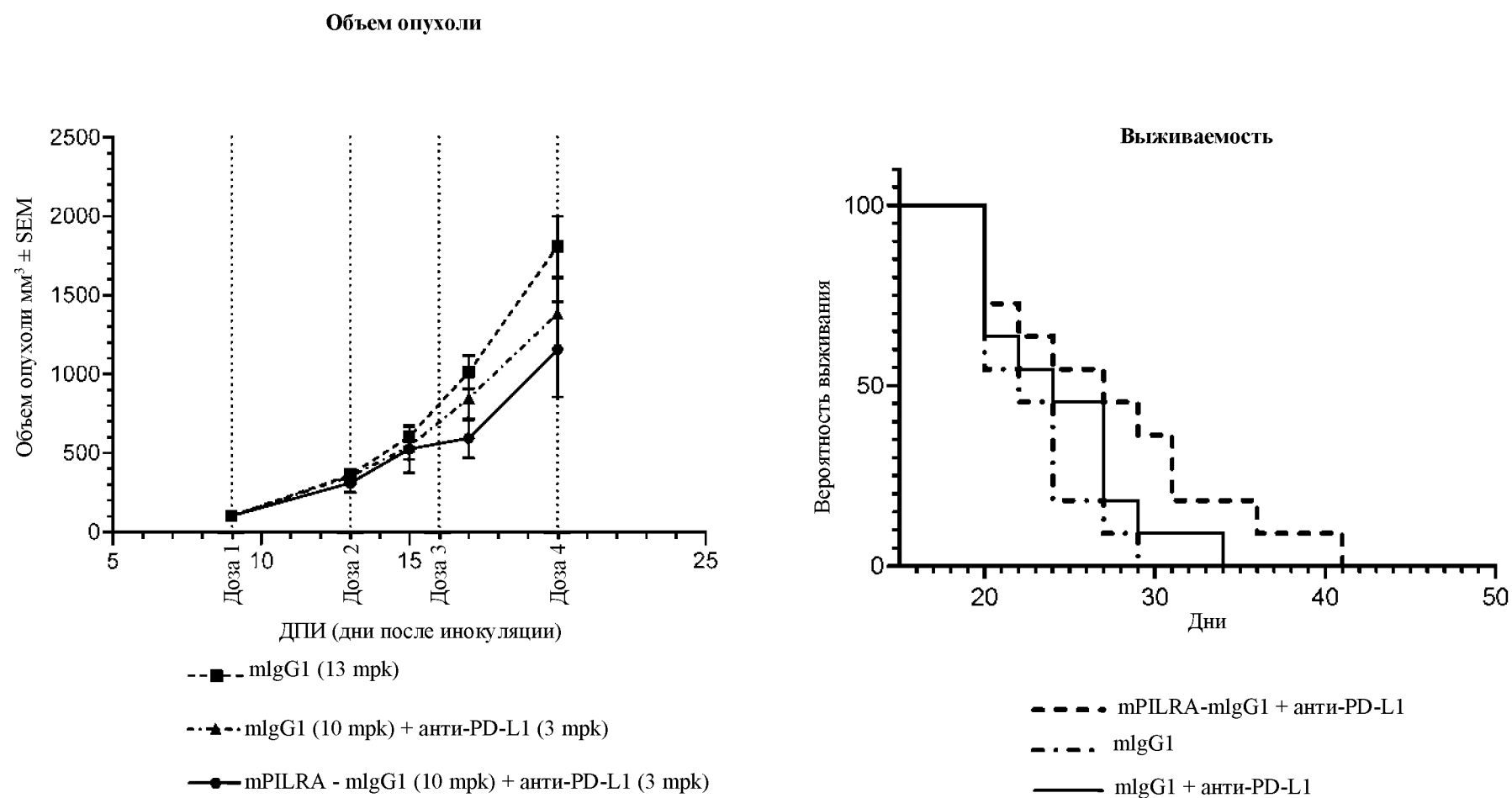
ФИГ. 6



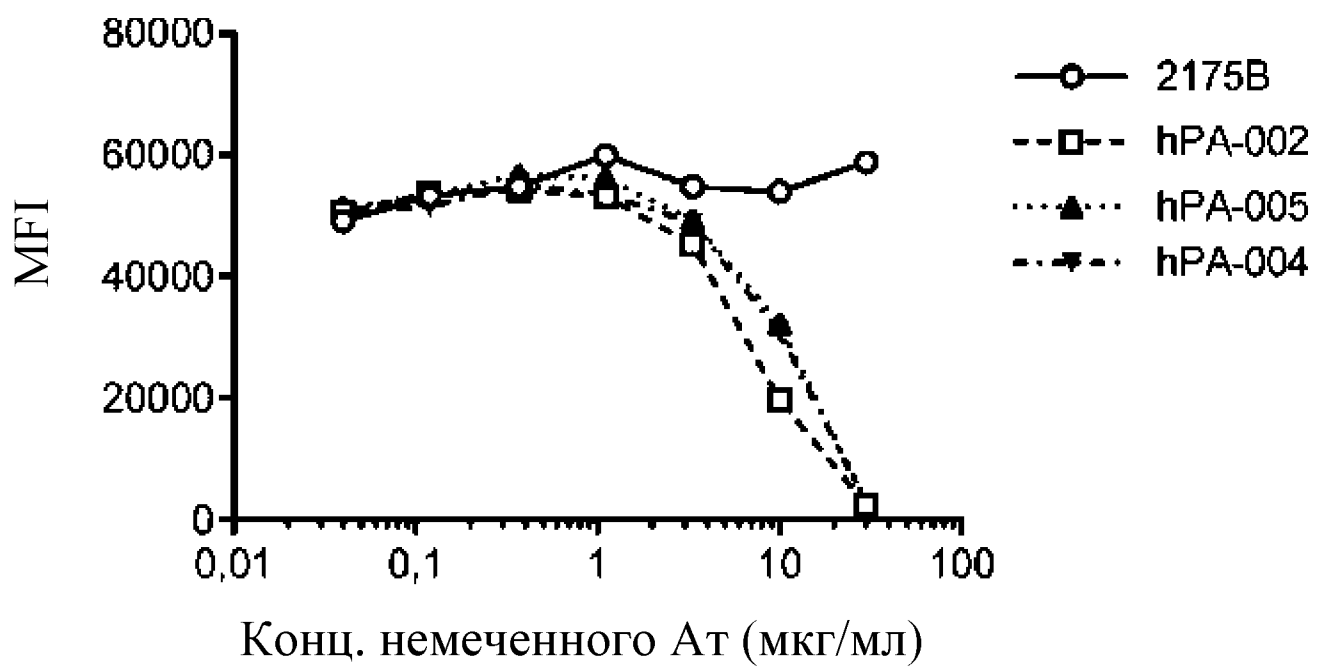
ФИГ. 7



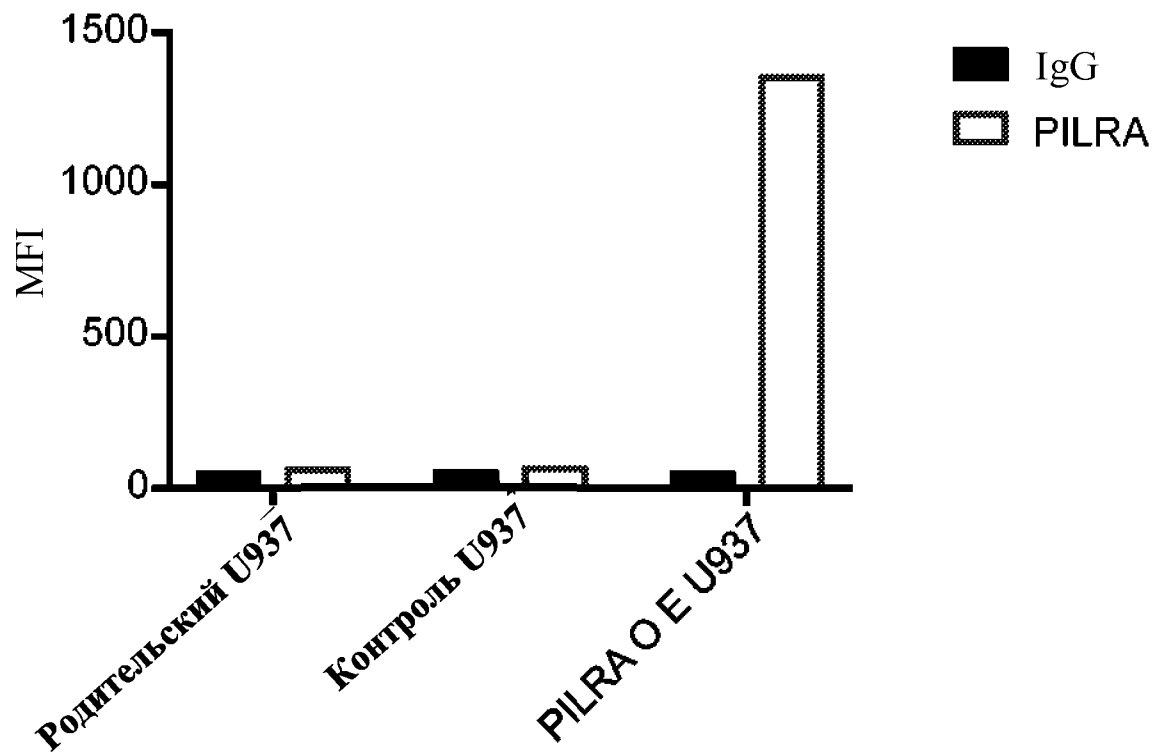
ФИГ. 8



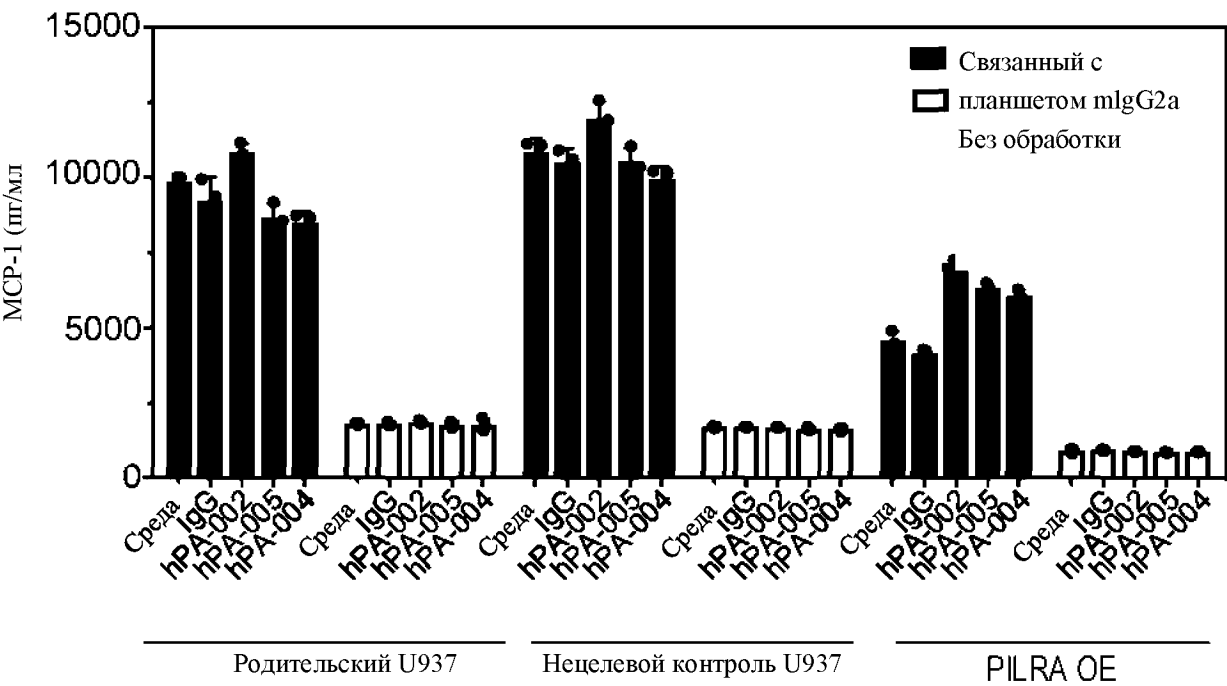
ФИГ. 9



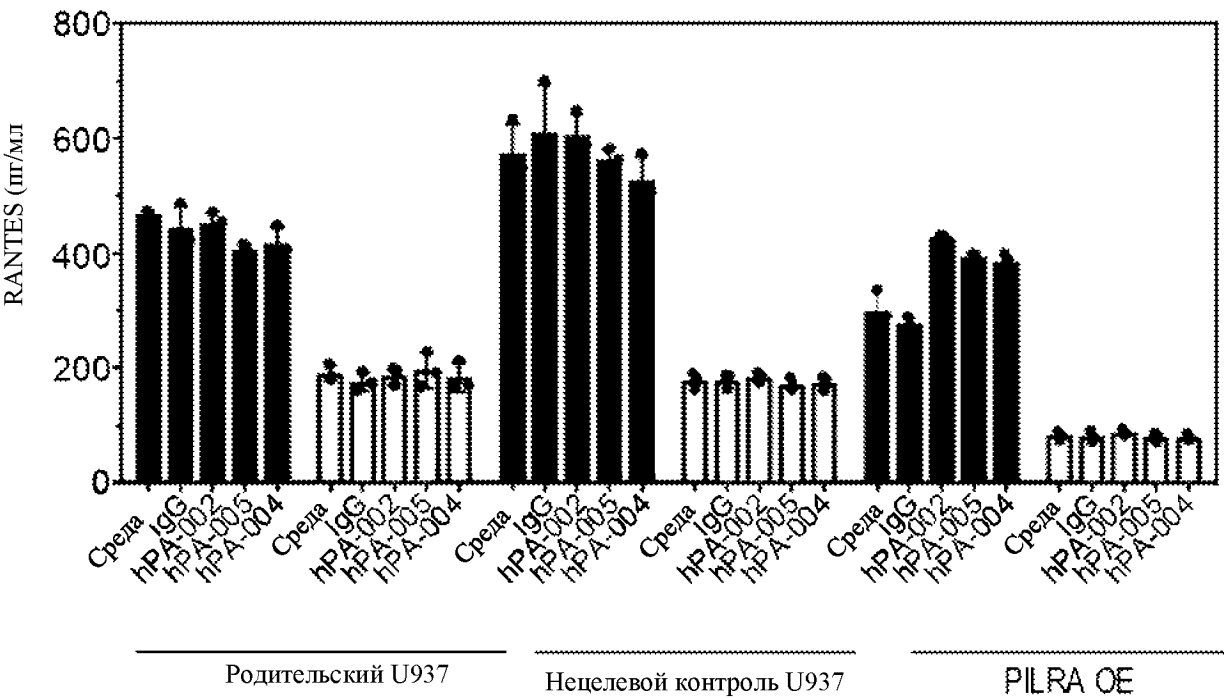
ФИГ. 10А



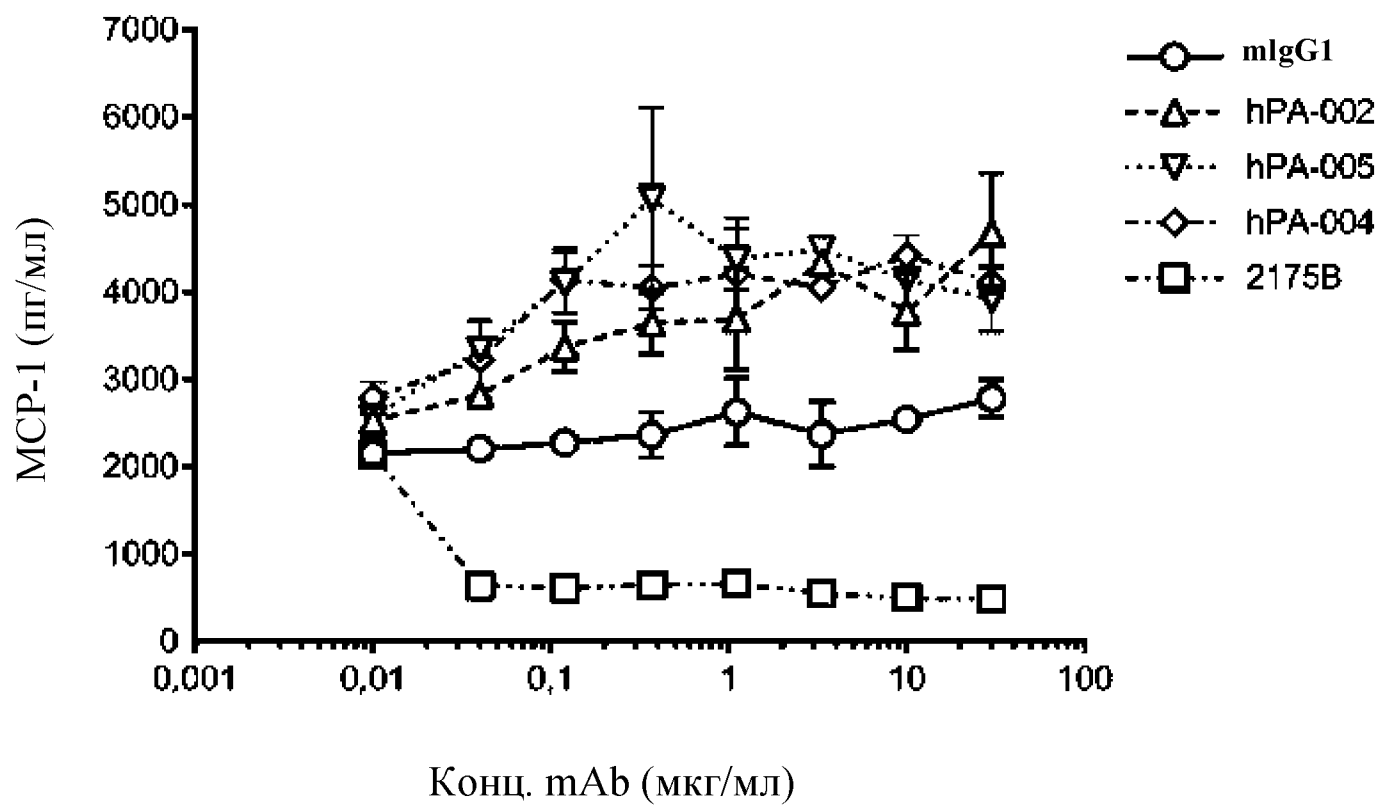
ФИГ. 10В



ФИГ. 10С

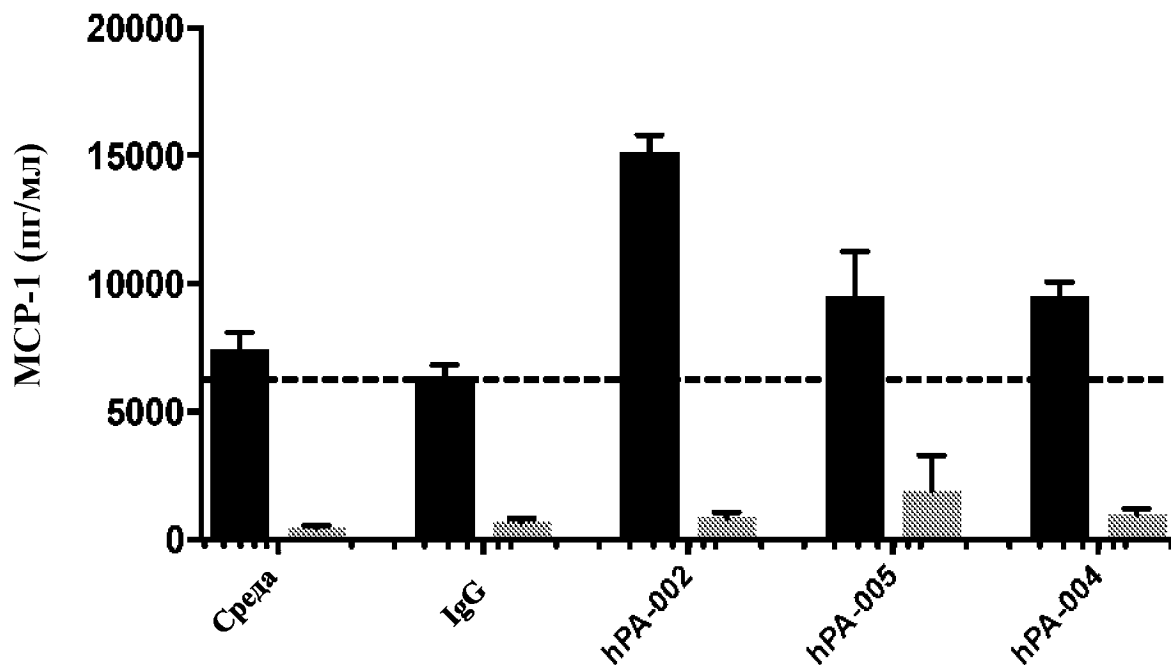


ФИГ. 11

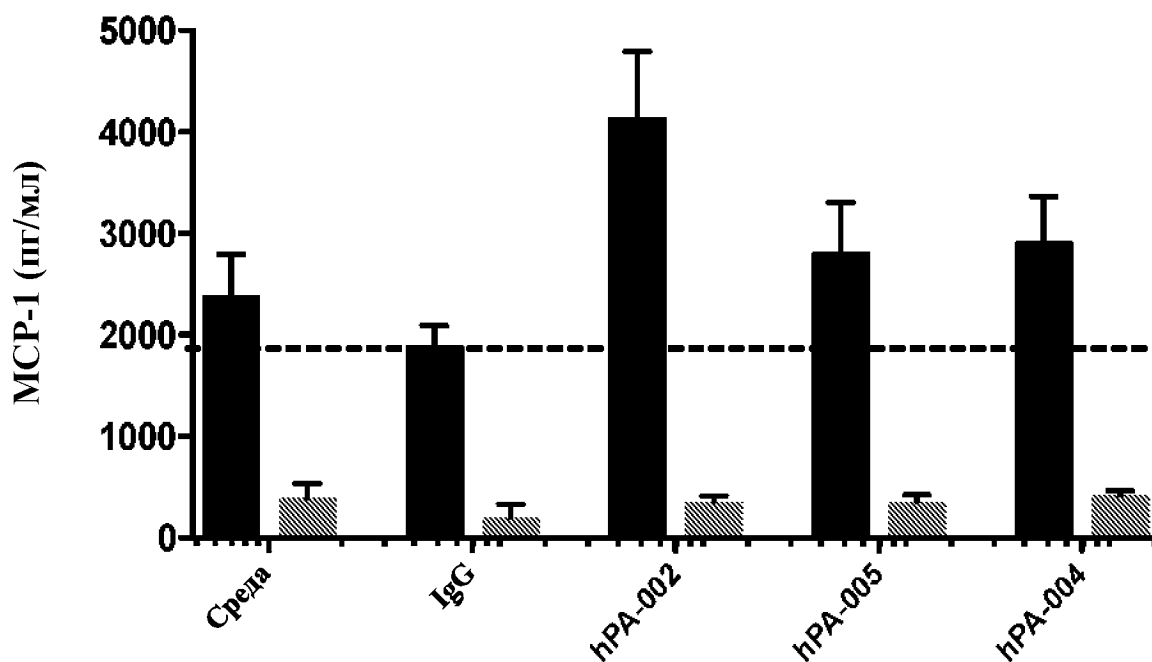
U937 PILRA OE

ФИГ. 12

Донор 1028

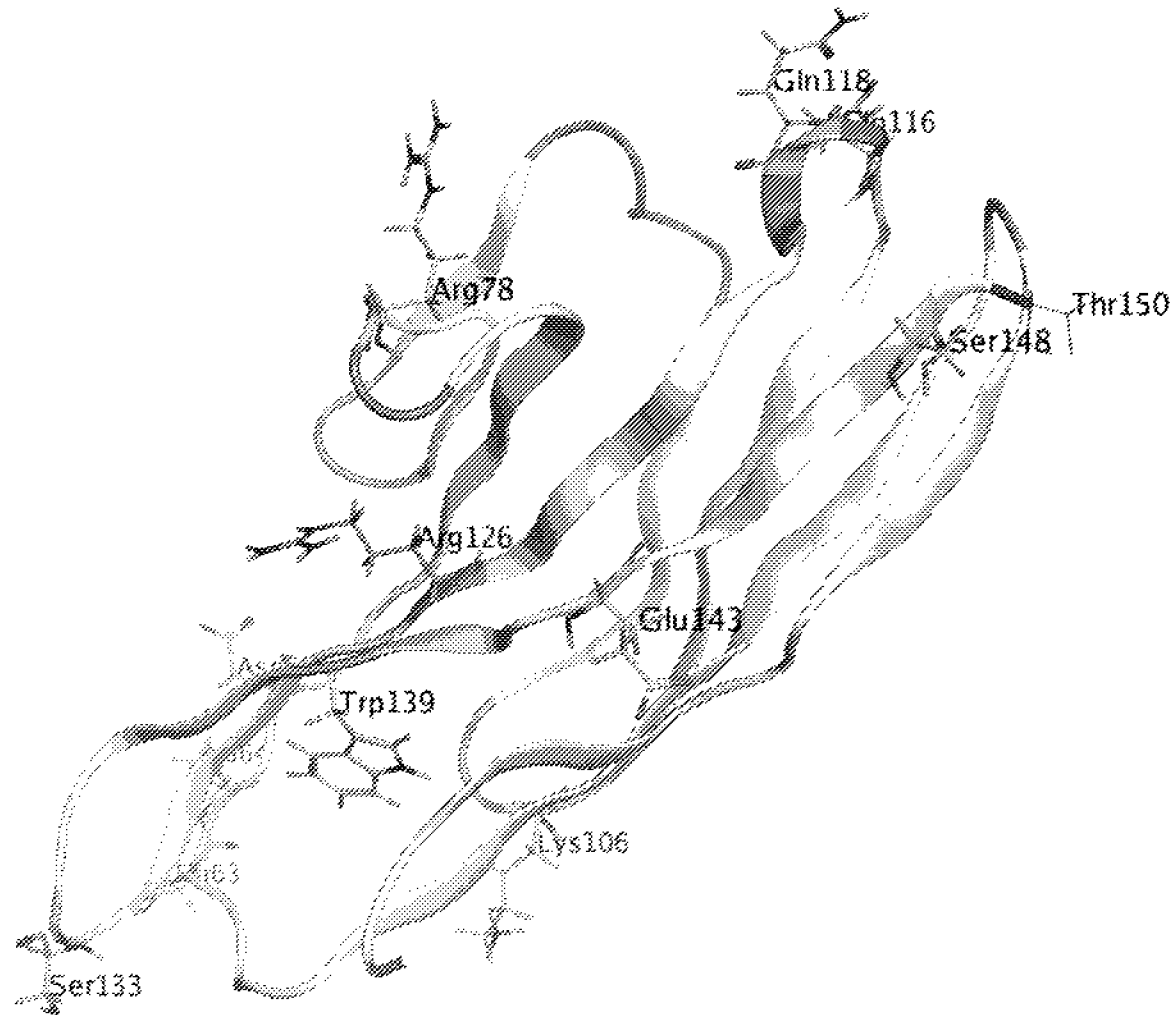


Донор 1029



■ mIgG2a
▨ необработанной контроль

ФИГ. 14А



ФИГ. 14В

