

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992512** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.03.04

(22) Дата подачи заявки
2018.04.20

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) **АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ TREM2, И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/488,691; 62/530,753; 62/580,400

(32) 2017.04.21; 2017.07.10; 2017.11.01

(33) US

(86) PCT/US2018/028691

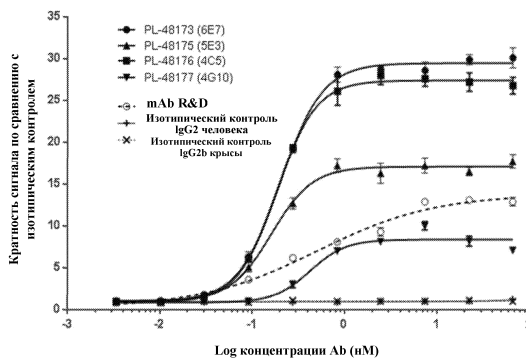
(87) WO 2018/195506 2018.10.25

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Фолтц Ян, Самбашиван Шилпа, Чэнь
Ирвин, Харрис Сюзи Мики, Толедо
Варшавиак Дора, Драйвер Иан, Лу
Даниэль (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, таким как моноклональные антитела, которые специфически связываются с триггерным рецептором, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2) человека, и активируют его, и фармацевтическим композициям, содержащим такие антигенсвязывающие белки. Антигенсвязывающие белки-агонисты (или антитела) по настоящему изобретению способны активировать передачу сигналов TREM2/DAP12 в миелоидных клетках в отсутствие Fc-опосредованного перекрестного сшивания антигенсвязывающих белков. Также описаны способы лечения или предупреждения состояний, связанных с утратой функции TREM2, таких как болезнь Альцгеймера и рассеянный склероз, с применением антигенсвязывающих белков.



A

A1

201992512

201992512

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-559277EA/022

АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ TREM2, И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[1] Настоящее изобретение относится к области биофармацевтических препаратов. Более конкретно, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, таким как антитела, которые специфически связываются с триггерным рецептором, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2) человека, и активируют его, и фармацевтическим композициям, содержащим указанные антигенсвязывающие белки, и способам получения и применения таких антигенсвязывающих белков.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

[2] Содержание нижеследующего представленного текстового файла ASCII включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте: машиночитаемая форма (CRF) перечня последовательностей (название файла: A-2129-WO-PCT_Sequence_Listing_ST25, дата создания: 18 апреля 2018 года, размер: 285044 байта).

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[3] TREM2 является представителем суперсемейства рецепторов Ig, который экспрессируется на клетках миелоидного происхождения, в том числе макрофагах, дендритных клетках и клетках микроглии (Schmid et al., Journal of Neurochemistry, Vol. 83: 1309-1320, 2002; Colonna, Nature Reviews Immunology, Vol. 3: 445-453, 2003; Kiialainen et al., Neurobiology of Disease, Vol. 18: 314-322, 2005). TREM2 является орфанным иммунным рецептором с коротким внутриклеточным доменом и функционирует путем передачи сигналов с помощью адаптерного белка DAP12, цитоплазматический домен которого содержит мотив ITAM (Bouchon et al., The Journal of Experimental Medicine, Vol. 194: 1111-1122, 2001). После активации TREM2 остатки тирозина в мотиве ITAM в DAP12 фосфорилируются семейством киназ Src с обеспечением сайтов присоединения для белка 70, ассоциированного с ζ -цепью тирозинкиназы (ZAP70) и тирозинкиназы селезенки (Syk) посредством их SH2-доменов (Colonna, Nature Reviews Immunology, Vol. 3: 445-453, 2003; Ulrich and Holtzman, ACS Chem. Neurosci., Vol. 7: 420-427, 2016). Киназы ZAP70 и Syk индуцируют активацию нескольких нисходящих сигнальных каскадов, в том числе фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K), протеинкиназу C (PKC), внеклеточную регулируемую киназу (ERK) и повышение внутриклеточного кальция (Colonna, Nature Reviews Immunology, Vol. 3: 445-453, 2003; Ulrich and Holtzman, ACS Chem. Neurosci., Vol. 7: 420-427, 2016).

[4] TREM2 участвует в некоторых процессах, связанных с миелоидными клетками, в том числе фагоцитозе, пролиферации, выживании и регуляции продуцирования воспалительных цитокинов (Ulrich and Holtzman, ACS Chem. Neurosci., Vol. 7: 420-427,

2016). В последние несколько лет TREM2 связывают с несколькими заболеваниями. Например, мутации как в TREM2, так и в DAP12 связаны с аутосомно-рецессивным нарушением под названием болезнь Насу-Хакола, которое характеризуется костными кистами, атрофиями мышц и демиелинизацией (Guerreiro et al., *New England Journal of Medicine*, Vol. 368: 117–127, 2013). Совсем недавно варианты в гене TREM2 связали с повышенным риском развития болезни Альцгеймера (AD) и других форм деменции, включая лобно-височную деменцию (Jonsson et al., *New England Journal of Medicine*, Vol. 368: 107–116, 2013; Guerreiro et al., *JAMA Neurology*, Vol. 70:78–84, 2013; Jay et al., *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 212: 287–295, 2015). В частности, вариант R47H идентифицировали в исследованиях по всему геному как связанный с повышенным риском AD с поздним началом с общим скорректированным отношением шансов (для популяций всех возрастов) 2,3, уступая только сильной генетической связи ApoE с болезнью Альцгеймера. Мутация R47H находится на внеклеточном V-образном Ig-домене белка TREM2 и, как было показано, влияет на связывание липидов и поглощение апоптотических клеток и Abeta (Wang et al., *Cell*, Vol. 160: 1061–1071, 2015; Yeh et al., *Neuron*, Vol. 91: 328–340, 2016), что указывает на утрату функции, связанную с заболеванием. Кроме того, посмертное сравнение мозга пациентов с AD с мутацией R47H и без нее подтверждает данные о ранее неизученной потере барьерной функции микроглии для носителей мутации, при этом микроглия-носитель R47H предположительно демонстрирует сниженную способность уплотнять бляшки и ограничивать их распространение (Yuan et al., *Neuron*, Vol. 90: 724–739, 2016). На животных моделях прионных заболеваний, рассеянного склероза и инсульта сообщалось о нарушении в микроглиозе, что позволяет предположить, что TREM2 может играть важную роль в поддержке микроглиоза в ответ на патологию или повреждение в центральной нервной системе (Ulrich and Holtzman, *ACS Chem. Neurosci.*, Vol. 7: 420–427, 2016).

[5] Ввиду данных, указывающих на то, что дефицит активности TREM2 влияет на функцию макрофагов и микроглии и коррелирует с некоторыми нейродегенеративными нарушениями, в данной области техники существует потребность в терапевтических молекулах, которые могут индуцировать или усиливать TREM2-опосредованные функции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[6] Настоящее изобретение частично основано на разработке и создании антигенсвязывающих белков (например, антител), которые специфически связываются и активируют TREM2 человека без необходимости дополнительного перекрестного сшивания. Антигенсвязывающие белки-агонисты по настоящему изобретению способны активировать передачу сигналов TREM2/DAP12 в миелоидных клетках в отсутствие агрегации, кластеризации и/или Fc-опосредованного перекрестного сшивания антигенсвязывающих белков. Соответственно, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенным антигенсвязывающим белкам-агонистам,

которые специфически связываются с TREM2 человека и индуцируют или активируют одну или более TREM2–опосредованных функций.

[7] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 увеличивают уровни фосфорилированного Syk (pSyk) в отсутствие перекрестносшивающего средства в клетках, экспрессирующих TREM2. Клетки могут представлять собой клетки миелоидного происхождения, в том числе моноциты, дендритные клетки, микроглиальные клетки и макрофаги. В определенных вариантах осуществления связывания антигена агониста TREM2 увеличивают уровни pSyk в TREM2–экспрессирующих клетках с EC50 меньше чем 500 пМ в отсутствие перекрестносшивающего средства, как измерено с помощью клеточного анализа pSyk. В других вариантах осуществления связывания антигена агониста TREM2 увеличивают уровни pSyk в TREM2–экспрессирующих клетках с EC50 меньше чем 300 пМ в отсутствие перекрестносшивающего средства, как измерено с помощью клеточного анализа pSyk. В еще других вариантах осуществления связывания антигена агониста TREM2 увеличивают уровни pSyk в TREM2–экспрессирующих клетках с EC50 от приблизительно 150 пМ до приблизительно 500 пМ в отсутствие перекрестносшивающего средства, как измерено с помощью клеточного анализа pSyk.

[8] Антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 специфически связываются с TREM2 человека (SEQ ID NO: 1) или внеклеточным доменом (ECD) TREM2 человека (например, ECD, изложенным под SEQ ID NO: 2), например, с равновесной константой диссоциации (K_D), меньшей чем 50 нМ, меньшей чем 25 нМ, меньшей чем 10 нМ или меньшей чем 5 нМ. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 не вступают в перекрестную реакцию с другими белками TREM, такими как TREM1 человека. Таким образом, в одном варианте осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 специфически не связываются с TREM1 человека (SEQ ID NO: 4).

[9] Антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению могут конкурировать с любыми антителами к TREM2, описанными в данном документе (например, антителами, перечисленными в таблицах 1A, 1B, 2A, 2B, 3A и 3B) за связывание с TREM2 человека. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 конкурирует с эталонным антителом за связывание с TREM2 человека, где эталонное антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 61, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 124. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 конкурирует с эталонным антителом за связывание с TREM2 человека, где эталонное антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 62, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 125. В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 конкурирует с эталонным антителом за связывание с TREM2 человека, где эталонное

антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 52, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 115. В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок-агонист TREM2 конкурирует с эталонным антителом за связывание с TREM2 человека, где эталонное антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 56, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 119.

[10] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3. Переменные области легкой цепи и тяжелой цепи или CDR могут происходить из любого антитела к TREM2, описанного в данном документе, или его варианта. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 содержат CDRL1, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5–18, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; CDRL2, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19–30, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; CDRL3, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31–45, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; CDRH1, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 77–86, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; CDRH2, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 87–94, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; и CDRH3, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 95–109, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены.

[11] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 содержат переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 46–63, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 110–126. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок-агонист TREM2 содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 54, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 117. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок-агонист TREM2 содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 55, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 118. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок-агонист TREM2 содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 60, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 123. В еще другом варианте осуществления

антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 61, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 124. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 62, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 125. В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 52, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 115.

[12] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат вариабельную область легкой цепи, которая происходит из вариабельной области легкой цепи любого из антител к TREM2, описанных в данном документе. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи антигенсвязывающих белков–агонистов TREM2 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична, на по меньшей мере 91% идентична, на по меньшей мере 92% идентична, на по меньшей мере 93% идентична, на по меньшей мере 94% идентична или на по меньшей мере 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 46–63. Например, антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 могут содержать вариабельную область легкой цепи из любого из сконструированных вариантов антитела к TREM2, изложенных в таблицах 13–18. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 54 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 64, 79, 80, 85, 94 и/или 100. В некоторых таких вариантах осуществления мутация представляет собой V64G, V64A, Q79E, Q79D, S80P, S80A, F85V, F85L, F85A, F85D, F85I, F85L, F85M, F85T, W94F, W94Y, W94S, W94T, W94A, W94H, W94I, W94Q, P100R, P100Q, P100G или их комбинации. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 55 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 64, 79, 80, 94 и/или 100. Такие мутации могут включать V64G, V64A, Q79E, Q79D, S80P, S80A, W94F, W94Y, W94S, W94T, W94A, W94H, W94I, W94Q, P100R, P100Q, P100G или их комбинации. В определенных вариантах осуществления такие мутации представляют собой V64G, V64A, Q79E, S80P, S80A, W94Y, W94S, P100R, P100Q или их комбинации. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 60 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 60, 92 и/или 93. Мутации в таких вариантах осуществления могут быть выбраны из L60S, L60P, L60D, L60A, D92E, D92Q, D92T, D92N, S93A, S93N, S93Q, S93V или их комбинаций. В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную

область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 61 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 56, 57, 92 и/или 93. В таких вариантах осуществления мутации могут представлять собой N56S, N56T, N56Q, N56E, G57A, G57V, D92E, D92Q, D92T, D92N, S93A, S93N, S93Q, S93V или их комбинации. В определенных вариантах осуществления такие мутации представляют собой N56S, N56Q, G57A, D92E, D92Q, S93A или их комбинации. В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 62 с мутацией в аминокислотном положении 36, 46, 61 и/или 100. Такие мутации могут включать F36Y, S46L, S46R, S46V, S46F, K61R, P100Q, P100G, P100R или их комбинации. В конкретных вариантах осуществления такие мутации представляют собой F36Y, K61R, P100Q или их комбинации. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 52 с мутацией в аминокислотном положении 91, которая может быть выбрана из F91V, F91I, F91T, F91L или F91D. В одном варианте осуществления мутация представляет собой F91V.

[13] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат вариабельную область тяжелой цепи, которая происходит из вариабельной области тяжелой цепи любого из антител к TREM2, описанных в данном документе. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи антигенсвязывающих белков–агонистов TREM2 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична, на по меньшей мере 91% идентична, на по меньшей мере 92% идентична, на по меньшей мере 93% идентична, на по меньшей мере 94% идентична или на по меньшей мере 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 110–126. Например, антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 могут содержать вариабельную область тяжелой цепи из любого из сконструированных вариантов антитела к TREM2, изложенных в таблицах 13–18. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 117 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 19, 55, 56, 57, 58 и/или 104. В некоторых таких вариантах осуществления мутация представляет собой M19K, M19R, M19T, M19E, M19N, M19Q, D55E, D55Q, D55N, D55T, S56A, S56Q, S56V, D57S, D57E, D57Q, T58A, T58V, W104F, W104Y, W104T, W104S, W104A, W104H, W104I, W104Q или их комбинации. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 118 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 19, 55, 56, 57, 58 и/или 104. Такие мутации могут включать M19K, M19R, M19T, M19E, M19N, M19Q, D55E, D55Q, D55N, D55T, S56A, S56Q, S56V, D57S, D57E, D57Q, T58A, T58V, W104F, W104Y, W104T, W104S, W104A, W104H, W104I, W104Q или их комбинации. В определенных вариантах осуществления такие мутации

представляют собой M19K, D55E, S56A, D57E, T58A, W104Y, W104T или их комбинации. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 123 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 27, 55, 56, 57, 58, 105 и/или 106. В некоторых вариантах осуществления мутации выбраны из H27Y, H27D, H27F, H27N, D55E, D55Q, D55N, D55T, S56A, S56Q, S56V, D57S, D57E, D57Q, T58A, T58V, D105E, D105Q, D105T, D105N, D105G, S106A, S106Q, S106V, S106T или их комбинаций. В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 124 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 55, 56, 57, 58, 105 и/или 106. Мутация в таких вариантах осуществления может быть выбрана из D55E, D55Q, D55N, D55T, S56A, S56Q, S56V, D57S, D57E, D57Q, T58A, T58V, D105E, D105Q, D105T, D105N, D105G, S106A, S106Q, S106V, S106T или их комбинации. В определенных вариантах осуществления такие мутации представляют собой D55E, D55Q, S56A, D57E, T58A, D105E, D105N, S106A или их комбинации. В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 125 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 43, 76, 85, 99, 100 и/или 116. Такие мутации могут включать L43Q, L43K, L43H, I76T, R85S, R85G, R85N, R85D, D99E, D99Q, D99S, D99T, G100A, G100Y, G100V, T116L, T116M, T116P, T116R или их комбинации. В определенных вариантах осуществления такие мутации представляют собой L43Q, R85S, D99E, G100A, G100Y, T116L или их комбинации. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 115 с мутацией в аминокислотном положении 62 и/или 63. В таких вариантах осуществления мутации могут быть выбраны из D62E, D62Q, D62T, D62N, S63A, S63Q, S63V или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления такие мутации представляют собой D62E, D62Q, S63A или их комбинации.

[14] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат одну или более CDR варианта антител к TREM2, описанных в данном документе. Например, антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 могут содержать одну или более CDR вариантов антител к TREM2, изложенных в таблицах 2A, 2B, 3A, 3B и 19. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат одну или более CDR вариантов антитела к TREM2 с улучшенной аффинностью связывания. В этих и других вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат CDRL1, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 16; CDRL2, содержащую консенсусную последовательность CDRL2; CDRL3, содержащую консенсусную последовательность CDRL3; CDRH1, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 85, CDRH2, содержащую консенсусную последовательность CDRH2; и CDRH3, содержащую

консенсусную последовательность CDRH3. В одном варианте осуществления консенсусная последовательность CDRL2 представляет собой $X_1ASSX_2QX_3$ (SEQ ID NO: 139), где X_1 представляет собой A или G; X_2 представляет собой L или R; и X_3 представляет собой N, K, R, L или T. В связанных вариантах осуществления CDRL3 консенсусная последовательность представляет собой $X_1QADX_2X_3PX_4T$ (SEQ ID NO: 140), где X_1 представляет собой Q или G; X_2 представляет собой S или R; X_3 представляет собой F, L или Y; и X_4 представляет собой R или H. В таких и других вариантах осуществления консенсусная последовательность CDRH2 представляет собой $X_1IYPGSDSX_2RX_3X_4PX_5FQX_6$ (SEQ ID NO: 141), где X_1 представляет собой I или T; X_2 представляет собой T или V; X_3 представляет собой Y или L; и X_4 представляет собой S или A; X_5 представляет собой S, G или E; и X_6 представляет собой G или D. Консенсусная CDRH3 может представлять собой $X_1RTFYDSSDYX_2DY$ (SEQ ID NO: 142), где X_1 представляет собой Q, G, S или M; и X_2 представляет собой F или S. В дополнительных вариантах осуществления CDRL2 антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 по настоящему изобретению может содержать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 26 и 143–147. В еще других вариантах осуществления CDRL3 антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 по настоящему изобретению может содержать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 43 и 148–152. В некоторых вариантах осуществления CDRH2 антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 по настоящему изобретению может содержать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 91 и 170–175. В других вариантах осуществления CDRH3 антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 по настоящему изобретению может содержать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 176–179.

[15] В других вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 содержат одну или более CDR вариантов антитела к TREM2 с уменьшенной аффинностью связывания. В этих и других вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 содержат CDRL1, содержащую консенсусную последовательность CDRL1; CDRL2, содержащую консенсусную последовательность CDRL2; CDRL3, содержащую консенсусную последовательность CDRL3; CDRH1, содержащую консенсусную последовательность CDRH1, CDRH2, содержащую консенсусную последовательность CDRH2; и CDRH3, содержащую консенсусную последовательность CDRH3. В одном варианте осуществления указанная консенсусная последовательность CDRL1 представляет собой $X_1ASQGISX_2WLA$ (SEQ ID NO: 284), где X_1 представляет собой R или A; и X_2 представляет собой S или R. В связанных вариантах осуществления указанная консенсусная последовательность CDRL2 представляет собой X_1AX_2SLQN (SEQ ID NO: 285), где X_1 представляет собой A или S; и X_2 представляет собой S или G. В других связанных вариантах осуществления указанная консенсусная последовательность CDRL3 представляет собой $QQAX_1SFPX_2T$ (SEQ ID NO: 286), где X_1 представляет собой D или V; и X_2 представляет собой R или L. В таких и других вариантах осуществления консенсусная последовательность CDRH1 представляет

с собой SX_1WIA (SEQ ID NO: 287), где X_1 представляет собой Y или E. В связанных вариантах осуществления консенсусная последовательность CDRH2 представляет собой $PIYPX_1DSDTRYSPSFQG$ (SEQ ID NO: 288), где X_1 представляет собой G или S. Такая консенсусная последовательность CDRH3 может представлять собой $QRX_1FX_2X_3DSSDYFDY$ (SEQ ID NO: 289), где X_1 представляет собой T или G; X_2 представляет собой Y или R; и X_3 представляет собой Y или G. В некоторых вариантах осуществления CDRL1 антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 по настоящему изобретению может содержать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16, 290 и 291. В дополнительных вариантах осуществления CDRL2 антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 по настоящему изобретению может содержать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28, 292 и 293. В еще других вариантах осуществления CDRL3 антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 по настоящему изобретению может содержать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 43, 294 и 271. В некоторых вариантах осуществления CDRH1 антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 по настоящему изобретению может содержать последовательность под SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 302. В других вариантах осуществления CDRH2 антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 по настоящему изобретению может содержать последовательность под SEQ ID NO: 91 или SEQ ID NO: 303. В еще других вариантах осуществления CDRH3 антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 по настоящему изобретению может содержать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 107 и 304–306.

[16] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 содержат вариабельную область легкой цепи и/или вариабельную область тяжелой цепи из любых вариантов антител к TREM2, изложенных в таблицах 2A, 2B, 3A, 3B и 19. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична, на по меньшей мере 91% идентична, на по меньшей мере 92% идентична, на по меньшей мере 93% идентична, на по меньшей мере 94% идентична или на по меньшей мере 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 61, 153–162 и 295–300. В таких и других вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична, на по меньшей мере 91% идентична, на по меньшей мере 92% идентична, на по меньшей мере 93% идентична, на по меньшей мере 94% идентична или на по меньшей мере 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 124, 180–190 и 307–312.

[17] В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, включая варианты осуществления, описанные выше, антигенсвязывающий белок-агонист TREM2 представляет собой антитело или его связывающий фрагмент, предпочтительно моноклональное антитело или его связывающий фрагмент. В некоторых вариантах

осуществления моноклональное антитело или его связывающий фрагмент представляет собой химерное антитело или его связывающий фрагмент. В других вариантах осуществления моноклональное антитело или его связывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело или его связывающий фрагмент. В еще других вариантах осуществления моноклональное антитело или его связывающий фрагмент представляет собой полностью человеческое антитело или его связывающий фрагмент. Моноклональное антитело может быть любого изотипа, такого как IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В одном конкретном варианте осуществления моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1 человека. В другом конкретном варианте осуществления моноклональное антитело представляет собой антитело IgG2 человека.

[18] В определенных вариантах осуществления, в которых антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 представляет собой антитело (например, моноклональное антитело), антитело может содержать одну или более модификаций, которые влияют на гликозилирование антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит одну или более мутаций для уменьшения или устранения гликозилирования. В таких вариантах осуществления агликозилированное антитело может содержать в своей тяжелой цепи мутацию в аминокислотном положении N297 (согласно системе нумерации EU), такую как мутация N297G. Агликозилированное антитело может содержать дополнительные мутации для стабилизации структуры антитела. Такие мутации могут включать пары замен цистеина, такие как A287C и L306C, V259C и L306C, R292C и V302C, а также V323C и I332C (аминокислотные положения согласно системе нумерации EU). В одном варианте осуществления агликозилированное антитело содержит мутации R292C и V302C (согласно системе нумерации EU) в своей тяжелой цепи. В определенных вариантах осуществления агликозилированное антитело–агонист TREM2 содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 202 или SEQ ID NO: 203.

[19] В дополнительных вариантах осуществления, в которых антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 представляет собой антитело IgG2 человека (например, моноклональное антитело) или содержит область CH1 и шарнирную область из антитела IgG2 человека, антитело может содержать одну или более модификаций, которые влияют на шарнирную структуру антитела. В одном таком варианте осуществления антитело–агонист TREM2 содержит в своей тяжелой цепи мутацию C131S (согласно системе нумерации EU). В другом варианте осуществления антитело–агонист TREM2 содержит в своей легкой цепи мутацию C214S (согласно системе нумерации EU) и в своей тяжелой цепи мутацию C219S (согласно системе нумерации EU). В другом варианте осуществления антитело–агонист TREM2 содержит в своей легкой цепи мутацию C214S (согласно системе нумерации EU) и в своей тяжелой цепи мутацию C220S (согласно системе нумерации EU).

[20] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению могут содержать область CH1 и

шарнирную область антитела IgG2 человека (например, аминокислоту под SEQ ID NO: 207) и Fc-область из антитела IgG1 человека. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит область CH1 и шарнирную область антитела IgG2 человека (например, аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 207) и Fc-область из антитела IgG1 человека, где Fc-область содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 281.

[21] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи, и тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи, где: (а) переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 326, и переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 327; (b) переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 328, и переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 329; (с) переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 330, и переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 331; или (d) переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 332, и переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 333. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат легкую цепь и тяжелую цепь, где: (а) легкая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 334, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 335; (b) легкая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 334, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 336; (с) легкая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 337, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 338; (d) легкая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 339, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 340; или (е) легкая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 341, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 342.

[22] Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам и векторам экспрессии, кодирующим антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2, описанные в данном документе, а также к клеткам–хозяевам, таким как клетки CHO, содержащие кодирующие полинуклеотиды и векторы экспрессии. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение включает способы получения антигенсвязывающих белков–агонистов TREM2, в том числе моноклональных антител–агонистов к TREM2 и их связывающих фрагментов. В одном варианте осуществления способ предусматривает культивирование клетки–хозяина, содержащей вектор экспрессии, кодирующий антигенсвязывающий белок, в условиях, которые обеспечивают

экспрессию антигенсвязывающего белка, и выделение антигенсвязывающего белка из культуральной среды или клетки-хозяина.

[23] Описанные в данном документе антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 можно применять для изготовления фармацевтической композиции или лекарственного средства для лечения или предупреждения состояний, связанных с дефицитом TREM2 или утратой биологической активности TREM2, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Насу-Хакола, лобно-височная деменция, рассеянный склероз, прионная болезнь или инсульт. Таким образом, настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей описанный в данном документе антигенсвязывающий белок-агонист TREM2 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[24] В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предоставляет способы лечения, предупреждения или снижения риска развития состояний, связанных с дефицитом TREM2 или утратой биологической активности TREM2 у пациента, нуждающегося в этом. В одном варианте осуществления способ предусматривает введение пациенту эффективного количества любого из антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2, описанных в данном документе. В некоторых вариантах состояние, подлежащее лечению, предупреждению или облегчению, представляет собой болезнь Альцгеймера. В других вариантах состояние, подлежащее лечению, предупреждению или облегчению, представляет собой рассеянный склероз. Может быть определено, что пациент, нуждающийся в лечении, характеризуется одним или более генотипами, связанными повышенным риском развития заболевания или состояния, которое можно лечить в соответствии со способами по настоящему изобретению. Например, в некоторых вариантах осуществления пациент характеризуется генотипом, связанным с повышенным риском развития болезни Альцгеймера, таким как генотипы, описанные в данном документе. В дополнительных вариантах осуществления пациент может быть определен как носитель аллеля, кодирующего вариант TREM2, связанный с повышенным риском развития болезни Альцгеймера. Такие варианты могут включать вариант R47H TREM2 и вариант R62H TREM2.

[25] Настоящее изобретение также включает способы повышения выживаемости или пролиферации миелоидных клеток, таких как макрофаги, клетки микроглии и дендритные клетки, у пациента, нуждающегося в этом. В одном варианте осуществления способ предусматривает введение пациенту эффективного количества любого из антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления пациент, нуждающийся в лечении, находится в группе риска, страдает нейродегенеративным нарушением, таким как болезнь Альцгеймера, или у него было диагностировано такое нарушение. В других вариантах осуществления пациент, нуждающийся в лечении, находится в группе риска, страдает аутоиммунным нарушением, таким как рассеянный склероз, или у него было диагностировано такое нарушение.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[26] На **фигуре 1А** изображены кривые доза–ответ для агонистической активности очищенных моноклональных антител к TREM2 человека из сбора 1. Кратность увеличения уровней фосфорилированного Syk (pSyk) в клетках HEK293Т, экспрессирующих TREM2/DAP12 человека, представлена в зависимости от концентрации антител к TREM2 человека. Агонистическая активность коммерчески доступного антитела крысы/мыши к TREM2 человека (mAb17291; "R&D mAb" или "антитело 1") включена для сравнения. Антитела к IgG2 человека и изотипические IgG2b крысы использовали как контроли.

[27] На **фигуре 1В** показаны кривые доза–ответ для агонистической активности неочищенных моноклональных антител к TREM2 человека из супернатантов гибридомы из сборов 3, 4 и 5. Кратность увеличения уровней pSyk в клетках HEK293Т, экспрессирующих TREM2/DAP12 человека, представлена в зависимости от концентрации антител к TREM2 человека. Изотипическое антитело IgG2 человека использовали как контроль.

[28] На **фигурах 2А и 2В** представлены выравнивания последовательностей переменных областей легкой цепи каппа типичных антител к TREM2 к исходным последовательностям зародышевого типа. На **фигуре 2В** представлено продолжение последовательностей из **фигуры 2А**.

[29] На **фигурах 3А и 3В** представлены выравнивания последовательностей переменных областей легкой цепи лямбда типичных антител к TREM2 к исходным последовательностям зародышевого типа. На **фигуре 3В** представлено продолжение последовательностей из **фигуры 3А**.

[30] На **фигурах 4А и 4В** представлены выравнивания последовательностей переменных областей тяжелой цепи типичных антител к TREM2 к исходным последовательностям зародышевого типа. На **фигуре 4В** представлено продолжение последовательностей из **фигуры 4А**.

[31] На **фигуре 5** представлен график сигнала связывания в зависимости от времени кинетического датчика Fc человека (устройство Octet[®] HTX; Pall ForteBio), загруженного антителом 6E7 в момент, обозначенный пунктирной линией ("1^{-й} захват Ab"), Первая сплошная линия обозначает время, в которое нерелевантное антитело IgG2 человека было добавлено к датчику для уменьшения неспецифического связывания ("блокирование датчика с помощью G2"). Вторая сплошная линия обозначает время, в которое целевой антиген (растворимый TREM2 человека) был добавлен к датчику для взаимодействия с захваченным антителом 6E7. Последняя сплошная линия указывает время, в которое сэндвич–антитело (5E3, 6E7 или контрольное антитело IgG2) было добавлено к датчику. При добавлении антитела 5E3 наблюдалось увеличение связывания, что свидетельствует о том, что антитело 5E3 связывается с эпитопом TREM2 человека, отличным от эпитопа, связанного антителом 6E7.

[32] На **фигуре 6** изображена кривая доза–ответ для агонистической активности моноклональных антител к TREM2 человека (4C5, 4G10, 5E3, 6E7, 10E3, 13E7, 24G6,

16B8, 25F12, 26F2, 32E3 и 33B12) в дифференцированных клетках THP-1. Кратность увеличения уровней фосфорилированного Syk (pSyk) по сравнению с исходным уровнем представлена в зависимости от концентрации антител к TREM2 человека. Антитела к IgG2 (HuIgG) человека и изотипические IgG2b (RtIgG) крысы использовали как контроли. Агонистическая активность коммерчески доступного антитела крысы/мыши к TREM2 человека (mAb17291; "RnD") включена для сравнения.

[33] На **фигуре 7** показаны кривые доза-ответ для агонистической активности очищенных антител к TREM2 человека 6E7 и 5E3 в формате IgG2 ("G2"), IgG1 ("G1") или агликозилированного IgG1 ("SEFL2"). Кратное увеличение уровней фосфорилированного Syk (pSyk) по сравнению с соответствующим изотипическим контролем в клетках HEK293T, экспрессирующих TREM2/DAP12 человека, нанесено на график в зависимости от концентрации антител к TREM2 человека. Преобразование антител 6E7 и 5E3 из изотипа IgG2 в изотип IgG1 приводит к частичной потере агонистической активности.

[34] На **фигуре 8A** представлена гистограмма количества макрофагов, полученных из костного мозга (BMDM), полученных из мышей дикого типа ($TREM^{+/+}$) и мышей $TREM2^{-/-}$ в разные дни культивирования в ограничивающих условиях CSF-1. В таких условиях культивирования клетки BMDM $TREM2^{-/-}$ демонстрируют дефект выживаемости.

[35] На **фигуре 8B** представлена гистограмма процента слияния клеток микроглии взрослой мыши, полученных из мышей дикого типа ($TREM^{+/+}$) и мышей $TREM2^{-/-}$ в разные моменты времени в культуре в ограничивающих условиях CSF-1. В таких условиях у клеток микроглии взрослых мышей $TREM2^{-/-}$ культивирования обнаружен дефект выживаемости.

[36] На **фигуре 8C** представлена гистограмма процента слияния клеток микроглии новорожденной мыши, полученных из мышей дикого типа ($TREM^{+/+}$) и мышей $TREM2^{-/-}$ в разные моменты времени в культуре в ограничивающих условиях CSF-1. Микроглия новорожденных $TREM2^{-/-}$ проявляет дефект выживаемости с течением времени.

[37] На **фигуре 8D** представлена гистограмма количества BMDM, полученных из мышей дикого типа ($TREM^{+/+}$) и мышей $TREM2^{R47H}$ в разные дни культивирования в ограничивающих условиях CSF-1. В таких условиях культивирования клетки BMDM мыши $TREM2^{R47H}$ демонстрируют дефект выживаемости.

[38] На **фигуре 8E** представлена гистограмма процента слияния клеток микроглии взрослой мыши, полученных из мышей дикого типа ($TREM^{+/+}$) и мышей $TREM2^{R47H}$ в разные моменты времени в культуре в ограничивающих условиях CSF-1. В таких условиях культивирования у клеток микроглии взрослых мышей $TREM2^{R47H}$ обнаружен дефект выживаемости.

[39] На **фигуре 8F** представлена гистограмма процента слияния клеток микроглии новорожденной мыши, полученных из мышей дикого типа ($TREM^{+/+}$) и мышей $TREM2^{R47H}$ в разные моменты времени в культуре в ограничивающих условиях CSF-1. Клетки микроглии новорожденных $TREM2^{R47H}$ проявляет дефект выживаемости, который

увеличивается с течением времени.

[40] На **фигуре 9А** представлен вестерн-блот клеточных лизатов из клеток BMDM $TREM2^{R47H}$ и дикого типа ($TREM2^{+/+}$), обработанных с помощью антитела к TREM2 или изотипического контроля. Антитело к TREM2 активирует передачу сигналов TREM2/DAP12 в обоих типах макрофагов, на что указывает увеличение уровней pSyk.

[41] На **фигуре 9В** представлен вестерн-блот клеточных лизатов из клеток BMDM $TREM2^{-/-}$ и дикого типа ($TREM2^{+/+}$), обработанных с помощью антитела к TREM2 или изотипического контроля. Антитело к TREM2 не повышает уровни pSyk в BMDM $TREM2^{-/-}$, что подтверждает то, что такой эффект специфичен для TREM2.

[42] На **фигуре 10А** представлен график, отображающий процент слияния клеток с течением времени для BMDM $TREM2^{R47H}$, обработанных с помощью изотипического контрольного антитела или антитела-агониста TREM2, как измерено с помощью анализа слияния клеток в реальном времени. Данные представлены в виде среднего $\pm$ s.d. и взяты из одного репрезентативного эксперимента. Эксперимент проводили дважды независимо ($n=2$ и анализировали трижды).

[43] На **фигуре 10В** представлен график, отображающий процент слияния клеток с течением времени для BMDM дикого типа ($TREM2^{+/+}$), обработанных с помощью изотипического контрольного антитела или антитела-агониста TREM2, как измерено с помощью анализа слияния клеток в реальном времени. Данные представлены в виде среднего $\pm$ s.d. и взяты из одного репрезентативного эксперимента. Эксперимент проводили дважды независимо ($n=2$ и анализировали трижды).

[44] На **фигуре 10С** представлена гистограмма, отображающая жизнеспособность клеток, измеренную с помощью анализа выявления АТФ CellTiter Glo для BMDM $TREM2^{R47H}$ и $TREM2^{+/-}$, обработанных носителем, изотипическим контролем или антителом-агонистом к TREM2 в течение 14 дней.

[45] На **фигуре 10D** представлена гистограмма, отображающая процент слияния клеток в определенное время в культуре для клеток микроглии взрослой мыши $TREM2^{R47H}$, обработанных изотипическим контрольным антителом или антителом-агонистом TREM2. Увеличение выживаемости клеток микроглии $TREM2^{R47H}$ наблюдается при обработке с помощью антитела-агониста TREM2.

[46] На **фигуре 10Е** представлен график, отображающий процент слияния клеток во времени для BMDM, собранных у пожилых (18-месячных) мышей дикого типа ($TREM2^{+/+}$) ($n=3$ животных), которых обрабатывали с помощью изотипического контрольного антитела или антитела-агониста TREM2 по настоящему изобретению (далее называемое "антитело 2"), как измерено с помощью анализа слияния клеток в реальном времени. Данные представлены в виде среднего $\pm$ s.d. и взяты из одного репрезентативного эксперимента. **** $p < 0,0001$, 2-факторный ANOVA с поправкой Сидака для множественных сравнений. На **фигуре 10F** представлен график, отображающий процент слияния клеток с течением времени для BMDM, собранных у пожилых (18-месячных) мышей $TREM2^{R47H}$ ($n=3$ животных, исключение – контрольные,

подобранные по возрасту однопометные животные дикого типа для образцов дня 6 в эксперименте с нокаутом), обработанных с помощью изотипического контрольного антитела или антитела–агониста TREM2 (антитело 2), как измерено с помощью анализа слияния клеток в реальном времени. Данные представлены в виде среднего $\pm$ s.d. и взяты из одного репрезентативного эксперимента. **** $p < 0,0001$, 2–факторный ANOVA с поправкой Сидака для множественных сравнений. Увеличение выживаемости макрофагов дикого типа и TREM2^{R47H} наблюдается при обработке с помощью антитела–агониста TREM2.

[47] На **фигуре 11A** представлен график, отображающий процент слияния клеток с течением времени в культуральном компартменте в анализе миграции для BMDM дикого типа (TREM2^{+/+}), обработанных с помощью изотипического контрольного антитела или антитела–агониста TREM2 (антитело 1), как измерено с помощью анализа слияния клеток в реальном времени. В данном анализе антитело–агонист TREM2 оказывало минимальные эффекты в отношении миграции BMDM дикого типа.

[48] На **фигуре 11B** представлен график, отображающий процент слияния клеток с течением времени в культуральном компартменте в анализе миграции для BMDM TREM2^{R47H}, обработанных с помощью изотипического контрольного антитела или антитела–агониста TREM2 (антитело 1), как измерено с помощью анализа слияния клеток в реальном времени. В данном анализе антитело–агонист TREM2 приводило к небольшому, но статистически значимому снижению миграции BMDM TREM2^{R47H}.

[49] На **фигуре 11C** представлен график, отображающий процент слияния клеток с течением времени в культуральном компартменте в анализе миграции для BMDM TREM2^{-/-}, обработанных с помощью изотипического контрольного антитела или антитела–агониста TREM2 (антитело 1), как измерено с помощью анализа слияния клеток в реальном времени. В данном анализе антитело–агонист TREM2 не оказывало эффект в отношении миграции BMDM TREM2^{-/-}.

[50] На **фигуре 11D и фигуре 11E** представлены графики, отображающие процент слияния клеток во времени в культуральном компартменте в анализе миграции для BMDM дикого типа (TREM2^{+/+}) и TREM2^{R47H}, соответственно, обработанных с помощью изотипического контрольного антитела или антитела–агониста TREM2 (антитело 2), как измерено с помощью анализа слияния клеток в реальном времени. В данном анализе обработка с помощью антитела–агониста TREM2 не оказывает эффект в отношении миграции BMDM дикого типа и TREM2^{R47H}.

[51] На **фигуре 12A** показана дифференциальная регуляция транскриптов CDC20, как измерено с помощью qPCR, в макрофагах дикого типа (TREM2^{+/+}), TREM2^{R47H} и TREM2^{-/-} в день 5 и день 6.

[52] На **фигуре 12B** показана дифференциальная регуляция транскриптов PKB, как измерено с помощью qPCR, в макрофагах дикого типа (TREM2^{+/+}), TREM2^{R47H} и TREM2^{-/-} в день 5 и день 6.

[53] На **фигуре 12C** показана дифференциальная регуляция транскриптов NDC80,

как измерено с помощью qPCR, в макрофагах дикого типа (TREM2^{+/+}), TREM2^{R47H} и TREM2^{-/-} в день 5 и день 6.

[54] На **фигуре 12D** показана дифференциальная регуляция транскриптов CCR2, как измерено с помощью qPCR, в макрофагах дикого типа (TREM2^{+/+}), TREM2^{R47H} и TREM2^{-/-} в день 5 и день 6.

[55] На **фигуре 13A** показана дифференциальная регуляция транскриптов AroE, как измерено с помощью qPCR, в макрофагах дикого типа (TREM2^{+/+}), гетерозиготных (TREM2^{+/-}) и нокаутных (TREM2^{-/-}) макрофагах в разные моменты времени в культуре. Все уровни экспрессии генов нормализованы для контрольных макрофагов дикого типа в день 4 культивирования.

[56] На **фигуре 13B** показана дифференциальная регуляция транскриптов AroE, как измерено с помощью qPCR, в макрофагах дикого типа (TREM2^{+/+}), R47H гетерозиготных (TREM2^{R47H/+}) и R47H гомозиготных (TREM2^{R47H}) макрофагах в разные моменты времени в культуре. Все уровни экспрессии генов нормализованы для контрольных макрофагов дикого типа в день 4 культивирования.

[57] На **фигуре 13C** показана дифференциальная регуляция транскриптов IL-1a, как измерено с помощью qPCR, в макрофагах дикого типа (TREM2^{+/+}), гетерозиготных (TREM2^{+/-}) и нокаутных (TREM2^{-/-}) макрофагах в разные моменты времени в культуре. Все уровни экспрессии генов нормализованы для контрольных макрофагов дикого типа в день 4 культивирования.

[58] На **фигуре 13D** показана дифференциальная регуляция транскриптов IL-1a, как измерено с помощью qPCR, в макрофагах дикого типа (TREM2^{+/+}), R47H гетерозиготных (TREM2^{R47H/+}) и R47H гомозиготных (TREM2^{R47H}) макрофагах в разные моменты времени в культуре. Все уровни экспрессии генов нормализованы для контрольных макрофагов дикого типа в день 4 культивирования.

[59] На **фигуре 13E** показана дифференциальная регуляция транскриптов CX3CR1, как измерено с помощью qPCR, в макрофагах дикого типа (TREM2^{+/+}), гетерозиготных (TREM2^{+/-}) и нокаутных (TREM2^{-/-}) макрофагах в разные моменты времени в культуре. Все уровни экспрессии генов нормализованы для контрольных макрофагов дикого типа в день 4 культивирования.

[60] На **фигуре 13F** показана дифференциальная регуляция транскриптов CX3CR1, как измерено с помощью qPCR, в макрофагах дикого типа (TREM2^{+/+}), R47H гетерозиготных (TREM2^{R47H/+}) и R47H гомозиготных (TREM2^{R47H}) макрофагах в разные моменты времени в культуре. Все уровни экспрессии генов нормализованы для контрольных макрофагов дикого типа в день 4 культивирования.

[61] На **фигуре 13G** показана дифференциальная регуляция транскриптов FLT1, как измерено с помощью qPCR, в макрофагах дикого типа (TREM2^{+/+}), гетерозиготных (TREM2^{+/-}) и нокаутных (TREM2^{-/-}) макрофагах в разные моменты времени в культуре. Все уровни экспрессии генов нормализованы для контрольных макрофагов дикого типа в день 4 культивирования.

[62] На **фигуре 13H** показана дифференциальная регуляция транскриптов FLT1, как измерено с помощью qPCR, в макрофагах дикого типа ($TREM2^{+/+}$), R47H гетерозиготных ($TREM2^{R47H/+}$) и R47H гомозиготных ($TREM2^{R47H}$) макрофагах в разные моменты времени в культуре. Все уровни экспрессии генов нормализованы для контрольных макрофагов дикого типа в день 4 культивирования.

[63] На **фигурах 13I и 13J** показана дифференциальная регуляция транскриптов C1qa, как измерено с помощью qPCR, в макрофагах дикого типа ($TREM2^{+/+}$), R47H гетерозиготных ($TREM2^{R47H/+}$) и R47H гомозиготных ($TREM2^{R47H}$) макрофагах в разные моменты времени в культуре. Все уровни экспрессии генов нормализованы для контрольных макрофагов дикого типа в день 4 культивирования.

[64] На **фигурах 13K и 13L** показана дифференциальная регуляция транскриптов Ccl5, как измерено с помощью qPCR, в макрофагах дикого типа ($TREM2^{+/+}$), R47H гетерозиготных ($TREM2^{R47H/+}$ и $TREM2^{+/+}$) и R47H гомозиготных ($TREM2^{R47H}$ и $TREM2^{-/-}$) макрофагах в разные моменты времени в культуре. Все уровни экспрессии генов нормализованы для контрольных макрофагов дикого типа в день 4 культивирования.

[65] На **фигурах 13M и 13N** показана дифференциальная регуляция транскриптов Ccl22, как измерено с помощью qPCR, в макрофагах дикого типа ($TREM2^{+/+}$), R47H гетерозиготных ($TREM2^{R47H/+}$ и $TREM2^{+/+}$) и R47H гомозиготных ($TREM2^{R47H}$ и $TREM2^{-/-}$) макрофагах в разные моменты времени в культуре. Все уровни экспрессии генов нормализованы для контрольных макрофагов дикого типа в день 4 культивирования.

[66] На **фигурах 13O и 13P** показана дифференциальная регуляция транскриптов C3, как измерено с помощью qPCR, в макрофагах дикого типа ($TREM2^{+/+}$), R47H гетерозиготных ($TREM2^{R47H/+}$ и $TREM2^{+/+}$) и R47H гомозиготных ($TREM2^{R47H}$ и $TREM2^{-/-}$) макрофагах в разные моменты времени в культуре. Все уровни экспрессии генов нормализованы для контрольных макрофагов дикого типа в день 4 культивирования.

[67] На **фигуре 14A** представлен график, отображающий процент слияния клеток с течением времени в культуральном компартменте в анализе миграции для BMDM дикого типа ($TREM2^{+/+}$) и нокаутных ($TREM2^{-/-}$), как измерено с помощью анализа слияния клеток в реальном времени. Макрофаги, нокаутированные по TREM2, проявляют дефект миграции по сравнению с макрофагами дикого типа в таком анализе *in vitro*.

[68] На **фигуре 14B** представлен график, отображающий процент слияния клеток с течением времени в культуральном компартменте в анализе миграции для BMDM дикого типа ($TREM2^{+/+}$) и $TREM2^{R47H}$, как измерено с помощью анализа слияния клеток в реальном времени. Макрофаги $TREM2^{R47H}$ проявляют дефект миграции по сравнению с макрофагами дикого типа в данном анализе *in vitro*.

[69] На **фигуре 15A** показано снижение уровней секретируемого белка CCL2 из макрофагов $TREM2^{R47H}$ и $TREM2^{-/-}$ по сравнению с макрофагами дикого типа ($TREM2^{+/+}$),

как измерено с помощью ELISA.

[70] На **фигуре 15B** показаны уровни секретируемого белка CCL2, измеренные с помощью ELISA из макрофагов TREM2^{R47H} и макрофагов TREM2^{+/+} дикого типа, обработанных с помощью антитела–агониста TREM2 или изотипического контроля. Обработка антителом–агонистом к TREM2 восстанавливает уровни секретируемого белка CCL2 из макрофагов TREM2^{R47H}.

[71] На **фигуре 16A** показаны результаты анализа пути генов, регулируемых посредством обработки антителом–агонистом к TREM2 в макрофагах TREM2^{R47H}. Модулированные гены предусматривают гены, участвующие в регуляции миграции, пролиферации, клеточного цикла и выживаемости миелоидных клеток.

[72] На **фигуре 16B** показан анализ RNA–Seq, в котором сравнивают макрофаги дикого типа (TREM2^{+/+}), нокаутные (TREM2^{-/-}) и TREM2^{R47H} в день 7 в ограничивающих условиях CSF–1. Анализы пути (WGCNA) выявили 5 модулей/генных сетей, которые дифференцированно регулируются в нокаутном состоянии и макрофагах TREM2^{R47H} по сравнению с макрофагами дикого типа. Результаты указывают на роль TREM2 в клеточном цикле/пролиферации и выживаемости, иммунном ответе и миграции, а также гомеостазе липидов и холестерина.

[73] На **фигуре 16C** показана дифференциальная регуляция транскриптов UBE2C, MELK и MMP14, как измерено с помощью qPCR, в макрофагах дикого типа (TREM2^{+/+}) и TREM2^{R47H}, обработанных антителом–агонистом TREM2 (антитело 1) или изотипическим контролем. Данные показывают, что экспрессия фермента MMP14 повышается, в то время как экспрессия ферментов UBE2C и MELK подавляется в макрофагах R47H, однако изменения могут быть восстановлены путем обработки с помощью антитела–агониста TREM2.

[74] На **фигуре 17** показано, что обработка антителами увеличивает экспрессию гомеостатических генов клеток микроглии (P2gy12, Tmem119) в клетках микроглии WT и R47H KI, только клетках микроглии WT и только клетках микроглии R47H KI (A, B и C). Также обработка с помощью антител снижает экспрессию провоспалительных хемокинов и цитокинов, таких как Ccl3, Ccl4, Ccl5, Il12b (D, E и F). Все статистические данные представляют ранговое множество Уилкоксона. Выражение $\ln(\text{количество}+1)$.

[75] На **фигуре 18** показано, что популяция инфильтрата микроглии характеризуется повышенной экспрессией миелоидных и воспалительных генов и немного более низкой экспрессией гомеостатических генов микроглии (A и B), и что введение антитела к Trem2 уменьшало уровни провоспалительных хемокинов и цитокинов в клетках инфильтрата микроглии из мышей WT и R47H KI, только мышей WT и только мышей R47H KI (C, D и E). Все статистические данные представляют ранговое множество Уилкоксона. Выражение $\ln(\text{количество}+1)$ с учетом количества *umi*.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[76] Настоящее изобретение относится к выделенным антигенсвязывающим белкам, которые специфически связываются с TREM2, в частности с TREM2 человека. У

людей ген TREM2 расположен в кластере генов TREM в хромосоме 6p21.1. Кластер генов TREM кодирует четыре белка TREM (TREM1, TREM2, TREM4 и TREM5), а также два TREM-подобных белка (TLT-1 и TLT-2). Ген TREM2 кодирует белок из 230 аминокислот, состоящий из внеклеточного домена, трансмембранной области и короткого цитоплазматического хвоста (Paradowska-Gorycka et al., Human Immunology, Vol. 74: 730–737, 2013). Внеклеточный домен содержит один домен суперсемейства Ig типа V с тремя потенциальными сайтами N-гликозилирования. Аминокислотная человеческая последовательность TREM2 дикого типа (эталонная последовательность NCBI: NP_061838.1) представлена ниже как SEQ ID NO: 1.

```

1
MEPLRLILLFVTELSGAHNTTVFQGVAGQSLQVSCPYDSMKHWGRRKAWCRQLGEK
GPC 60
61
QRRVSTHNLWLLSFLRRWNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGLYQCQSLHGSEAD
T 120
121
LRKVLVEVLADPLDHRDAGDLWFPGESESFEDAHVEHSISRSLLEGEIPFPPTSILLLLA
180
181    CIFLIKILAASALWAAAWHGQKPGTHPPSELDCGHDPGYQLQTLPLGLRDT
230

```

[77] Аминокислоты 1–18 человеческого белка TREM2 дикого типа (SEQ ID NO: 1) являются сигнальным пептидом, который обычно удаляется из зрелого белка. Зрелый белок TREM2 человека содержит внеклеточный домен из аминокислот 19–174 SEQ ID NO: 1, трансмембранный домен из аминокислот 175–195 SEQ ID NO: 1 и цитоплазматический домен из аминокислот 196–230 SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность внеклеточного домена (в том числе сигнальный пептид) TREM2 человека представлена ниже под SEQ ID NO: 2.

```

1
MEPLRLILLFVTELSGAHNTTVFQGVAGQSLQVSCPYDSMKHWGRRKAWCRQLGEK
GPC 60
61
QRRVSTHNLWLLSFLRRWNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGLYQCQSLHGSEAD
T 120
121
LRKVLVEVLADPLDHRDAGDLWFPGESESFEDAHVEHSISRSLLEGEIPFPPTS 174

```

[78] Термин "триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках-2 человека" или "TREM2 человека" может относиться к полипептиду под SEQ ID NO: 1, полипептиду под SEQ ID NO: 2, полипептидам под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 минус сигнальный пептид (аминокислоты 1–18), аллельные варианты TREM2 человека или сплайс-варианты TREM2 человека. В некоторых вариантах осуществления термин

"TREM2 человека" включает встречающиеся в природе варианты TREM2, такие как мутации R47H, Q33X (X является стоп-кодоном), Y38C, T66M, D87N, H157Y, R98W и S116C.

[79] Поскольку цитоплазматический домен TREM2 не обладает сигнальной способностью, то он должен взаимодействовать с другими белками для трансдукции TREM2-активирующих сигналов. Одним из таких белков является DNAX-активирующий белок размером 12 кДа (DAP12). DAP12 также известен как белок, связывающий рецептор, который активирует клетки-киллеры (KARAP), и белок, связывающий тирозинкиназы (TYROBP). DAP12 является трансмембранным адаптерным белком типа I, который содержит мотив ITAM в его цитоплазматическом домене. Мотив ITAM обеспечивает распространение сигнала путем активации тирозинкиназ ZAP70 и Syk, которые в свою очередь активируют несколько нисходящих сигнальных каскадов, в том числе PI3K, PKC, ERK, и повышение внутриклеточного кальция (Colonna, *Nature Reviews Immunology*, Vol. 3: 445–453, 2003; Ulrich and Holtzman, *ACS Chem. Neurosci.*, Vol. 7: 420–427, 2016). DAP12 и TREM2 связываются посредством их трансмембранных доменов; заряженный остаток лизина в трансмембранном домене TREM2 взаимодействует с заряженным остатком аспарагиновой кислоты в трансмембранном домене DAP12.

[80] DAP12 человека кодируется геном TYROBP, расположенным на хромосоме 19q13.1. Белок человека имеет длину 113 аминокислот и содержит лидерную последовательность (аминокислоты 1–27 из SEQ ID NO: 3), короткий внеклеточный домен (аминокислоты 28–41 из SEQ ID NO: 3), трансмембранный домен (аминокислоты 42–65 из SEQ ID NO: 3) и цитоплазматический домен (аминокислоты 66–113 из SEQ ID NO: 3) (Paradowska-Gorycka et al., *Human Immunology*, Vol. 74: 730–737, 2013). DAP12 образует гомодимер с помощью двух остатков цистеина в коротком внеклеточном домене. Аминокислотная последовательность DAP12 человека дикого типа (эталонная последовательность NCBI: NP_003323.1) представлена ниже как SEQ ID NO: 3.

1

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIAL
A 60

61

VYFLGRLVPRGRGAEEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK 113

[81] Термин "DAP12 человека" может относиться к полипептиду под SEQ ID NO: 3, полипептиду под SEQ ID NO: 3 минус лидерный пептид (аминокислоты 1–27), аллельные варианты DAP12 человека или сплайс-варианты DAP12 человека.

[82] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенным антигенсвязывающим белкам, которые специфически связываются с TREM2 человека. Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающий белок" относится к белку, который специфически связывается с одним или более целевыми антигенами. Антигенсвязывающий белок обычно содержит антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с антигеном, и необязательно остов или

часть каркаса, что дает возможность антигенсвязывающему фрагменту принимать конформацию, которая способствует связыванию антигенсвязывающего белка с антигеном. "Антигенсвязывающий фрагмент", используемый в данном документе взаимозаменяемо со "связывающим фрагментом" или "фрагментом", представляет собой часть антитела, в которой отсутствуют по меньшей мере некоторые аминокислоты, присутствующие в полноразмерной тяжелой цепи и/или легкой цепи, но которая все еще способна специфически связываться с антигеном. Антигенсвязывающий фрагмент включает без ограничения одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), нанотело (например, домен VH тяжелой цепи антител верблюда; фрагмент VHH, см. Cortez–Retamozo et al., *Cancer Research*, Vol. 64:2853–57, 2004), фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fv, фрагмент Fd и фрагмент определяющей комплементарности области (CDR), и может быть получен из любого млекопитающего, такого как человек, мышь, крыса, кролик или верблюды. Антигенсвязывающие фрагменты могут конкурировать за связывание целевого антигена с интактным антителом, и фрагменты могут быть получены путем модификации интактных антител (например, путем ферментативного или химического расщепления) или синтеза *de novo* с применением технологий рекомбинантной ДНК или синтеза пептидов. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну CDR из антитела, которое связывается с антигеном, например, CDR3 из тяжелой цепи антитела, которое связывается с антигеном. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит все три CDR из тяжелой цепи антитела, которое связывается с антигеном, или все три CDR из легкой цепи антитела, которое связывается с антигеном. В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит все шесть CDR из антитела, которое связывается с антигеном (три из тяжелой цепи и три из легкой цепи). В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой антитело или его связывающий фрагмент.

[83] Антигенсвязывающий белок также может предусматривать белок, содержащий один или более антигенсвязывающих фрагментов, включенных в одну полипептидную цепь или в несколько полипептидных цепей. Например, антигенсвязывающие белки могут включать без ограничения диатело (см., например, EP 404097; WO 93/11161 и Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 90:6444–6448, 1993); интратело; доменное антитело (одиночный домен VL или VH или два или больше доменов VH, соединенных с помощью пептидного линкера; см. Ward et al., *Nature*, Vol. 341:544–546, 1989); макситело (2 scFv, слитых с Fc–областью, см. Fredericks et al., *Protein Engineering, Design & Selection*, Vol. 17:95–106, 2004 и Powers et al., *Journal of Immunological Methods*, Vol. 251:123–135, 2001); триатело; тетратело; минитело (scFv, слитый с доменом CH3; см. Olafsen et al., *Protein Eng Des Sel.*, Vol. 17:315–23, 2004); пептитело (один или более пептидов, присоединенных к Fc–области, см. WO 00/24782); линейное антитело (пара тандемных сегментов Fd (VH–CH1–VH–CH1), которые совместно с комплементарными полипептидами легких цепей образуют пару антигенсвязывающих областей, см. Zapata et al., *Protein Eng.*, Vol. 8:1057–

1062, 1995); иммунофармацевтические средства на основе модульного белка небольшого размера (см. публикацию патента США № 20030133939); и слитые белки иммуноглобулины (например, IgG–scFv, IgG–Fab, 2scFv–IgG, 4scFv–IgG, VH–IgG, IgG–VH и Fab–scFv–Fc; см., например, Spiess et al., Mol. Immunol., Vol. 67(2 Pt A):95–106, 2015).

[84] Термин "выделенная молекула" (где молекула представляет собой, например, полипептид, полинуклеотид, антигенсвязывающий белок или антитело) представляет собой молекулу, которая в силу своего происхождения или источника деривации (1) не связана с ассоциированными естественным путем компонентами, которые сопровождают ее в ее природном состоянии, (2) фактически не содержит других молекул того же вида, (3) экспрессируется клеткой другого вида или (4) не встречается в природе. Таким образом, молекула, которая химически синтезирована или экспрессируется в клеточной системе, отличной от клетки, из которой она происходит естественным путем, будет считаться "выделенной" из ее ассоциированных естественным путем компонентов. Молекулу также можно сделать практически свободной от природных компонентов путем выделения с применением методов очистки, хорошо известных из уровня техники. Чистоту или гомогенность молекулы можно оценивать с помощью ряда средств, хорошо известных из уровня техники. Например, чистоту образца полипептида можно оценивать с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и окрашивания геля для визуализации полипептида с применением методик, хорошо известных из уровня техники. Для определенных целей более высокую разрешающую способность можно обеспечивать с применением HPLC или других средств для очистки, хорошо известных из уровня техники.

[85] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающие белки специфически связываются с TREM2 человека. Антигенсвязывающий белок "специфически связывается" с целевым антигеном, в случае если он обладает значительно более высокой аффинностью связывания, а следовательно способен различать этот антиген, по сравнению с его аффинностью к другим неродственным белкам в аналогичных условиях анализа связывания. Антигенсвязывающие белки, которые специфически связывают антиген, могут характеризоваться равновесной константой диссоциации (K_D) $\leq 1 \times 10^{-6}$ М. Антигенсвязывающий белок специфически связывает антиген с "высокой аффинностью", в случае если K_D составляет $\leq 1 \times 10^{-8}$ М. В одном варианте осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению связываются с TREM2 человека с $K_D \leq 5 \times 10^{-7}$ М. В другом варианте осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению связываются с TREM2 человека с $K_D \leq 1 \times 10^{-7}$ М. В еще одном варианте осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению связываются с TREM2 человека с $K_D \leq 5 \times 10^{-8}$ М. В другом варианте осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению связываются с TREM2 человека с $K_D \leq 1 \times 10^{-8}$ М. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки

по настоящему изобретению связываются с TREM2 человека с $K_D \leq 5 \times 10^{-9}$ М. В других вариантах антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению связываются с TREM2 человека с $K_D \leq 1 \times 10^{-9}$ М. В одном конкретном варианте осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению связываются с TREM2 человека с $K_D \leq 5 \times 10^{-10}$ М. В другом конкретном варианте осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению связываются с TREM2 человека с $K_D \leq 1 \times 10^{-10}$ М.

[86] Аффинность определяют с применением различных методик, примером которых является анализ аффинности ELISA. В различных вариантах осуществления аффинность определяют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (например, анализ на основе BIAcore®). С помощью данной методологии можно измерить константу скорости ассоциации (k_a в $M^{-1}s^{-1}$) и константу скорости диссоциации (k_d в s^{-1}). Равновесную константу диссоциации (K_D в М) можно затем рассчитать из отношения кинетических констант скорости (k_d/k_a). В некоторых вариантах осуществления аффинность определяют посредством кинетического способа, такого как анализ кинетического исключения (KinExA), как описано в Rathanaswami et al. *Analytical Biochemistry*, Vol. 373:52–60, 2008. С помощью анализа KinExA можно измерять равновесную константу диссоциации (K_D в М) и константу скорости ассоциации (k_a в $M^{-1}s^{-1}$). Константа скорости диссоциации (k_d в s^{-1}) может быть вычислена из этих значений ($K_D \times k_a$). В других вариантах осуществления аффинность определяют с помощью способа интерферометрии биослоя, такого как описанный в Kumaraswamy et al., *Methods Mol. Biol.*, Vol. 1278:165–82, 2015 и используемый в системах Octet® (Pall ForteBio). Кинетические (k_a и k_d) и константы аффинности (K_D) могут быть рассчитаны в режиме реального времени с помощью способа интерферометрии биослоя. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, проявляют требуемые характеристики, такие как авидность связывания, как измерено с помощью k_d (константа скорости диссоциации) для TREM2 человека, составляющей приблизительно 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} s^{-1} или ниже (более низкие значения указывают на более высокую авидность связывания) и/или аффинность связывания, измеренную с помощью K_D (равновесная константа диссоциации) для TREM2 человека, составляющей приблизительно 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} М или ниже (более низкие значения указывают на более высокую аффинность связывания).

[87] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению специфически связываются с TREM2 человека с K_D , составляющей от приблизительно 1 пМ до приблизительно 100 нМ, как измерено с помощью интерферометрии биослоя при 25°C. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению специфически связываются с TREM2 человека с K_D , составляющей меньше чем 100 нМ, как измерено с помощью интерферометрии биослоя при 25°C. В других вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению специфически связываются с TREM2 человека с K_D , составляющей меньше чем 50 нМ, как измерено с помощью

интерферометрии биослая при 25°C. В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению специфически связываются с TREM2 человека с K_D , составляющей меньше чем 25 нМ, как измерено с помощью интерферометрии биослая при 25°C. В одном конкретном варианте осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению специфически связываются с TREM2 человека с K_D , составляющей меньше чем 10 нМ, как измерено с помощью интерферометрии биослая при 25°C. В другом конкретном варианте осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению специфически связываются с TREM2 человека с K_D , составляющей меньше чем 5 нМ, как измерено с помощью интерферометрии биослая при 25°C. В другом конкретном варианте осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению специфически связываются с TREM2 человека с K_D , составляющей меньше чем 1 нМ, как измерено с помощью интерферометрии биослая при 25°C.

[88] Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению могут в некоторых вариантах связываться с конкретной областью или эпитопом TREM2 человека. Используемый в данном документе термин "эпитоп" относится к любой детерминанте, способной специфически связываться с антигенсвязывающим белком, таким как антитело или его фрагмент. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается или взаимодействует с антигенсвязывающим белком, который нацелен на этот антиген, и в случае если антиген представляет собой белок, – включает в себя специфические аминокислоты, которые непосредственно связываются или взаимодействуют с антигенсвязывающим белком. Эпитоп может быть образован как смежными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, расположенными рядом благодаря сворачиванию белка в третичную структуру. "Линейный эпитоп" представляет собой эпитоп, где первичная аминокислотная последовательность образует распознаваемый эпитоп. Линейный эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3 или 4 аминокислоты, и более часто по меньшей мере 5, по меньшей мере 6 или по меньшей мере 7 аминокислот, например, от приблизительно 8 до приблизительно 10 аминокислот в уникальной последовательности. "Конформационный эпитоп", в отличие от линейного эпитопа, представляет собой группу прерывистых аминокислот (например, в полипептиде аминокислотные остатки, которые не являются смежными в первичной последовательности полипептида, но являются таковыми в контексте третичной и четвертичной структуры, достаточно близки друг к другу, чтобы быть связанными антигенсвязывающим белком). Эпитопные детерминанты могут включать в себя химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные или сульфонильные группы, и могут иметь специфические характеристики трехмерной структуры и/или специфические характеристики заряда. В целом, как правило, антигенсвязывающие белки, специфические в отношении конкретной целевой молекулы, предпочтительно распознают эпитоп на целевой молекуле в сложной смеси из белков и/или макромолекул. В некоторых

вариантах осуществления антигенсвязывающие белки связываются с TREM2 человека в эпитопе внутри внеклеточного домена TREM2 человека (SEQ ID NO: 2). В связанных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки связываются с TREM2 человека посредством эпитопа в аминокислотах 19–174 из SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки связываются с TREM2 человека посредством эпитопа в аминокислотах 23–128 из SEQ ID NO: 1.

[89] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению специфически не связываются с TREM1 человека. Как и TREM2, TREM1 является трансмембранным гликопротеином, который экспрессируется на миелоидных клетках и передает сигналы посредством DAP12. Активация передачи сигналов TREM1 приводит к воспалительным эффектам, таким как выработка провоспалительных цитокинов, дегрануляция нейтрофилов и фагоцитоз (Arts et al., *Journal of Leukocyte Biology*, Vol. 93: 209–215, 2013). Как обсуждалось выше, TREM1 кодируется геном TREM1, который расположен в кластере генов TREM вместе с геном TREM2 в хромосоме 6p21.1. Аминокислотная человеческая последовательность TREM1 дикого типа (эталонная последовательность NCBI: NP_061113.1) представлена ниже как SEQ ID NO: 4.

```

1
MRKTRLWGLLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLVDVKCDYTLEKFASSQKAWQII
RD 60
61
GEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRIILEDYNDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPP
K 120
121
EPHMLFDRIRLVVTKGFSGTPGSNENSTQNVYKIPPTTTKALCPLYTSPRTVTQAPPKST
180
181 ADVSTPDSEINLTNVTDIIRVPVFNIVILLAGGFLSKSLVFSVLFAVTLRSFVP
234

```

[90] Термин "TREM1 человека" может относиться к полипептиду под SEQ ID NO: 4, полипептиду под SEQ ID NO: 4 минус сигнальный пептид (аминокислоты 1–20), аллельные варианты TREM1 человека или сплайс-варианты TREM1 человека. Антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению "не связывается специфически" с TREM1 человека, если он имеет эквивалентную или более низкую аффинность связывания с TREM1 человека, как это имеет место с неродственным антигенным белком человека. Антигенсвязывающие белки, которые не связываются специфически с TREM1 человека, могут характеризоваться K_D для TREM1 человека, составляющей $\geq 1 \times 10^{-5}$ М, $\geq 1 \times 10^{-4}$ М или $\geq 1 \times 10^{-3}$ М, как определено с помощью любого из способов для измерения аффинности, описанных в данном документе. Можно считать, что антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению не связывается специфически с TREM1 человека, если антигенсвязывающий белок характеризуется эквивалентным или более низким

связыванием с TREM1 человека по сравнению со связыванием с TREM1 человека изотипического контрольного антитела, измеренным с помощью любого способа, известного из уровня техники, такого как способ связывания FACS, описанный в примере 2.

[91] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению являются антигенсвязывающими белками–агонистами. "Антигенсвязывающий белок–агонист" или "активирующий антигенсвязывающий белок" представляет собой антигенсвязывающий белок (например, антитело), который связывается и индуцирует или усиливает одну или более TREM2–опосредованных функций или активностей. TREM2–опосредованные функции или активности включают без ограничения следующее: фосфорилирование DAP12 (например, фосфорилирование тирозина в мотиве ITAM в цитоплазматическом домене DAP12); фосфорилирование Syk; фосфорилирование/активация Src; активация/фосфорилирование внеклеточной регулируемой киназы (ERK1/2); перемещение активированной фосфатидилинозитол–3–киназы (PI3K) в мембрану; активация протеинкиназы B (PKB, также известная как Akt); активация NF- κ B и NF- κ B–опосредованной транскрипции; активация ядерного фактора транскрипции, опосредованной активированными T–клетками (NFAT); активация протеинкиназы C (PKC); повышение внутриклеточного инозит(1,4,5)–трифосфата (IP3); повышение внутриклеточных уровней кальция; увеличение выживаемости или пролиферации миелоидных клеток, таких как макрофаги, клетки микроглии и дендритные клетки; уменьшение апоптоза миелоидных клеток, таких как макрофаги, клетки микроглии и дендритные клетки; увеличение экспрессии белка CCL2 в макрофагах; уменьшение продуцирования воспалительных цитокинов (например, TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12p70 и IFN- γ) из миелоидных клеток (например, макрофагов) и увеличение фагоцитоза макрофагами и клетками микроглии некротических и/или апоптотических клеток (например, нейрональные клетки), клеточного дебриса и неправильно свернутых пептидов.

[92] Антигенсвязывающие белки–агонисты, связывающие TREM2, по настоящему изобретению способны индуцировать или активировать TREM2–опосредованные функции в отсутствие агрегации, кластеризации и/или Fc–опосредованного перекрестного сшивания антигенсвязывающих белков. Соответственно, *in vitro* агонистическую активность антигенсвязывающих белков можно выявить с применением растворимых (т. е. не связанных с твердой подложкой), мономерных, бивалентных форм антигенсвязывающих белков или антител. *In vivo* агонистическая активность антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению может происходить в отсутствие антигенсвязывающих белков, связывающихся с рецепторами (например, Fc–рецепторами) на соседних клетках с целью кластеризации или агрегации антигенсвязывающего белка. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления агонистическая активность антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе, не зависит от способности антигенсвязывающих белков связываться или

взаимодействовать с Fc-рецепторами. В вариантах осуществления, в которых антигенсвязывающие белки содержат Fc-область (например, антитела), антигенсвязывающие белки сохраняют активность агониста TREM2 без связывания или взаимодействия с рецептором Fcγ, таким как рецептор FcγRIIB. Независимая природа перекрестного сшивания антигенсвязывающих белков-агонистов по настоящему изобретению полезна для терапевтических применений антигенсвязывающих белков, поскольку агонистическая активность антигенсвязывающих белков не будет варьировать в зависимости от экспрессии или доступности рецептора Fcγ в участке терапевтического действия.

[93] Зависимость активности агониста TREM2 от перекрестного сшивания, агрегации и/или кластеризации антигенсвязывающих белков может быть оценена путем измерения активации или индукции любой из TREM2-опосредованных функций, описанных в данном документе, в отсутствие перекрестносшивающего средства. Сшивающее средство может представлять собой любое средство, которое взаимодействует с антигенсвязывающими белками в сайте, отличном от антигенсвязывающего сайта, для кластеризации двух или больше антигенсвязывающих белков вместе. В вариантах осуществления, в которых антигенсвязывающий белок содержит Fc-область (например, антитело), сшивающее средство может представлять собой белок, который связывается с Fc-областью или взаимодействует с ней, такой как белок A, белок G, антитело к Fc или Fcγ-рецептор.

[94] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок-агонист TREM2 по настоящему изобретению увеличивает уровни фосфорилированного Syk (pSyk) в клетках, экспрессирующих белок TREM2 (например, белок TREM2 человека), относительно уровней pSyk в отсутствие антигенсвязывающего белка или относительно уровней pSyk в присутствии контроля. Клетки могут представлять собой клетки миелоидной линии, в том числе без ограничения моноциты, макрофаги, микроглиальные клетки, дендритные клетки, остеокласты, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, мегакарициты и тромбоциты. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 увеличивают уровни pSyk с EC50 меньше чем приблизительно 100 нМ, меньше чем приблизительно 80 нМ, меньше чем приблизительно 60 нМ, меньше чем приблизительно 50 нМ, меньше чем приблизительно 40 нМ, меньше чем приблизительно 30 нМ, меньше чем приблизительно 20 нМ, меньше чем приблизительно 10 нМ, меньше чем приблизительно 5 нМ, меньше чем приблизительно 1 нМ, меньше чем приблизительно 500 пМ, меньше чем приблизительно 300 пМ или меньше чем приблизительно 100 пМ. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 повышают уровни pSyk с EC50 от приблизительно 1 пМ до приблизительно 100 нМ, от приблизительно 10 пМ до приблизительно 50 нМ, от приблизительно 50 пМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 100 пМ до приблизительно 1 нМ или от приблизительно 150 пМ до приблизительно 500 пМ. "EC50" или "полумаксимальная эффективная концентрация"

является мерой активности антигенсвязывающего белка и относится к концентрации антигенсвязывающего белка, необходимой для индукции усредненного ответа между исходным и максимальным ответом после определенного периода воздействия. EC50 любого конкретного агониста можно определить путем построения кривой доза–эффект и изучения эффекта различных концентраций агониста в отношении индуцирования активности в конкретном функциональном анализе (например, уровни pSyk). EC50 представляет собой концентрацию агониста, при которой наблюдается 50% его максимального эффекта. Повышение внутриклеточных уровней pSyk, индуцированных антигенсвязывающими белками–агонистами к TREM2 по настоящему изобретению, можно оценивать различными способами, такими как клеточные анализы, описанные в примерах 2 и 6. Например, клетки, экспрессирующие TREM2 (например, TREM2 человека), вступают в контакт с одной или более концентрациями антигенсвязывающего белка–агониста, клетки лизируют и оценивают уровни pSyk в клеточных лизатах, например, с помощью вестерн–блоттинга, анализа на основе FRET или хемилюминесцентного анализа (например, анализ на основе AlphaLISA). Клетки в клеточном анализе могут представлять собой клетки, такие как клетки HEK293T или клетки CHO, которые рекомбинантно экспрессируют TREM2 (например, TREM2 человека). Как альтернатива, клетки в клеточном анализе представляют собой клетки, которые нативно экспрессируют TREM2 (например, TREM2 человека), такие как клетки THP-1, макрофаги, микроглиальные клетки или дендритные клетки.

[95] В определенных вариантах осуществления активность антигенсвязывающих белков–агонистов TREM2 в отношении индукции или увеличения уровней pSyk в клетке, экспрессирующей TREM2 (например, TREM2 человека), сохраняется в отсутствие перекрестносшивающего средства. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению увеличивают уровни pSyk с EC50 от приблизительно 1 пМ до приблизительно 100 нМ, от приблизительно 10 пМ до приблизительно 50 нМ, от приблизительно 50 пМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 100 пМ до приблизительно 1 нМ или от приблизительно 150 пМ до приблизительно 500 пМ в отсутствие перекрестносшивающего средства, как измерено с помощью клеточного анализа pSyk. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 повышает уровни pSyk с EC50 меньше чем 5 нМ в отсутствие перекрестносшивающего средства, как измерено с помощью клеточного анализа pSyk. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 повышает уровни pSyk с EC50 меньше чем 1 нМ в отсутствие перекрестносшивающего средства, как измерено с помощью клеточного анализа pSyk. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 повышает уровни pSyk с EC50 меньше чем 500 пМ в отсутствие перекрестносшивающего средства, как измерено с помощью клеточного анализа pSyk. В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 повышает уровни pSyk с EC50 меньше чем 300 пМ в отсутствие перекрестносшивающего

средства, как измерено с помощью клеточного анализа pSyk. В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 повышает уровни pSyk с EC50 меньше чем 100 пМ в отсутствие перекрестносшивающего средства, как измерено с помощью клеточного анализа pSyk.

[96] Антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению могут содержать одну или более определяющих комплементарность областей (CDR), из переменных областей легкой и тяжелой цепей антител, которые специфически связываются с TREM2 человека, как описано в данном документе. Термин "CDR" относится к определяющей комплементарность области (также называемой "минимальными распознающими единицами" или "гипервариабельной областью"), в переменных последовательностях антител. Существуют три CDR переменной области тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2 и CDRH3) и три CDR переменной области легкой цепи (CDRL1, CDRL2 и CDRL3). Используемый в данном документе термин "область CDR" относится к группе из трех CDR, которые встречаются в одной переменной области (т. е. три CDR легкой цепи или три CDR тяжелой цепи). CDR в каждой из двух цепей обычно выровнены по каркасным областям (FR) с образованием структуры, которая специфически связывается со специфическим эпитопом или доменом на целевом белке (например, TREM2 человека). Как правило, от N–конца к С–концу встречающиеся в природе переменные области как легкой, так и тяжелой цепей соответствуют следующему порядку этих элементов: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Была разработана система нумерации для присвоения номеров аминокислотам, которые занимают положения в каждом из этих доменов. Данная система нумерации определена в Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 and 1991, NIH, Bethesda, MD) или Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901–917; Chothia et al., 1989, Nature 342:878–883. С помощью данной системы могут быть идентифицированы определяющие комплементарность области (CDR) и каркасные области (FR) данного антитела. Другие системы нумерации аминокислот в цепях иммуноглобулина включают IMGT® (Международная информационная система ImMunoGeneTics; Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 29:185–203; 2005) и АНо (Honegger and Pluckthun, J. Mol. Biol. 309(3):657–670; 2001). Для получения антигенсвязывающего белка одна или более CDR могут быть включены в молекулу либо ковалентно, либо нековалентно.

[97] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению может включать CDR в виде части более длинной полипептидной цепи, может связывать ковалентной связью CDR с другой полипептидной цепью или может соединять CDR нековалентно. Антигенсвязывающие белки могут содержать по меньшей мере одну из CDR, описанных в данном документе, включенных в биосовместимую каркасную структуру. В одном примере биосовместимая каркасная структура содержит полипептид или его часть, достаточные для образования конформационно стабильной структурной опоры, или каркаса, или остова, который способен представлять одну или более последовательностей аминокислот, которые

связываются с антигеном (например, CDR, переменная область и т. д.) в локализованной области поверхности. Такие структуры могут представлять собой встречающийся в природе полипептид или полипептидную "складку" (структурный мотив) или могут иметь одну или более модификаций, таких как добавления, делеции или замены аминокислот, относительно встречающегося в природе полипептида или складки. Эти остовы могут быть получены из полипептида любого вида (или более чем одного вида), такого как человек, другое млекопитающее, другие позвоночные, беспозвоночные, растение, бактерии или вирус.

[98] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, из антитела-агониста TREM2, описанного в данном документе. Вариабельные области легкой цепи и тяжелой цепи и связанные CDR типичных антител к TREM2 человека приведены ниже соответственно в таблицах 1A и 1B.

Таблица 1A. Типичные аминокислотные последовательности переменной области легкой цепи антитела к TREM2 человека

ID Ab	Группа VL	Аминокислотная последовательность VL	CDRL1	CDRL2	CDRL3
12G10	LV-01	QAVPTQPSSLSASPG VLASLTCTLRSGINV GTYRIYWYQQKPGS PPQYLLRYKSDSDK QQGSGVPSRFSGSKD ASANAGILLISGLQS EDEADYYCMIWYSS AVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 46)	TLRSGINVGTY RIY (SEQ ID NO: 5)	YKSDSDKQ QGS (SEQ ID NO: 19)	MIWYSS AVV (SEQ ID NO: 31)
26A10	LV-02	SYELTQPPSVSVSPG QTASITCSGDKLGDK YVCWYQQKPGQSPV LVIYQDSKRPSGIPER FSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEADYYCQ AWDSNTVVFGGGTK LTVL (SEQ ID NO:	SGDKLGDKYV C (SEQ ID NO: 6)	QDSKRPS (SEQ ID NO: 20)	QAWDSN TVV (SEQ ID NO: 32)

		47)			
26C1 0	LV-03	SFELTQPPSVSVSPG QTASITCSGDKLGDK YVCWYQQKPGQSP MLVIYQDTKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLT ISGTQAMDEADYYC QAWDSSTVVFGGGT KLTVL (SEQ ID NO: 48)	SGDKLGDKYV C (SEQ ID NO: 6)	QDTKRPS (SEQ ID NO: 21)	QAWDSS TVV (SEQ ID NO: 33)
26F2	LV-04	SYELTQPPSVSVSPG QTASITCSGDKLGDK YVCWYQQKPGQSPV LVIFQDSKRPSGIPER FSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEADYYCQ AWDSSTVVFGGGTK LTVL (SEQ ID NO: 49)	SGDKLGDKYV C (SEQ ID NO: 6)	QDSKRPS (SEQ ID NO: 20)	QAWDSS TVV (SEQ ID NO: 33)
33B1 2	LV-05	SYELTQPPSVSVSPG QTASITCSGDKLGDK YVCWYQQKPGQSPV LVIYQDSKRPSGIPER FSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEADYYCQ AWDSSTVVFGGGTK LTVL (SEQ ID NO: 50)	SGDKLGDKYV C (SEQ ID NO: 6)	QDSKRPS (SEQ ID NO: 20)	QAWDSS TVV (SEQ ID NO: 33)
24C1 2	LV-06	GIVMTQSPDSLAVSL GERATINCKSSRSVL YSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKVLIYWA STRESGVPDREFSGSG SGTDFTLTISLQAE DVAVYNCQQYYITPI	KSSRSVLYSSN NKNYLA (SEQ ID NO: 7)	WASTRES (SEQ ID NO: 22)	QQYYITP IT (SEQ ID NO: 34)

		TFGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 51)			
24G6	LV-07	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINCKSSQSVL YSSNNKHFLAWYQQ KPGQPPKLLIYWAST RESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISLQAEDV AFYYCQQYYSTPLTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO: 52)	KSSQSVLYSSN NKHFLA (SEQ ID NO: 8)	WASTRES (SEQ ID NO: 22)	QQYYSTP LT (SEQ ID NO: 35)
24A10	LV-08	DIVMTQSPDSLAVSL GERATITCKSSHNVL YSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYWAS TRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISLQAED VAVYYCHQYYSTPC SFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 53)	KSSHNVLYSS NNKNYLA (SEQ ID NO: 9)	WASTRES (SEQ ID NO: 22)	HQYYSTP CS (SEQ ID NO: 36)
10E3	LV-09	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSCRASQSVS SNLAWFQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIP ARFSVSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAFYYCLQ DNNWPPTFGPGTKV DIK (SEQ ID NO: 54)	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 10)	GASTRAT (SEQ ID NO: 23)	LQDNNW PPT (SEQ ID NO: 37)
13E7 14C1 2	LV-10	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSCRASQSVS SNLAWFQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIP ARFSVSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCLQ DNNWPPTFGPGTKV	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 10)	GASTRAT (SEQ ID NO: 23)	LQDNNW PPT (SEQ ID NO: 37)

		DIK (SEQ ID NO: 55)			
25F1 2	LV-11	EKVMTQSPATLSVSP GERATLSCRASQSV NNNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATG IPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDAVYYC QQYNNWPRTFGQGT KVEIK (SEQ ID NO: 56)	RASQSVNNNL A (SEQ ID NO: 11)	GASTRAT (SEQ ID NO: 23)	QQYNNW PRT (SEQ ID NO: 38)
32E3	LV-12	EFVLTQSPGTLSSLSP GERATLSCRASQIIS NYLAWYQQKPGQA PRLLIYSASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQ QFDSSPITFGRGTRL DIK (SEQ ID NO: 57)	RASQIISSNYL A (SEQ ID NO: 12)	SASSRAT (SEQ ID NO: 24)	QQFDSSP IT (SEQ ID NO: 39)
24F4	LV-13	EIVLTQSPGTLSSLSPG ERATLSCRASQSVSS SYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFALYYCQ QYDTSPFTFGPGTKV DIK (SEQ ID NO: 58)	RASQSVSSSYL A (SEQ ID NO: 13)	GASSRAT (SEQ ID NO: 25)	QQYDTSP FT (SEQ ID NO: 40)
16B8	LV-14	DIQMTQSPSSVSASV GDRVTVTCRASQDI NSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQTG VPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYSC QQSNSFPITFGQGTR LEIK (SEQ ID NO: 59)	RASQDINSWL A (SEQ ID NO: 14)	AASSLQT (SEQ ID NO: 26)	QQSNSFP IT (SEQ ID NO: 41)
4C5	LV-15	DIQMTQSPSSVSASV	RASQGISNWL	AASSLQV	QQADSFP

		GDRVITITCRASQGIS NWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQVGV PLRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYC QQADSFPRNFGQGT KLEIK (SEQ ID NO: 60)	A (SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 27)	RN (SEQ ID NO: 42)
6E7	LV-16	DIQMTQSPSSVSASV GDRVITITCRASQGIS SWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQNGV PSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYFC QQADSFPRTFGQGT KLEIK (SEQ ID NO: 61)	RASQGISSWLA (SEQ ID NO: 16)	AASSLQN (SEQ ID NO: 28)	QQADSFPR T (SEQ ID NO: 43)
5E3	LV-17	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCRASQGIS NYLAWFQQKPGKAP KSLIYAASSLQSGVP SKFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQ YSTYPFTFGPGTKVD IK (SEQ ID NO: 62)	RASQGISNYLA (SEQ ID NO: 17)	AASSLQS (SEQ ID NO: 29)	QQYSTYP FT (SEQ ID NO: 44)
4G10	LV-18	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCRASQGIR NDLGWYQQKPGNA PKRLIYAASSLPSGV PSRFSGSGSGPEFTLT ISSLQPEDFATYYCL QHNSYPWTFGQGTK VEIT (SEQ ID NO: 63)	RASQGIRNDL G (SEQ ID NO: 18)	AASSLPS (SEQ ID NO: 30)	LQHNSYP WT (SEQ ID NO: 45)

Таблица 1В. Типичные аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи антитела к TREM2 человека

ID Ab	Группа VH	Аминокислотная последовательность VH	CDRH1	CDRH2	CDRH3
12G10 24C12	HV-01	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF TFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIGG GGVSTYCADSVKG RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAKFYIAVAGS HFDYWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO: 110)	SYAMS (SEQ ID NO: 77)	AIGGGGVST YCADSVKG (SEQ ID NO: 87)	FYIAVAGSH FDY (SEQ ID NO: 95)
26A10	HV-02	EVQLVESGGALVQ RGGSLRLSCAASRF TFSSFGMSWVRQA PGKGLEWVSYISS SFTIYYADSVKGRF TISRDN AKNSFY LQ MNSLRDEDTAVYY CAREGGLTMVRGV SSYGLDVWGQGTT VTVSS (SEQ ID NO: 111)	SFGMS (SEQ ID NO: 78)	YISSSSFTIY YADSVKG (SEQ ID NO: 88)	EGGLTMVR GVSSYGLDV (SEQ ID NO: 96)
26C10	HV-03	EVQLVESGGALVQ PGGSLRLSCAASGF TFSSFGMSWVRQA PGKGLEWVSYISS SFTIYYADSVKGRF TISRDN AKNSFY LQ MNSLRDEDTAVYF CVREGGITMVRGV SSYGMDVWGQGT TVTVSS (SEQ ID	SFGMS (SEQ ID NO: 78)	YISSSSFTIY YADSVKG (SEQ ID NO: 88)	EGGITMVRG VSSYGMDV (SEQ ID NO: 97)

		NO: 112)			
26F2	HV-04	EVQLVESGGALVQ PGGSLRLSCAASGF TFSSFGMSWVRQA PGKGLEWISYISSSS FTIYYADSVKGRFT ISRDNAKNSFYLQ MNSLRDEDTAVYF CAREGGITMVRGV SSYGMDVWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO: 113)	SFGMS (SEQ ID NO: 78)	YISSSSFTIY YADSVKG (SEQ ID NO: 88)	EGGITMVRG VSSYGMDV (SEQ ID NO: 97)
33B12	HV-05	EVQLVESGGALVQ PGGSLRLSCAASGF TFSSFGMSWVRQA PGKGLEWVSYISKS SFTIYYADSVKGRF TISRDNAKNSFYLQ MNSLRDEDTAVYY CAREGGLTMVRGV SSYGLDVWGQGTT VTVSS (SEQ ID NO: 114)	SFGMS (SEQ ID NO: 78)	YISKSSFTIY YADSVKG (SEQ ID NO: 89)	EGGLTMVR GVSSYGLDV (SEQ ID NO: 96)
24G6	HV-06	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF TFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAKAYTPMAFFD YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 115)	SYAMS (SEQ ID NO: 77)	AISGSGGST YYADSVKG (SEQ ID NO: 90)	AYTPMAFFD Y (SEQ ID NO: 98)
24A10	HV-07	EVQVLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF	NYAMS (SEQ ID NO:	AISGSGGST YYADSVKG	GGWELFY (SEQ ID NO:

		TFSNYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAKGGWELFYW GQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 116)	79)	(SEQ ID NO: 90)	99)
10E3	HV-08	EVQLVQSGAEVKK PGESLMISCKGSGY SFTNYWIGWVRQM PGKGLEWMGIIYP GDS DTRYSPSFQGG VTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMY FCARRRQGIWGDA LDIWGQGTTLVTVS S (SEQ ID NO: 117)	NYWIG (SEQ ID NO: 80)	IIYPGDS DTR YSPSFQG (SEQ ID NO: 91)	RRQGIWGD ALDI (SEQ ID NO: 100)
13E7 14C12	HV-09	EVQLVQSGAEVKK PGESLMISCKGSGY SFTSYWIGWVRQM PGKGLEWMGIIYP GDS DTRYSPSFQGG VTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMY FCARRRQGIWGDA LDFWGQGTTLVTVS S (SEQ ID NO: 118)	SYWIG (SEQ ID NO: 81)	IIYPGDS DTR YSPSFQG (SEQ ID NO: 91)	RRQGIWGD ALDF (SEQ ID NO: 101)
25F12	HV-10	QVQLQQWGAGLL KPSETLSLTCVYGG GSFSSYYWSWIRQP PGKGLEWIGEINHS GNTNYPNPSLKSRV	SYWWS (SEQ ID NO: 82)	EINHS GNTN YNPSLK S (SEQ ID NO: 92)	EGYYDILTG YHDAFDI (SEQ ID NO: 102)

		TISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYY CAREGYDILTGY HDAFDIWDQGTMV TVFS (SEQ ID NO: 119)			
32E3	HV-11	EVQLVQSGAEVKK PGESLKISCKGSGY SFTSYWIGWVRQM PGKGLEWMGIIYP GDS DTRYSPSFQGG VTISADKSISTAYL QWSTLKASDTAIY YCARHDIIPAAPGA FDIWGQGTMTVVS S (SEQ ID NO: 120)	SYWIG (SEQ ID NO: 81)	IIYPGDS DTR YSPSFQG (SEQ ID NO: 91)	HDIIPAAPGA FDI (SEQ ID NO: 103)
24F4	HV-12	EVQLVQSGAEVKK PGESLKISCKGSGY TFTSYWIGWVRQM PGKGLEWMGIIYP GDS DTRYSPSFQGG VTISVDKSSSTAYL QWSSLKASDTAIY YCTRQAIAVTGLG GFDPWGQGT LTV SS (SEQ ID NO: 121)	SYWIG (SEQ ID NO: 81)	IIYPGDS DTR YSPSFQG (SEQ ID NO: 91)	QAIAVTGLG GFDP (SEQ ID NO: 104)
16B8	HV-13	QVQLVQSGAEVKK PGASVKV SCKASG YTFTNYGISWVRQ APGQGLEWMGWIS AYNGNTNYAQKL QGRVTMTTDTSTS TVYME LRSLRSDD	NYGIS (SEQ ID NO: 83)	WISAYNGNT NYAQKLQG (SEQ ID NO: 93)	RGYSYGSFD Y (SEQ ID NO: 105)

		TAVYYCARRGYSY GSFDYWGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 122)			
4C5	HV-14	EVQLVQSGAEVKK PGESLKISCKGSGH SFTNYWIAWVRQM PGKGLEWMGIIYP GDS DTRYSPSFQGG VTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAVY FCARQRTFYDSS GYFDYWGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 123)	NYWIA (SEQ ID NO: 84)	IIYPGDS DTR YSPSFQG (SEQ ID NO: 91)	QRTFYDSS GYFDY (SEQ ID NO: 106)
6E7	HV-15	EVQLVQSGAEVKK PGESLKISCKGSGY SFTSYWIAWVRQM PGKGLEWMGIIYP GDS DTRYSPSFQGG VTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMY FCARQRTFYDSS DYFDYWGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 124)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPGDS DTR YSPSFQG (SEQ ID NO: 91)	QRTFYDSS DYFDY (SEQ ID NO: 107)
5E3	HV-16	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSC KASG YTFTGYYIHWVRQ APGLGLEWMGWIN PYSGGT TSAQKFQ GRVTMTRDTSISSA YMELSRLRSDDTA VYYCARDGGYLAL YGT DVWGQGTTV	GYIYH (SEQ ID NO: 86)	WINPYSGGT TSAQKFQG (SEQ ID NO: 94)	DGGYLALY GTDV (SEQ ID NO: 108)

		TVSS (SEQ ID NO: 125)			
4G10	HV-17	EVQLVQSGAEVKK PGESLKISCKGSGY SFPSYWIAWVRQM PGKGLEWMGIYP GDSDTRYSPSFQGG VTISADKSISTAFLK WSSLKASDTAMYF CARQGIEVTGTGG LDVWGQGTTVTVS S (SEQ ID NO: 126)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IYPGDS DTR YSPSFQG (SEQ ID NO: 91)	QGIEVTGTG GLDV (SEQ ID NO: 109)

[99] Антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению могут содержать одну или более CDR, представленных в таблице 1A (CDR легкой цепи; т. е. CDRL) и таблице 1B (CDR тяжелой цепи, т. е. CDRH). Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат одну или более CDR легкой цепи, выбранных из (i) CDRL1, выбранной из SEQ ID NO: 5–18, (ii) CDRL2, выбранной из SEQ ID NO: 19–30, и (iii) CDRL3, выбранной из SEQ ID NO: 31–45, и (iv) CDRL из (i), (ii) и (iii) которая содержит одну или более, например, одну, две, три, четыре или больше аминокислотных замен (например, консервативные аминокислотные замены), делеций или вставок из не более чем пяти, четырех, трех, двух или одной аминокислоты. В этих и других вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат одну или более CDR тяжелой цепи, выбранных из (i) CDRH1, выбранной из SEQ ID NO: 77–86, (ii) CDRH2, выбранной из SEQ ID NO: 87–94, и (iii) CDRH3, выбранной из SEQ ID NO: 95–109, и (iv) CDRH из (i), (ii) и (iii), которая содержит одну или более, например, одну, две, три, четыре или больше аминокислотных замен (например, консервативные аминокислотные замены), делеций или вставок из не более чем пяти, четырех, трех, двух или одной аминокислоты.

[100] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 могут содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 вариантов форм CDR, перечисленных в таблицах 1A и 1B, каждая из которых характеризуется по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичностью последовательности к последовательности CDR, приведенной в таблицах 1A и 1B. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 включают 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR, перечисленных в таблицах 1A и 1B, каждая из которых отличается не более чем на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот из CDR, перечисленных в этих таблицах. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат

CDRL1, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5–18, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; CDRL2, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19–30, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; CDRL3, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31–45, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; CDRH1, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 77–86, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; CDRH2, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 87–94, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; и CDRH3, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 95–109, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены. В других вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат CDRL1, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5–18; CDRL2, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19–30; CDRL3, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31–45; CDRH1, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 77–86; CDRH2, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 87–94; и CDRH3, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 95–109.

[101] В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где: (a) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 5, 19 и 31, соответственно; (b) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 6, 20 и 32, соответственно; (c) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 6, 21 и 33, соответственно; (d) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 6, 20 и 33, соответственно; (e) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 7, 22 и 34, соответственно; (f) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 8, 22 и 35, соответственно; (g) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 9, 22 и 36, соответственно; (h) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 10, 23 и 37, соответственно; (i) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 11, 23 и 38, соответственно; (j) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 12, 24 и 39, соответственно; (k) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 13, 25 и 40, соответственно; (l) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 14, 26 и 41, соответственно; (m) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 15, 27 и 42, соответственно; (n) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 28 и 43, соответственно; (o) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 17, 29 и 44, соответственно; или (p) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 18, 30 и 45, соответственно.

[102] В других конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где: (a) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 77, 87 и 95, соответственно; (b) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 78, 88 и 96, соответственно; (c) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 78, 88 и 97, соответственно; (d) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 78, 89 и 96, соответственно; (e) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 77, 90 и 98, соответственно; (f) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 79, 90 и 99, соответственно; (g) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 80, 91 и 100, соответственно; (h) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 81, 91 и 101, соответственно; (i) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 82, 92 и 102, соответственно; (j) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 81, 91 и 103, соответственно; (k) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 81, 91 и 104, соответственно; (l) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 83, 93 и 105, соответственно; (m) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 84, 91 и 106, соответственно; (n) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 107, соответственно; (o) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 86, 94 и 108, соответственно; или (p) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 109, соответственно.

[103] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где:

(a) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 5, 19 и 31, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 77, 87 и 95, соответственно;

(b) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 6, 20 и 32, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 78, 88 и 96, соответственно;

(c) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 6, 21 и 33, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 78, 88 и 97, соответственно;

(d) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 6, 20 и 33, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 78, 88 и 97, соответственно;

(e) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 6, 20 и 33, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID

NO: 78, 89 и 96, соответственно;

(f) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 7, 22 и 34, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 77, 87 и 95, соответственно;

(g) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 8, 22 и 35, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 77, 90 и 98, соответственно;

(h) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 9, 22 и 36, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 79, 90 и 99, соответственно;

(i) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 10, 23 и 37, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 80, 91 и 100, соответственно;

(j) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 10, 23 и 37, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 81, 91 и 101, соответственно;

(k) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 11, 23 и 38, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 82, 92 и 102, соответственно;

(l) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 12, 24 и 39, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 81, 91 и 103, соответственно;

(m) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 13, 25 и 40, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 81, 91 и 104, соответственно;

(n) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 14, 26 и 41, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 83, 93 и 105, соответственно;

(o) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 15, 27 и 42, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 84, 91 и 106, соответственно;

(p) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 28 и 43, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 107, соответственно;

(q) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 17, 29 и 44, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 86, 94 и 108, соответственно; или

(r) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 18, 30 и 45, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 109, соответственно.

[104] В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 10, 23 и 37, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 80, 91 и 100, соответственно. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 10, 23 и 37, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 81, 91 и 101, соответственно. В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 15, 27 и 42, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 84, 91 и 106, соответственно. В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 28 и 43, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 107, соответственно. В одном конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 17, 29 и 44, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 86, 94 и 108, соответственно. В другом конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 8, 22 и 35, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 77, 90 и 98, соответственно.

[105] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина и переменную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина из антитела, которое специфически связывается с TREM2 человека, такого как антитела, описанные в данном документе. Термин "переменная область", используемый в данном документе взаимозаменяемо с термином "переменный домен" (переменная область легкой цепи (VL), переменная область тяжелой цепи (VH)), относится к области в каждой из легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина, которая участвует непосредственно

в связывании антитела с антигеном. Как обсуждалось выше, области переменной легкой и тяжелой цепей имеют одинаковую общую структуру, и каждая область содержит четыре каркасных (FR) области, последовательности которых являются в значительной степени консервативными, соединенными тремя CDR. Каркасные области принимают конформацию бета-листа, и CDR могут образовывать петли, соединяющие структуру бета-листа. CDR в каждой цепи удерживаются в своей трехмерной структуре каркасными областями и вместе с CDR из другой цепи образуют сайт связывания антигена.

[106] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению могут содержать переменную область легкой цепи, выбранную из LV-01, LV-02, LV-03, LV-04, LV-05, LV-06, LV-07, LV-08, LV-09, LV-10, LV-11, LV-12, LV-13, LV-14, LV-15, LV-16, LV-17 и LV-18, как показано в таблице 1A, и/или переменную область тяжелой цепи, выбранную из HV-01, HV-02, HV-03, HV-04, HV-05, HV-06, HV-07, HV-08, HV-09, HV-10, HV-11, HV-12, HV-13, HV-14, HV-15, HV-16 и HV-17, как показано в таблице 1B, и функциональные фрагменты, производные, мутеины и варианты этих переменных областей легкой цепи и тяжелой цепи.

[107] Каждая из переменных областей легкой цепи, перечисленных в таблице 1A, может быть объединена с любой из переменных областей тяжелой цепи, перечисленной в таблице 1B, для образования домена, связывающего TREM2, антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению. Примеры таких комбинаций включают без ограничения следующее: LV-01 (SEQ ID NO: 46) и HV-01 (SEQ ID NO: 110); LV-02 (SEQ ID NO: 47) и HV-02 (SEQ ID NO: 111); LV-03 (SEQ ID NO: 48) и HV-03 (SEQ ID NO: 112); LV-04 (SEQ ID NO: 49) и HV-04 (SEQ ID NO: 113); LV-05 (SEQ ID NO: 50) и HV-05 (SEQ ID NO: 114); LV-06 (SEQ ID NO: 51) и HV-01 (SEQ ID NO: 110); LV-07 (SEQ ID NO: 52) и HV-06 (SEQ ID NO: 115); LV-08 (SEQ ID NO: 53) и HV-07 (SEQ ID NO: 116); LV-09 (SEQ ID NO: 54) и HV-08 (SEQ ID NO: 117); LV-10 (SEQ ID NO: 55) и HV-09 (SEQ ID NO: 118); LV-11 (SEQ ID NO: 56) и HV-10 (SEQ ID NO: 119); LV-12 (SEQ ID NO: 57) и HV-11 (SEQ ID NO: 120); LV-13 (SEQ ID NO: 58) и HV-12 (SEQ ID NO: 121); LV-14 (SEQ ID NO: 59) и HV-13 (SEQ ID NO: 122); LV-15 (SEQ ID NO: 60) и HV-14 (SEQ ID NO: 123); LV-16 (SEQ ID NO: 61) и HV-15 (SEQ ID NO: 124); LV-17 (SEQ ID NO: 62) и HV-16 (SEQ ID NO: 125); а также LV-18 (SEQ ID NO: 63) и HV-17 (SEQ ID NO: 126).

[108] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат переменную область легкой цепи, содержащую последовательность LV-09 (SEQ ID NO: 54), и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность HV-08 (SEQ ID NO: 117). В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат переменную область легкой цепи, содержащую последовательность LV-10 (SEQ ID NO: 55), и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность HV-09 (SEQ ID NO: 118). В других вариантах

осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат переменную область легкой цепи, содержащую последовательность LV-15 (SEQ ID NO: 60), и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность HV-14 (SEQ ID NO: 123). В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат переменную область легкой цепи, содержащую последовательность LV-16 (SEQ ID NO: 61), и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность HV-15 (SEQ ID NO: 124). В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат переменную область легкой цепи, содержащую последовательность LV-17 (SEQ ID NO: 62), и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность HV-16 (SEQ ID NO: 125). В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат переменную область легкой цепи, содержащую последовательность LV-07 (SEQ ID NO: 52), и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность HV-06 (SEQ ID NO: 115).

[109] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат переменную область легкой цепи, содержащую последовательность смежных аминокислот, которая отличается от последовательности переменной области легкой цепи в таблице 1A, т. е. VL, выбранную из LV-01, LV-02, LV-03, LV-04, LV-05, LV-06, LV-07, LV-08, LV-09, LV-10, LV-11, LV-12, LV-13, LV-14, LV-15, LV-16, LV-17 или LV-18, только по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотным остаткам, где каждая такая разница последовательностей независимо представляет собой любое из делеции, вставки или замены одной аминокислоты, причем делеции, вставки и/или замены приводят к не более чем 15 аминокислотным изменениям относительно вышеуказанных последовательностей переменной области. Переменная область легкой цепи в некоторых антигенсвязывающих белках–агонистах к TREM2 содержит последовательность аминокислот, которая характеризуется по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с аминокислотными последовательностями под SEQ ID NO: 46–63 (т. е. переменные области легкой цепи в таблице 1A). В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 46–63. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 46–63. В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 46–63.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 54. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 55. В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 60. В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 61. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 62. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 52.

[110] В этих и других вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность смежных аминокислот, которая отличается от последовательности вариабельной области тяжелой цепи в таблице 1B, т. е. VH, выбранную из HV-01, HV-02, HV-03, HV-04, HV-05, HV-06, HV-07, HV-08, HV-09, HV-10, HV-11, HV-12, HV-13, HV-14, HV-15, HV-16 или HV-17, в только по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотным остаткам, где каждая такая разница последовательностей независимо представляет собой либо делецию, вставку или замену одной аминокислоты, причем делеции, вставки и/или замены приводят к не более чем 15 аминокислотным изменениям относительно вышеуказанных последовательностей вариабельного домена. Вариабельная область тяжелой цепи в некоторых антигенсвязывающих белках–агонистах к TREM2 содержит последовательность аминокислот, которая характеризуется по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с аминокислотными последовательностями под SEQ ID NO: 110–126 (т. е. вариабельные области тяжелой цепи в таблице 1B). В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 110–126. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 110–126. В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 110–126. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 117. В других вариантах

осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 118. В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 123. В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 124. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 125. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 115.

[111] Термин "идентичность", используемый в данном документе, относится к взаимосвязи между последовательностями двух или больше полипептидных молекул или двух или больше молекул нуклеиновой кислоты, как определено при выравнивании и сравнении последовательностей. Термин "процент идентичности", используемый в данном документе, означает процент идентичных остатков аминокислот или нуклеотидов в сравниваемых молекулах и рассчитывается на основании размера наименьшей из молекул, подлежащих сравнению. Для этих расчетов гэпы в выравниваниях (если таковые имеются) должны быть учтены с помощью определенной математической модели или компьютерной программы (т. е. "алгоритма"). Способы, которые могут применяться для расчета идентичности выравниваемых нуклеиновых кислот или полипептидов, включают способы, которые описаны в *Computational Molecular Biology*, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; *Biocomputing Informatics and Genome Projects*, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, New York: Academic Press; *Sequence Analysis Primer*, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press и Carillo et al., 1988, *SIAM J. Applied Math.* 48:1073. Например, идентичность последовательности может быть определена с помощью стандартных способов, которые обычно применяют для сравнения сходства в положении аминокислот двух полипептидов. С применением компьютерной программы, такой как BLAST или FASTA, две полипептидные или две полинуклеотидные последовательности выровнены для оптимального соответствия их соответствующих остатков (либо по всей длине одной или обеих последовательностей, либо по заранее определенной части одной или обеих последовательностей). Программы предусматривают штраф за открытие по умолчанию и штраф за гэп по умолчанию, и при этом матрицу оценки, такую как PAM 250 (Dayhoff et al., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, supp. 3, 1978) или BLOSUM62 (Henikoff et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10915–10919), можно применять совместно с компьютерной программой. Например, процент идентичности затем может быть рассчитан как: общее количество идентичных совпадений, умноженное на 100, а затем разделенное на сумму длины более

длинной последовательности в согласованном промежутке и количества промежутков, введенных в более длинные последовательности, с целью выравнивания двух последовательностей. При расчете процента идентичности сравниваемые последовательности выравнивают способом, который дает наибольшее совпадение между последовательностями.

[112] Программный пакет GCG представляет собой компьютерную программу, которую можно применять для определения процента идентичности, при этом в пакет входит GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Мэдисон, Висконсин, США). Компьютерный алгоритм GAP применяют для выравнивания двух полипептидов или двух полинуклеотидов, для которых должен быть определен процент идентичности последовательностей. Последовательности выравнивают для получения оптимального совпадения их соответствующих аминокислот или нуклеотидов ("диапазон совпадения", который определяется этим алгоритмом). Штраф за открытие гэпа (который рассчитывается как 3х средняя диагональ, где "средняя диагональ" представляет собой среднее значение диагонали применяемой матрицы сравнения; "диагональ" представляет собой балл или число, присвоенное каждому полному аминокислотному совпадению в соответствии с определенной матрицей сравнения) и штраф за продление гэпа (который, как правило, составляет 1/10 долю от штрафа за открытие гэпа), а так же матрицу сравнения, такую как PAM 250 или BLOSUM 62, применяют вместе с алгоритмом. В определенных вариантах осуществления в этом алгоритме также используется стандартная матрица сравнения (см., Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345–352 для матрицы сравнения PAM 250; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915–10919 для матрицы сравнения BLOSUM 62).

[113] Рекомендуемые параметры для определения процента идентичности полипептидов или нуклеотидных последовательностей с применением программы GAP включают следующие.

Алгоритм: Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol. 48:443–453;

матрица сравнения: BLOSUM 62 от Henikoff et al., 1992, см. выше;

штраф за гэпы: 12 (но без штрафа за концевые гэпы);

штраф за продление гэпа: 4;

пороговое значение степени сходства: 0.

[114] Использование определенных схем выравнивания для выравнивания двух последовательностей может приводить к совпадению короткой области в этих двух последовательностях, и эта небольшая выровненная область может характеризоваться очень высокой идентичностью последовательности, даже если отсутствует значительная взаимосвязь между двумя полноразмерными последовательностями. Соответственно, выбранный способ выравнивания (программа GAP) может быть, если требуется, адаптирован для обеспечения выравнивания, которое охватывает по меньшей мере 50 смежных аминокислот полипептида–мишени.

[115] Варианты антител к TREM2, описанные в данном документе, можно получать путем замены одной или более аминокислот в переменных областях легкой цепи или тяжелой цепи для устранения химического потенциала (например, изомеризации аспартата, дезамидирования аспарагина, окисления триптофана и метионина) или коррекции нарушений ковариации (см. WO 2012/125495, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки), как описано в примере 7. Такие варианты могут иметь улучшенные биофизические свойства, свойства экспрессии и/или стабильности по сравнению с исходным антителом. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи, имеющую одну или более аминокислотных замен, указанных в любой из таблиц 13–18.

[116] Если не указано иное посредством ссылки на конкретную последовательность, то в настоящем описании и формуле изобретения нумерация аминокислотных остатков в тяжелой цепи или легкой цепей иммуноглобулина соответствует нумерации согласно Kabat–EU, как описано в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., US Department of Health and Human Services, NIH публикация № 91–3242, pp. 662, 680, 689 (1991) и Edelman et al., *Proc. Natl. Acad. USA*, Vol. 63: 78–85 (1969). Система нумерации согласно Kabat обычно используется при ссылке на положение аминокислоты в переменных областях, тогда как система нумерации EU обычно используется при ссылке на положение аминокислоты с константной областью иммуноглобулина. Диаграмма, обобщающая соответствие между системами нумерации согласно Kabat и EU с другими системами нумерации, доступна на веб-сайте IMGT[®] (Международная информационная система ImMunoGeneTics).

[117] Замена аминокислоты в аминокислотной последовательности в данном документе, как правило, обозначается однобуквенным сокращением аминокислотного остатка в конкретном положении, за которым следует числовое положение аминокислоты относительно исходной представляющей интерес последовательности, за которой следует однобуквенное сокращение для замещенного аминокислотного остатка. Например, "T30D" означает замену треонинового остатка аспартатным остатком в положении аминокислоты 30 относительно исходной представляющей интерес последовательности. В другом примере "S218G" означает замену серинового остатка глициновым остатком в положении аминокислоты 218 относительно исходной представляющей интерес аминокислотной последовательности.

[118] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 54 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 64, 79, 80, 85, 94 и/или 100. Такие мутации могут включать V64G, V64A, Q79E, Q79D, S80P, S80A, F85V, F85L, F85A, F85D, F85I, F85L, F85M, F85T, W94F, W94Y, W94S, W94T, W94A, W94H, W94I, W94Q, P100R, P100Q, P100G или их комбинации. В этих и других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 117 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 19, 55, 56, 57, 58 и/или 104. В определенных вариантах осуществления мутации выбраны из M19K, M19R, M19T, M19E, M19N, M19Q, D55E, D55Q, D55N, D55T, S56A, S56Q, S56V, D57S, D57E, D57Q, T58A, T58V, W104F, W104Y, W104T, W104S, W104A, W104H, W104I, W104Q или их комбинаций.

[119] В других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 55 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 64, 79, 80, 94 и/или 100. В некоторых вариантах осуществления мутации выбраны из V64G, V64A, Q79E, Q79D, S80P, S80A, W94F, W94Y, W94S, W94T, W94A, W94H, W94I, W94Q, P100R, P100Q, P100G или их комбинаций. В определенных вариантах осуществления мутации выбраны из V64G, V64A, Q79E, S80P, S80A, W94Y, W94S, P100R, P100Q или их комбинаций. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 55 с одной или более мутациями, выбранными из V64G, Q79E, S80P, W94Y и P100Q. В этих и других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 118 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 19, 55, 56, 57, 58 и/или 104. Такие мутации могут включать M19K, M19R, M19T, M19E, M19N, M19Q, D55E, D55Q, D55N, D55T, S56A, S56Q, S56V, D57S, D57E, D57Q, T58A, T58V, W104F, W104Y, W104T, W104S, W104A, W104H, W104I, W104Q или их комбинации. В определенных вариантах осуществления мутации выбраны из M19K, D55E, S56A, D57E, T58A, W104Y, W104T или их комбинаций.

[120] В определенных других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 60 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 60, 92 и/или 93. Мутации могут быть выбраны из L60S, L60P, L60D, L60A, D92E, D92Q, D92T, D92N, S93A, S93N, S93Q, S93V или их комбинаций. В этих и других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 123 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 27, 55, 56, 57, 58, 105 и/или 106. В некоторых вариантах осуществления мутации выбраны из H27Y, H27D, H27F, H27N, D55E, D55Q, D55N, D55T, S56A, S56Q, S56V, D57S, D57E, D57Q, T58A, T58V, D105E, D105Q, D105T, D105N, D105G, S106A, S106Q, S106V, S106T или их комбинаций.

[121] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 61 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 56, 57,

92 и/или 93. В определенных вариантах осуществления мутации выбраны из N56S, N56T, N56Q, N56E, G57A, G57V, D92E, D92Q, D92T, D92N, S93A, S93N, S93Q, S93V или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления мутации выбраны из N56S, N56Q, G57A, D92E, D92Q, S93A или их комбинаций. В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 61 с одной или более мутациями, выбранными из N56S, D92E и S93A. В этих и других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 124 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 55, 56, 57, 58, 105 и/или 106. Мутация может быть выбрана из D55E, D55Q, D55N, D55T, S56A, S56Q, S56V, D57S, D57E, D57Q, T58A, T58V, D105E, D105Q, D105T, D105N, D105G, S106A, S106Q, S106V, S106T или их комбинаций. В определенных вариантах осуществления такие мутации представляют собой D55E, D55Q, S56A, D57E, T58A, D105E, D105N, S106A или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 124 с одной или более мутациями, выбранными из D55E, S56A, D57E, D105E и S106A.

[122] В других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 62 с мутацией в аминокислотном положении 36, 46, 61 и/или 100. В конкретных вариантах осуществления мутации выбраны из F36Y, S46L, S46R, S46V, S46F, K61R, P100Q, P100G, P100R или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления такие мутации представляют собой F36Y, K61R, P100Q или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления такие мутации представляют собой S46L, P100Q или их комбинации. В этих и других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 125 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 43, 76, 85, 99, 100 и/или 116. Мутация может быть выбрана из L43Q, L43K, L43N, I76T, R85S, R85G, R85N, R85D, D99E, D99Q, D99S, D99T, G100A, G100Y, G100V, T116L, T116M, T116P, T116R или их комбинаций. В определенных вариантах осуществления такие мутации представляют собой L43Q, I76T, R85S, D99E, G100A, G100Y, T116L или их комбинации.

[123] В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 52 с мутацией в аминокислотном положении 91. Мутация может быть выбрана из F91V, F91I, F91T, F91L или F91D. В одном варианте осуществления мутация представляет собой F91V. В этих и других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 115 с мутацией в аминокислотном положении 62 и/или 63. В конкретных вариантах осуществления

мутации выбраны из D62E, D62Q, D62T, D62N, S63A, S63Q, S63V или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления такие мутации выбраны из D62E, D62Q, S63A или их комбинаций.

[124] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 326, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 327. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 328, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 329. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 330, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 331. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 332, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 333.

[125] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат вариабельную область легкой цепи, состоящую или фактически состоящую из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 326, 328, 330 или 332. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат вариабельную область тяжелой цепи, состоящую или фактически состоящую из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 327, 329, 331 или 333. В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, где вариабельная область легкой цепи состоит или фактически состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 326 и вариабельная область тяжелой цепи состоит или фактически состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 327. В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, где вариабельная область легкой цепи состоит или фактически состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 328 и вариабельная область тяжелой цепи состоит или фактически состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 329. В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат вариабельную область легкой цепи и вариабельную

область тяжелой цепи, где переменная область легкой цепи состоит или фактически состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 330 и переменная область тяжелой цепи состоит или фактически состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 331. В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, где переменная область легкой цепи состоит или фактически состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 332 и переменная область тяжелой цепи состоит или фактически состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 333.

[126] Дополнительные варианты антител к TREM2, описанные в данном документе, можно получать посредством модулирования аффинности любого из антител к TREM2, описанных в данном документе. "Аффинно-модулированное антитело" представляет собой антитело, которое содержит одну или более аминокислотных замен в его последовательности переменной области легкой цепи и/или последовательности переменной области тяжелой цепи, которая увеличивает или уменьшает аффинность антитела к целевому антигену по сравнению с исходным антителом, не содержащим аминокислотных замен. Способы модуляции аффинности антител известны специалистам в данной области техники и могут включать мутагенез по типу "прогулка по CDR" (Yang et al., *J. Mol. Biol.*, 254, 392–403, 1995), перестановку цепей (Marks et al., *Bio/Technology*, 10, 779–783, 1992), использование мутационных штаммов *E. coli* (Low et al., *J. Mol. Biol.*, 250, 350–368, 1996), перетасовку ДНК (Patten et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724–733, 1997), фаговый дисплей (Thompson et al., *J. Mol. Biol.*, 256, 7–88, 1996), методики ПЦР (Cramer et al., *Nature*, 391, 288–291, 1998) и другие стратегии мутагенеза (Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809–3813, 1994; Schier et al. *Gene* 169:147–155, 1995; Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994–2004, 1995; Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310–9, 1995 и Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889–896, 1992). Способы модуляции аффинности обсуждаются в Hoogenboom, *Trends in Biotechnology*, Vol. 15: 62–70, 1995 и Vaughan et al., *Nature Biotechnology*, 16: 535–539, 1998. Одним конкретным способом получения аффинно-модулированных вариантов антител к TREM2, описанных в данном документе, является использование библиотеки Fab-мутагенеза с дрожжевым дисплеем, как описано в примере 8.

[127] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи из аффинно-модулированного варианта антитела 6E7 (пример 8). Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 содержат переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи, имеющую одну или более аминокислотных замен, указанных в таблице 23. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок-агонист TREM2 содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 61 с мутацией в одной или более

из аминокислотных положений 24, 31, 50, 52, 54, 56, 89, 92, 93, 94 и/или 96. В определенных вариантах осуществления мутации выбраны из R24A, S31R, A50S, A50G, S52G, L54R, N56K, N56R, N56L, N56T, Q89G, D92V, S93R, F94Y, F94L, R96H, R96L или их комбинаций. В этих и других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 124 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 27, 28, 30, 32, 50, 54, 58, 60, 61, 63, 66, 99, 101, 103, 104 и/или 110. В некоторых вариантах осуществления мутации выбраны из Y27S, S28G, S28H, T30N, T30G, T30E, T30A, Y32E, I50T, G54S, T58V, Y60L, S61A, S63G, S63E, G66D, Q99G, Q99S, Q99M, T101G, Y103R, Y104G, F110S или их комбинаций. Аминокислотные последовательности для вариабельных областей легкой цепи и тяжелой цепи и ассоциированные CDR типичных вариантов антитела 6E7 с улучшенной аффинностью приведены ниже в таблицах 2A и 2B, соответственно. Аминокислотные последовательности для вариабельных областей легкой цепи и тяжелой цепи и ассоциированные CDR типичных вариантов антитела 6E7 с пониженной аффинностью приведены ниже в таблицах 3A и 3B, соответственно. Соответствующие последовательности для антитела 6E7 перечислены для сравнения.

Таблица 2A. Аминокислотные последовательности вариабельной области легкой цепи для антител к TREM2 с улучшенной аффинностью

ID вариант а Ab	Группа VL	Аминокислотная последовательность VL	CDRL1	CDRL2	CDRL3
6E7	LV-16	DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCRASQGISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQNGVPSRFGSGS GTDFTLTISLQPEDFAT YFCQQADSFPRTFGQGT KLEIK (SEQ ID NO: 61)	RASQGISS WLA (SEQ ID NO: 16)	AASSLQ N (SEQ ID NO: 28)	QQADSFP RT (SEQ ID NO: 43)
V3	LV-101	DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCRASQGISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYA ASSRQNGVPSRFGSGS GTDFTLTISLQPEDFAT YFCQQADRFPRTFGQG TKLEIK (SEQ ID NO: 153)	RASQGISS WLA (SEQ ID NO: 16)	AASSRQ N (SEQ ID NO: 143)	QQADRFP RT (SEQ ID NO: 148)

V24	LV-102	DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCRASQGISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQKGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFAT YFCQQADSFPHTFGQG TKLEIK (SEQ ID NO: 154)	RASQGISS WLA (SEQ ID NO: 16)	AASSLQ K (SEQ ID NO: 144)	QQADSFP HT (SEQ ID NO: 149)
V27	LV-103	DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCRASQGISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQRGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFAT YFCQQADSFPRTFGQGT KLEIK (SEQ ID NO: 155)	RASQGISS WLA (SEQ ID NO: 16)	AASSLQ R (SEQ ID NO: 145)	QQADSFP RT (SEQ ID NO: 43)
V40	LV-104	DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCRASQGISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQLGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFAT YFCQQADRFPRTFGQG TKLEIK (SEQ ID NO: 156)	RASQGISS WLA (SEQ ID NO: 16)	AASSLQ L (SEQ ID NO: 146)	QQADRFP RT (SEQ ID NO: 148)
V48	LV-105	DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCRASQGISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQTGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFAT YFCQQADSLPRTFGQG TKLEIK (SEQ ID NO: 157)	RASQGISS WLA (SEQ ID NO: 16)	AASSLQ T (SEQ ID NO: 26)	QQADSLP RT (SEQ ID NO: 150)
V49 V73	LV-106	DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCRASQGISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYA ASSRQNGVPSRFSGSGS	RASQGISS WLA (SEQ ID NO: 16)	AASSRQ N (SEQ ID NO: 143)	QQADSYN RT (SEQ ID NO: 151)

		GTDFTLTISSLQPEDFAT YFCQQADSYPRTFGQG TKLEIK (SEQ ID NO: 158)			
V52	LV-107	DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCRASQGISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQRGVPSRFGSGS GTDFTLTISSLQPEDFAT YFCQQADRFPRTFGQG TKLEIK (SEQ ID NO: 159)	RASQGISS WLA (SEQ ID NO: 16)	AASSLQ R (SEQ ID NO: 145)	QQADRFP RT (SEQ ID NO: 148)
V60	LV-108	DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCRASQGISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQRGVPSRFGSGS GTDFTLTISSLQPEDFAT YFCGQADSFPRTFGQGT KLEIK (SEQ ID NO: 160)	RASQGISS WLA (SEQ ID NO: 16)	AASSLQ R (SEQ ID NO: 145)	GQADSFP RT (SEQ ID NO: 152)
V76	LV-109	DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCRASQGISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQKGVPSRFGSGS GRDFTLTISSLQPEDFAT YFCQQADSFPRTFGQGT KLEIK (SEQ ID NO: 161)	RASQGISS WLA (SEQ ID NO: 16)	AASSLQ K (SEQ ID NO: 144)	QQADSFP RT (SEQ ID NO: 43)
V84	LV-110	DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCRASQGISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQNGVPSRFGSGS GTDFTLTISSLQPEDFAT YFCQQADSFPRTFGQGT KLEIK (SEQ ID NO: 162)	RASQGISS WLA (SEQ ID NO: 16)	GASSLQ N (SEQ ID NO: 147)	QQADSFP RT (SEQ ID NO: 43)

Таблица 2В. Аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи для антител к TREM2 с улучшенной аффинностью

ID варианта Ab	Группа а VH	Аминокислотная последовательность VH	FR1/ пограничный участок CDRH1	CDRH1	CDRH2	CDRH3
6E7	HV-15	EVQLVQSGAEV KKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIA WVRQMPGKGLE WMGIIYPGDSDT RYSPSFQGQVTI SADKSISTAYLQ WSSLKASDTAM YFCARQRTFYY DSSDYFDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 124)	YSFT (SEQ ID NO: 163)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPGDS DTRYSP SFQG (SEQ ID NO: 91)	QRTFYY DSSDYF DY (SEQ ID NO: 107)
V3	HV-101	EVQLVQSGAEV KKPGESLKISCK GSGYSFASYWIA WVRQMPGKGLE WMGIIYPGDSDT RYSPSFQDQVTI SADKSISTAYLQ WSSLKASDTAM YFCARGRTFYY DSSDYFDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 180)	YSFA (SEQ ID NO: 164)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPGDS DTRYSP SFQD (SEQ ID NO: 170)	GRTFYY DSSDYF DY (SEQ ID NO: 176)
V24	HV-102	EVQLVQSGAEV KKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIA WVRQMPGKGLE WMGIIYPGDSDV RYSPSFQGQVTI SADKSISTAYLQ	YSFT (SEQ ID NO: 163)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPGDS DVRYS SFQG (SEQ ID NO: 171)	SRTFYY DSSDYF DY (SEQ ID NO: 177)

		WSSLKASDTAM YFCARSRTFYD SSDYFDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 181)				
V27	HV-103	EVQLVQSGAEV KKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIA WVRQMPGKGLE WMGIIYPGDSDT RYAPSFQGQVTI SADKSISTAYLQ WSSLKASDTAM YFCVRSRTFYD SSDYFDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 182)	YSFT (SEQ ID NO: 163)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPGDS DTRYAP SFQG (SEQ ID NO: 172)	SRTFY DSSDY DY (SEQ ID NO: 177)
V40	HV-104	EVQLVQSGAEV KKPGESLKISCK GSGYSFGSYWIA WVRQMPGKGLE WMGIIYPGDSDV RYSPSFQGQVTI SADKSISTAYLQ WSSLKASDTAM YFCARQRTFY DSSDYSDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 183)	YSFG (SEQ ID NO: 165)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPGDS DVRYP SFQG (SEQ ID NO: 171)	QRTFY DSSDY DY (SEQ ID NO: 178)
V48	HV-105	EVQLVQSGAEV KKPGESLKISCK GSGYSFGSYWIA WVRQMPGKGLE WMGIIYPGDSDV RYSPSFQGQVTI	YSFG (SEQ ID NO: 165)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPGDS DVRYP SFQG (SEQ ID NO: 171)	MRTFY YDSSDY FDY (SEQ ID NO: 179)

		SADKSISTAYLQ WSSLKASDTAM YFCARMRTFY DSSDYFDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 184)				
V49	HV-106	EVQLVQSGAEV KKPGESLKISCK GSGYSFNSYWIA WVRQMPGKGLE WMGTIYPGDS TRLSPSFQGGVTI SADKSISTAYLQ WSSLKASDTAM YFCARSRTFYD SSDYFDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 185)	YSFN (SEQ ID NO: 166)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	TIYPGD SDTRLS PSFQG (SEQ ID NO: 173)	SRTFY DSSDYF DY (SEQ ID NO: 177)
V52	HV-107	EVQLVQSGAEV KKPGESLKISCK GSGYSFESYWIA WVRQMPGKGLE WMGIIYPGDS RYSPSFQGGVTI SADKSISTAYLQ WSSLKASDTAM YFCARGRTFY DSSDYFDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 186)	YSFE (SEQ ID NO: 167)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPGDS DTRYSP SFQG (SEQ ID NO: 91)	GRTFY DSSDYF DY (SEQ ID NO: 176)
V60	HV-108	EVQLVQSGAEV KKPGESLKISCK GSGYHFTSYWIA WVRQMPGKGLE WMGIIYPGDS DV	YHFT (SEQ ID NO: 168)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPGDS DVRYP SFQG (SEQ ID NO: 171)	QRTFY DSSDYS DY (SEQ ID NO: 178)

		RYSPSFQGQVTI SADKSISTAYLQ WSSLKASDTAM YFCARQRTFYY DSSDYSDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 187)				
V73	HV– 109	EVQLVQSGAEV KKPGESLKISCK GSGYSFGSYWIA WVRQMPGKGLE WMGIIYPGDSDT RYSPGFQGQVTI SADKSISTAYLQ WSSLKASDTAM YFCARGRTFYY DSSDYFDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 188)	YSFG (SEQ ID NO: 165)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPGDS DTRYSP GFQG (SEQ ID NO: 174)	GRTFYY DSSDYF DY (SEQ ID NO: 176)
V76	HV– 110	EVQLVQSGAEV KKPGESLKISCK GSGYSFGSYWIA WVRQMPGKGLE WMGIIYPGDSDT RYSPEFQGQVTI SADKSISTAYLQ WSSLKASDTAM YFCARQRTFYY DSSDYSDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 189)	YSFG (SEQ ID NO: 165)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPGDS DTRYSP EFQG (SEQ ID NO: 175)	QRTFYY DSSDYS DY (SEQ ID NO: 178)
V84	HV– 111	EVQLVQSGAEV KKPGESLKISCK GSGYGFTSYWIA WVRQMPGKGLE	YGFT (SEQ ID NO: 169)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPGDS DTRYSP SFQG (SEQ ID	QRTFYY DSSDYS DY (SEQ ID

		WMGIIYPGDSDT RYSFSFQGGVTI SADKSISTAYLQ WSSLKASDTAM YFCARQRTFYY DSSDYSDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 190)			NO: 91)	NO: 178)
--	--	---	--	--	---------	----------

[128] Антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению могут содержать одну или более CDR из вариантов с улучшенной аффинностью, представленных в таблице 2A (CDR легкой цепи; т. е. CDRL) и таблице 2B (CDR тяжелой цепи, т. е. CDRH). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат консенсусную последовательность CDR, полученную из вариантов с улучшенной аффинностью. Например, в одном варианте осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат консенсусную последовательность CDRL2 X_1 ASS X_2 Q X_3 (SEQ ID NO: 139), где X_1 представляет собой A или G; X_2 представляет собой L или R; и X_3 представляет собой N, K, R, L или T. В другом варианте осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат консенсусную последовательность CDRL3 X_1 QADX X_3 PX X_4 T (SEQ ID NO: 140), где X_1 представляет собой Q или G; X_2 представляет собой S или R; X_3 представляет собой F, L или Y; и X_4 представляет собой R или H. В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат консенсусную последовательность CDRH2 X_1 IYPGDSDX X_2 R X_3 X X_4 PX X_5 FQ X_6 (SEQ ID NO: 141), где X_1 представляет собой I или T; X_2 представляет собой T или V; X_3 представляет собой Y или L; X_4 представляет собой S или A; X_5 представляет собой S, G или E; и X_6 представляет собой G или D. В еще одном варианте осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат консенсусную последовательность CDRH3 X_1 RTFYYDSSDY X_2 DY (SEQ ID NO: 142), где X_1 представляет собой Q, G, S или M; и X_2 представляет собой F или S. В определенных вариантах осуществления связывающие белки–агонисты TREM2 содержат переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRL1 содержит последовательность под SEQ ID NO: 16, CDRL2 содержит консенсусную последовательность под SEQ ID NO: 139, CDRL3 содержит консенсусную последовательность под SEQ ID NO: 140, CDRH1 содержит последовательность под SEQ ID NO: 85, CDRH2 содержит консенсусную последовательность под SEQ ID NO: 141, и CDRH3 содержит консенсусную последовательность под SEQ ID NO: 142.

[129] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты

TREM2 по настоящему изобретению содержат CDRL1, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 16; CDRL2, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 26 и 143–147; CDRL3, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 43 и 148–152; CDRH1, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 85; CDRH2, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 91 и 170–175; и CDRH3, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 176–179.

[130] В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где: (a) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 143 и 148, соответственно; (b) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 144 и 149, соответственно; (c) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 145 и 43, соответственно; (d) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 146 и 148, соответственно; (e) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 26 и 150, соответственно; (f) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 143 и 151, соответственно; (g) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 145 и 148, соответственно; (h) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 145 и 152, соответственно; (i) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 144 и 43, соответственно; или (j) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 147 и 43, соответственно.

[131] В связанных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где: (a) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 170 и 176, соответственно; (b) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 171 и 177, соответственно; (c) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 172 и 177, соответственно; (d) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 171 и 178, соответственно; (e) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 171 и 179, соответственно; (f) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 173 и 177, соответственно; (g) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 176, соответственно; (h) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 174 и 176, соответственно; (i) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 175 и 178, соответственно; или (j) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 178, соответственно.

[132] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где:

(a) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 143 и 148, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 170 и 176, соответственно;

(b) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 144 и 149, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 171 и 177, соответственно;

(c) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 145 и 43, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 172 и 177, соответственно;

(d) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 146 и 148, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 171 и 178, соответственно;

(e) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 26 и 150, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 171 и 179, соответственно;

(f) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 143 и 151, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 173 и 177, соответственно;

(g) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 145 и 148, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 176, соответственно;

(h) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 145 и 152, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 171 и 178, соответственно;

(i) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 143 и 151, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 174 и 176, соответственно;

(j) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 144 и 43, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 175 и 178, соответственно; или

(k) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 147 и 43, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 178, соответственно.

[133] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению могут содержать вариабельную область легкой цепи, выбранную из LV-101, LV-102, LV-103, LV-104, LV-105, LV-106, LV-107, LV-108, LV-109 и LV-110, как показано в таблице 2A, и/или вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из HV-101, HV-102, HV-103, HV-104, HV-105, HV-106, HV-107, HV-108, HV-109, HV-110 и HV-111, как показано в таблице 2B, или последовательности, которые на по меньшей мере 80% идентичны, на по меньшей мере 85% идентичны, на по меньшей

мере 90% идентичны или на по меньшей мере 95% идентичны любой из последовательностей в таблицах 2А и 2В. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 153–162, (ii) последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 153–162, или (iii) последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 153–162. В связанных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 180–190, (ii) последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 180–190, или (iii) последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 180–190.

[134] Каждая из вариабельных областей легкой цепи, перечисленных в таблице 2А, может быть объединена с любой из вариабельных областей тяжелой цепи, перечисленной в таблице 2В, для образования домена, связывающего TREM2, антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению. Примеры таких комбинаций включают без ограничения следующее: LV–101 (SEQ ID NO: 153) и HV–101 (SEQ ID NO: 180); LV–102 (SEQ ID NO: 154) и HV–102 (SEQ ID NO: 181); LV–103 (SEQ ID NO: 155) и HV–103 (SEQ ID NO: 182); LV–104 (SEQ ID NO: 156) и HV–104 (SEQ ID NO: 183); LV–105 (SEQ ID NO: 157) и HV–105 (SEQ ID NO: 184); LV–106 (SEQ ID NO: 158) и HV–106 (SEQ ID NO: 185); LV–107 (SEQ ID NO: 159) и HV–107 (SEQ ID NO: 186); LV–108 (SEQ ID NO: 160) и HV–108 (SEQ ID NO: 187); LV–106 (SEQ ID NO: 158) и HV–109 (SEQ ID NO: 188); LV–109 (SEQ ID NO: 161) и HV–110 (SEQ ID NO: 189); а также LV–110 (SEQ ID NO: 162) и HV–111 (SEQ ID NO: 190).

Таблица 3А. Аминокислотные последовательности вариабельной области легкой цепи для антител к TREM2 с пониженной аффинностью

ID варианта Ab	Группа VL	Аминокислотная последовательность VL	CDRL1	CDRL2	CDRL3
6E7	LV–16	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITTCRASQGISSWL AWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQNGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQADSFPR FGQGTEKLEIK (SEQ ID NO: 61)	RASQGISS WLA (SEQ ID NO: 16)	AASSLQN (SEQ ID NO: 28)	QQADS FPRT (SEQ ID NO: 43)

V9 V30 V33 V44 V68	LV-16	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITTCRASQGISSWL AWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQNGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQADSFPR FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 61)	RASQGISS WLA (SEQ ID NO: 16)	AASSLQN (SEQ ID NO: 28)	QQADS FPRT (SEQ ID NO: 43)
V10	LV-201	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITTCRASQGISSWL AWYQQKPGKAPKLLI YSASSLQNGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQADSFPR FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 295)	RASQGISS WLA (SEQ ID NO: 16)	SASSLQN (SEQ ID NO: 292)	QQADS FPRT (SEQ ID NO: 43)
V23	LV-202	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITTCRASQGISSWL AWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQNGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQADSFPLT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 296)	RASQGISS WLA (SEQ ID NO: 16)	AASSLQN (SEQ ID NO: 28)	QQADS FPLT (SEQ ID NO: 294)
V57	LV-203	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITTCRASQGISSWL LAWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQNGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQADSFPR FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 297)	AASQGISS WLA (SEQ ID NO: 290)	AASSLQN (SEQ ID NO: 28)	QQADS FPRT (SEQ ID NO: 43)
V70	LV-204	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITTCRASQGISSWL AWYQQKPGKAPKLLI	RASQGISS WLA (SEQ ID NO: 16)	AAGSLQ N (SEQ ID NO: 293)	QQADS FPRT (SEQ ID

		YAAGSLQNGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPE DFATYFCQQADSFPR FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 298)			NO: 43)
V83	LV-205	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITTCRASQGISSWL AWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQNGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPE DFATYFCQQA VSFPR FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 299)	RASQGISS WLA (SEQ ID NO: 16)	AASSLQN (SEQ ID NO: 28)	QQA VS FPRT (SEQ ID NO: 271)
V90	LV-206	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITTCRASQGISRW LAWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQNGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPE DFATYFCQQADSFPR FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 300)	RASQGIS RWLA (SEQ ID NO: 291)	AASSLQN (SEQ ID NO: 28)	QQA DS FPRT (SEQ ID NO: 43)

Таблица 3В. Аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи для антител к TREM2 с пониженной аффинностью

ID вариант а Ab	Группа VH	Аминокислотная последовательность VH	FR1/ пограничный участок CDRH1	CDRH 1	CDRH 2	CDRH 3
6E7	HV-15	EVQLVQSGAEVK KPGESLKISCKGS GYSFTSYWIAWV RQMPGKGLEWM GIYPGDS DTRY S PSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLK ASDTAMYFCARQ	YSFT (SEQ ID NO: 163)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPG DSDTR YSPSF QG (SEQ ID NO: 91)	QRTF YYDS SDYF DY (SEQ ID NO: 107)

		RTFYDSSDYFD YWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 124)				
V9	HV-201	EVQLVQSGAEVK KPGESLKISCKGS GYSFTSYWIAWV RQMPGKGLEWM GIIYPGDS DTRY S PSFQQQVTISADK SISTAYLQWSSLK ASDTAMYFCARQ RGFYDSSDYFD YWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 307)	YSFT (SEQ ID NO: 163)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPG DSDTR YSPSF QG (SEQ ID NO: 91)	QRGF YYDS SDYF DY (SEQ ID NO: 304)
V10 V23 V57 V70 V83	HV-15	EVQLVQSGAEVK KPGESLKISCKGS GYSFTSYWIAWV RQMPGKGLEWM GIIYPGDS DTRY S PSFQQQVTISADK SISTAYLQWSSLK ASDTAMYFCARQ RTFYDSSDYFD YWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 124)	YSFT (SEQ ID NO: 163)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPG DSDTR YSPSF QG (SEQ ID NO: 91)	QRTF YYDS SDYF DY (SEQ ID NO: 107)
V30	HV-202	EVQLVQSGAEVK KPGESLKISCKGS GSSFTSYWIAWV RQMPGKGLEWM GIIYPGDS DTRY S PSFQQQVTISADK SISTAYLQWSSLK ASDTAMYFCARQ RTFYDSSDYFD YWGQGLTVTVSS	SSFT (SEQ ID NO: 301)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPG DSDTR YSPSF QG (SEQ ID NO: 91)	QRTF YYDS SDYF DY (SEQ ID NO: 107)

		(SEQ ID NO: 308)				
V33	HV-203	EVQLVQSGAEVK KPGESLKISCKGS GYSFTSYWIAWV RQMPGKGLEWM GIIYPGDSSDTRY PSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLK ASDTAMYFCARQ RTFYGDSSDYFD YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 309)	YSFT (SEQ ID NO: 163)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPG DSDTR YSPSF QG (SEQ ID NO: 91)	QRTF YGDS SDYF DY (SEQ ID NO: 305)
V44	HV-204	EVQLVQSGAEVK KPGESLKISCKGS GYSFTSYWIAWV RQMPGKGLEWM GIIYPSDSDTRYSP SFQGQVTISADKS ISTAYLQWSSLKA SDTAMYFCARQR TFYYDSSDYFDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 310)	YSFT (SEQ ID NO: 163)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPSD SDTRY SPSFQ G (SEQ ID NO: 303)	QRTF YYDS SDYF DY (SEQ ID NO: 107)
V68	HV-205	EVQLVQSGAEVK KPGESLKISCKGS GYSFTSYWIAWV RQMPGKGLEWM GIIYPGDSSDTRY PSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLK ASDTAMYFCARQ RTFRYDSSDYFD YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 311)	YSFT (SEQ ID NO: 163)	SYWIA (SEQ ID NO: 85)	IIYPG DSDTR YSPSF QG (SEQ ID NO: 91)	QRTF RYDS SDYF DY (SEQ ID NO: 306)
V90	HV-206	EVQLVQSGAEVK	YSFT	SEWIA	IIYPG	QRTF

		KPGESLKISCKGS GYSFTSEWIAWV RQMPGKGLEWM GIIYPGDSSTRYS PSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLK ASDTAMYFCARQ RTFYYDSSDYFD YWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 312)	(SEQ ID NO: 163)	(SEQ ID NO: 302)	DSDTR YSPSF QG (SEQ ID NO: 91)	YYDS SDYF DY (SEQ ID NO: 107)
--	--	--	---------------------	------------------------	---	--

[135] Антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению могут содержать одну или более CDR из вариантов с пониженной аффинностью, представленных в таблице 3А (CDR легкой цепи; т. е. CDRL) и таблице 3В (CDR тяжелой цепи, т. е. CDRH). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат консенсусную последовательность CDR, полученную из вариантов с пониженной аффинностью. Например, в одном варианте осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат консенсусную последовательность CDRL1 $X_1ASQGISX_2WLA$ (SEQ ID NO: 284), где X_1 представляет собой R или A; и X_2 представляет собой S или R. В другом варианте осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат консенсусную последовательность CDRL2 X_1AX_2SLQN (SEQ ID NO: 285), где X_1 представляет собой A или S; и X_2 представляет собой S или G. В другом варианте осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат консенсусную последовательность CDRL3 $QQAX_1SFPX_2T$ (SEQ ID NO: 286), где X_1 представляет собой D или V; и X_2 представляет собой R или L. В другом варианте осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат консенсусную последовательность CDRH1 SX_1WIA (SEQ ID NO: 287), где X_1 представляет собой Y или E. В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат консенсусную последовательность CDRH2 $IIYPX_1DSDTRYSPSFQG$ (SEQ ID NO: 288), где X_1 представляет собой G или S. В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат консенсусную последовательность CDRH3 $QRX_1FX_2X_3DSSDYFDY$ (SEQ ID NO: 289), где X_1 представляет собой T или G; X_2 представляет собой Y или R; и X_3 представляет собой Y или G. В определенных вариантах осуществления связывающие белки–агонисты TREM2 содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRL1 содержит последовательность под SEQ ID NO: 284, CDRL2 содержит

консенсусную последовательность под SEQ ID NO: 285, CDRL3 содержит консенсусную последовательность под SEQ ID NO: 286, CDRH1 содержит последовательность под SEQ ID NO: 287, CDRH2 содержит консенсусную последовательность под SEQ ID NO: 288, и CDRH3 содержит консенсусную последовательность под SEQ ID NO: 289.

[136] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат CDRL1, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16, 290 и 291; и CDRL2, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28, 292 и 293; и CDRL3, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 43, 294 и 271; CDRH1, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 302; CDRH2, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 91 или SEQ ID NO: 303; и CDRH3, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 107 и 304–306.

[137] В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где: (a) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 28 и 43, соответственно; (b) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 292 и 43, соответственно; (c) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 28 и 294, соответственно; (d) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 290, 28 и 43, соответственно; (e) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 293 и 43, соответственно; (f) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 28 и 271 соответственно; или (g) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 291, 28 и 43, соответственно.

[138] В связанных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где: (a) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 304, соответственно; (b) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 107, соответственно; (c) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 305, соответственно; (d) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 303 и 107, соответственно; (e) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 306 соответственно; или (f) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 302, 91 и 107, соответственно.

[139] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где:

(a) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 28 и 43, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 304, соответственно;

(b) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 292 и 43, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 107, соответственно;

(c) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 28 и 294, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 107, соответственно;

(d) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 28 и 43, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 107, соответственно;

(e) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 28 и 43, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 305, соответственно;

(f) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 28 и 43, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 303 и 107, соответственно;

(g) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 290, 28 и 43, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 107, соответственно;

(h) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 28 и 43, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 306, соответственно;

(i) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 293 и 43, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 107, соответственно;

(j) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 16, 28 и 271, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 85, 91 и 107, соответственно; или

(k) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 291, 28 и 43, соответственно, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательность под SEQ ID NO: 302, 91 и 107, соответственно.

[140] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению могут содержать вариабельную область легкой цепи, выбранную из LV-16, LV-201, LV-202, LV-203, LV-204, LV-205 и LV-206, как показано в таблице 3А, и/или вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из HV-15, HV-201, HV-202, HV-203, HV-204, HV-205 и HV-206, как показано в таблице 3В, или последовательности, которые на по меньшей мере 80% идентичны, на по меньшей мере 85% идентичны, на по меньшей мере 90% идентичны или на по меньшей мере 95% идентичны любой из последовательностей в таблицах 3А и 3В. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) последовательность, которая на по

меньшей мере 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 61 и 295–300, (ii) последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 61 и 295–300, или (iii) последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 61 и 295–300. В связанных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 124 и 307–312, (ii) последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 124 и 307–312, или (iii) последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 124 и 307–312.

[141] Каждая из вариабельных областей легкой цепи, перечисленных в таблице 3А, может быть объединена с любой из вариабельных областей тяжелой цепи, перечисленной в таблице 3В, для образования домена, связывающего TREM2, антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению. Примеры таких комбинаций включают без ограничения следующее: LV–16 (SEQ ID NO: 61) и HV–201 (SEQ ID NO: 307); LV–201 (SEQ ID NO: 295) и HV–15 (SEQ ID NO: 124); LV–202 (SEQ ID NO: 296) и HV–15 (SEQ ID NO: 124); LV–16 (SEQ ID NO: 61) и HV–202 (SEQ ID NO: 308); LV–16 (SEQ ID NO: 61) и HV–203 (SEQ ID NO: 309); LV–16 (SEQ ID NO: 61) и HV–204 (SEQ ID NO: 310); LV–203 (SEQ ID NO: 297) и HV–15 (SEQ ID NO: 124); LV–16 (SEQ ID NO: 61) и HV–205 (SEQ ID NO: 311); LV–204 (SEQ ID NO: 298) и HV–15 (SEQ ID NO: 124); LV–205 (SEQ ID NO: 299) и HV–15 (SEQ ID NO: 124); а также LV–206 (SEQ ID NO: 300) и HV–206 (SEQ ID NO: 312).

[142] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению представляют собой антитела–агонисты TREM2 или их связывающие фрагменты. Используемый в данном документе термин "антитело" относится к тетрамерному белку иммуноглобулину, содержащему два полипептида легкой цепи (приблизительно по 25 кДа каждый) и два полипептида тяжелой цепи (приблизительно по 50–70 кДа каждый). "Антитело" представляет собой вид антигенсвязывающего белка. Термин "легкая цепь" или "легкая цепь иммуноглобулина" относится к полипептиду, содержащему от аминоконца к карбоксильному концу одну вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина (VL) и один константный домен легкой цепи (CL) иммуноглобулина. Константный домен легкой цепи (CL) иммуноглобулина может представлять собой константный домен каппа (κ) человека или лямбда (λ) человека. Термин "тяжелая цепь" или "тяжелая цепь иммуноглобулина" относится к полипептиду, содержащему от аминоконца к карбоксильному концу одну вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина (VH), константный домен 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (CH1), шарнирную область иммуноглобулина, константный домен 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (CH2), константный домен 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (CH3) и необязательно константный домен 4 тяжелой цепи иммуноглобулина (CH4). Тяжелые цепи классифицируют как мю– (μ), дельта– (Δ),

гамма– (γ), альфа– (α) и эpsilon–(ϵ) цепь, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. Классы антител IgG и IgA дополнительно делят на подклассы, а именно IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также IgA1 и IgA2, соответственно. Тяжелые цепи в антителах IgG, IgA и IgD содержат три домена (CH1, CH2 и CH3), тогда как тяжелые цепи в антителах IgM и IgE содержат четыре домена (CH1, CH2, CH3 и CH4). Константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина могут быть из любого изотипа иммуноглобулина, в том числе из любого подтипа. Цепи антитела связаны друг с другом посредством межполипептидных дисульфидных связей между доменом CL и доменом CH1 (т. е. между легкой и тяжелой цепью) и между шарнирными областями тяжелых цепей антитела.

[143] Антитела к TREM2 по настоящему изобретению могут содержать любую константную область иммуноглобулина. Используемый в данном документе термин "константная область" относится ко всем доменам антитела, отличным от вариабельной области. Константная область не участвует непосредственно в связывании антигена, но проявляет различные эффекторные функции. Как описано выше, антитела делятся на конкретные изотипы (IgA, IgD, IgE, IgG и IgM) и подтипы (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 IgA2) в зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей. Константной областью легкой цепи может быть, например, константная область легкой цепи каппа– или лямбда–типа, например, константная область легкой цепи каппа– или лямбда–типа человека, которые обнаружены во всех пяти изотипах антител. Примеры последовательностей константной области легкой цепи иммуноглобулина человека показаны в следующей таблице.

Таблица 4. Типичные константные области легкой цепи иммуноглобулина человека

Обозначение	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность домена CL
Лямбда v1 человека	191	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS
Лямбда v2 человека	192	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS
Лямбда v3 человека	193	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS
Лямбда v4 человека	194	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQ

Обозначение	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность домена CL
		VTHEGSTVEKTVAPTECS
Лямбда v5 человека	195	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWK ADGSPVKVGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CRVTHEGSTVEKTVAPAECS
Каппа v1 человека	196	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
Каппа v2 человека	197	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[144] Константная область тяжелой цепи антител к TREM2 по настоящему изобретению может представлять собой, например, константную область тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа, например, константную область тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа человека. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 содержат константную область тяжелой цепи из иммуноглобулина IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В одном варианте осуществления антитело к TREM2 содержит константную область тяжелой цепи из иммуноглобулина IgG1 человека. В таких вариантах осуществления константная область иммуноглобулина IgG1 человека может содержать одну или более мутаций для предотвращения гликозилирования антитела, как описано более подробно в данном документе. В другом варианте осуществления антитело к TREM2 содержит константную область тяжелой цепи из иммуноглобулина IgG2 человека. В еще другом варианте осуществления антитело к TREM2 содержит константную область тяжелой цепи из иммуноглобулина IgG4 человека. Примеры последовательностей константной области тяжелой цепи IgG1, IgG2 и IgG4 человека показаны ниже в таблице 5.

Таблица 5. Типичные константные области тяжелой цепи иммуноглобулина человека

Изотип Ig	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи
IgG1z человека	198	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

		KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG1za человека	199	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG1f человека	200	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG1fa человека	201	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Агликозилир ованный IgG1z v1 человека	202	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK

		SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
Агликозилированный IgG1z человека	203	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG2 человека	204	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG4 человека	205	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[145] Каждая из переменных областей легкой цепи, раскрытых в таблицах 1А, 2А и 3А, и каждая из переменных областей тяжелой цепи, раскрытых в таблицах 1В, 2В и 3В, могут быть присоединены к вышеуказанным константным областям легкой цепи (таблица 4) и константным областям тяжелой цепи (таблица 5) с образованием полной легкой и тяжелой цепей антитела, соответственно. Кроме того, каждая из образованных таким образом последовательностей тяжелых и легких цепей может быть объединена для образования полной структуры антитела. Следует понимать, что переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, представленные в данном документе, также могут быть присоединены к другим константным доменам, содержащим последовательности, отличные от примерных последовательностей, перечисленных выше.

[146] Антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению

могут представлять собой любые антитела к TREM2, описанные в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 представляет собой антитело к TREM2, выбранное из антител 12G10, 26A10, 26C10, 26F2, 33B12, 24C12, 24G6, 24A10, 10E3, 13E7, 14C12, 25F12, 32E3, 24F4, 16B8, 4C5, 6E7, 5E3 и 4G10, переменные области и последовательности CDR которых приведены в таблицах 1A и 1B. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 представляет собой антитело к TREM2, выбранное из антител 24G6, 10E3, 13E7, 4C5, 6E7 и 5E3. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 представляет собой антитело к TREM2, выбранное из антител V3, V24, V27, V40, V48, V49, V52, V60, V73, V76 и V84, переменные области и последовательности CDR которых приведены в таблицах 2A и 2B. В определенных других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 представляет собой антитело к TREM2, выбранное из антител V9, V10, V23, V30, V33, V44, V57, V68, V70, V83 и V90, переменные области и последовательности CDR которых приведены в таблицах 3A и 3B.

[147] Антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению могут представлять собой моноклональные антитела, поликлональные антитела, рекомбинантные антитела, антитела человека, гуманизированные антитела, химерные антитела или полиспецифические антитела. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 представляет собой моноклональное антитело. В таких вариантах осуществления антитело к TREM2 может представлять собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело, содержащее константный домен иммуноглобулина человека. В этих и других вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. Таким образом, антитело к TREM2 может в некоторых вариантах содержать константный домен IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В одном варианте осуществления антитело к TREM2 представляет собой моноклональное антитело IgG1 человека. В другом варианте осуществления антитело к TREM2 представляет собой моноклональное антитело IgG2 человека. В еще другом варианте осуществления антитело к TREM2 представляет собой моноклональное антитело IgG4 человека.

[148] Термин "моноклональное антитело" (или "mAb"), как используется в данном документе, относится к антителу, полученному из популяции фактически гомогенных антител, например, отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными за исключением возможных, встречающихся в природе, мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими и направлены против отдельного антигенного сайта или эпитопа, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных эпитопов. Моноклональные антитела могут быть получены с применением любой методики, известной из уровня техники, например, путем иммортализации клеток селезенки, собранных у животного после

завершения схемы иммунизации. Клетки селезенки могут быть immortalizированы с применением любой методики, известной из уровня техники, например, путем их слияния с клетками миеломы для получения гибридом. См., например, *Antibodies*; Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1^е издание, например от 1988 года, или 2^е издание, например от 2014 года. Клетки миеломы для применения в гибридома-продуцирующих процедурах гибридизации, предпочтительно представляют собой клетки, которые не продуцируют антитела, обладают высокой эффективностью гибридизации и имеют недостаток ферментов, которые делают их неспособными расти в определенных селективных средах, которые поддерживают рост только требуемых гибридных клеток (гибридомы). Примеры подходящих клеточных линий для применения в слияниях с клетками мыши включают без ограничения Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 и S194/5XXO Bul. Примеры подходящих клеточных линий, используемых для слияний с клетками крысы, включают без ограничения R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F и 4B210. Другими клеточными линиями, используемыми для гибридизации клеток, являются U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 и UC729-6.

[149] В некоторых случаях линию гибридомных клеток получают с помощью иммунизации животного (например, кролика, крысы, мыши или трансгенного животного, имеющего последовательности иммуноглобулина человека) иммуногеном TREM2 (таким как иммуногены, описанные в примере 1); сбора клеток селезенки у иммунизированного животного; гибридизации собранных клеток селезенки с линией клеток миеломы с получением тем самым клеток гибридомы; получения гибридомных клеточных линий из клеток гибридомы и определением линии гибридомных клеток, которая продуцирует антитело, связывающее TREM2 человека. Другим полезным способом получения моноклональных антител является способ SLAM, описанный в Babcook et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 93: 7843–7848, 1996.

[150] Моноклональные антитела, секретируемые линией клеток гибридомы, могут быть очищены с применением любого способа, известного из уровня техники, такого как протеин А-сефароза, гидроксилапатитная хроматография, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография. Супернатанты гибридом или mAb можно дополнительно подвергать скринингу в отношении выявления mAb с определенными свойствами, такими как способность связывать TREM2 человека, перекрестная реактивность с белками TREM2 из других видов (например, TREM2 мыши, TREM2 крысы и TREM2 макака-крабоеда), перекрестная реактивность к другим членам семейства TREM (например, TREM1 человека), способность индуцировать или усиливать TREM2-опосредованную передачу сигналов, например, с использованием анализа pSyk, как описано в данном документе, или способность индуцировать или увеличивать TREM2-опосредованную функцию или активности, как описано в данном документе (например, пролиферацию или выживаемость TREM2-экспрессирующих миелоидных клеток).

[151] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты

TREM2 по настоящему изобретению представляют собой химерные или гуманизированные антитела, основанные на последовательностях CDR и переменных областей антител к TREM2, описанных в данном документе. Химерное антитело представляет собой антитело, состоящее из сегментов белка из различных антител, которые ковалентно соединены с образованием функциональных легких или тяжелых цепей иммуноглобулина или их связывающих фрагментов. Как правило, часть тяжелой цепи и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующей последовательности в антителах, полученных из определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, тогда как остальная(–ые) часть(–и) цепи(–ей) идентична(–ы) или гомологична(–ы) соответствующей последовательности в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител. Для способов, относящихся к химерным антителам, см., например, патент США № 4816567 и Morrison et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851–6855, каждый из которых настоящим включен посредством ссылки.

[152] Как правило, целью получения химерного антитела является создание химерной конструкции, в которой количество аминокислот из предполагаемых видов является максимальным. Одним из примеров является "CDR–привитое" антитело, в котором антитело содержит одну или более CDR из конкретного вида или принадлежащих определенному классу или подклассу антител, тогда как остальная(–ые) часть(–и) цепи(–ей) идентична(–ы) или гомологична(–ы) соответствующей последовательности в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих другому классу или подклассу антител. Прививание CDR описано, например, в патенте США № 6180370, № 5693762, № 5693761, № 5585089 и № 5530101. В случае применения на людях переменную область или отобранные CDR из антитела грызуна или кролика зачастую трансплантируют в антитело человека, заменяя встречающиеся в природе переменные области или CDR антитела человека.

[153] Одним из применимых типов химерных антител является "гуманизированное" антитело. Как правило, гуманизированное антитело получают из моноклонального антитела, первоначально происходящего из нечеловекоподобного животного, например грызуна или кролика. Некоторые аминокислотные остатки в этом моноклональном антителе, как правило, из участков антитела, которые не распознают антиген, модифицируют так, чтобы они были гомологичными соответствующим остаткам в антителе человека соответствующего изотипа. Гуманизация может проводиться, например, с применением различных способов посредством замены по меньшей мере части переменной области грызуна или кролика на соответствующие области антитела человека (см., например, патент США № 5585089 и № 5693762; Jones et al., 1986, Nature 321:522–525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323–27 и Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534–1536).

[154] В одном аспекте CDR переменных областей легкой и тяжелой цепей антител, предусмотренных в данном документе (см. таблицы 1A, 1B, 2A, 2B, 3A и 3B),

трансплантируют в каркасные области (FR) из антител одного или разных филогенетических видов. Например, CDR переменных областей тяжелой и легкой цепей, перечисленных в таблицах 1A, 1B, 2A, 2B, 3A и 3B, могут быть привиты к консенсусным FR человека. Для создания консенсусных FR человека FR из нескольких аминокислотных последовательностей тяжелой цепи или легкой цепей человека могут быть выровнены для идентификации консенсусной аминокислотной последовательности. Как альтернатива, трансплантированные переменные области из одной тяжелой или легкой цепи могут применяться с константной областью, которая отличается от константной области определенной тяжелой или легкой цепи, как описано в данном документе. В других вариантах осуществления трансплантированные переменные области являются частью одноцепочечного антитела Fv.

[155] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению являются полностью человеческими антителами. Полностью человеческие антитела, которые специфически связываются с TREM2 человека, могут быть получены с применением иммуногенов или их фрагментов, описанных в данном документе, таких как полипептиды, состоящие из последовательностей под SEQ ID NO: 1 и 2, или иммуногенов, описанных в примере 1. "Полностью человеческое антитело" представляет собой антитело, которое содержит переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов человека зародышевого типа или указывающие на них. Одним конкретным способом, предложенным для осуществления получения полностью человеческих антител, является "гуманизация" гуморальной иммунной системы мыши. Внесение иммуноглобулиновых локусов человека (Ig) в геном мышей, у которых были инактивированы эндогенные гены Ig, является одним из способов получения полностью человеческих моноклональных антител (mAb) в мыши – животном, которое можно иммунизировать любым требуемым антигеном. Применение полностью человеческих антител может минимизировать иммуногенные и аллергические реакции, которые иногда могут быть вызваны введением людям в качестве терапевтических средств из мыши или mAb, полученных из мыши.

[156] Полностью человеческие антитела могут быть получены посредством иммунизации трансгенных животных (обычно мышей), которые способны продуцировать репертуар антител человека в отсутствие продукции эндогенного иммуноглобулина. Применяемые для этой цели антигены, как правило, содержат шесть или больше смежных аминокислот и необязательно конъюгированы с носителем, таким как гаптен. См. например, Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551–2555; Jakobovits et al., 1993, Nature 362:255–258 и Bruggermann et al., 1993, Year in Immunol. 7:33. В одном примере такого способа трансгенных животных получают путем нейтрализации эндогенных иммуноглобулиновых локусов мыши, кодирующих тяжелые и легкие цепи иммуноглобулина мыши, и вставки в геном мыши больших фрагментов геномной ДНК человека, содержащей локусы, которые кодируют белки тяжелых и легких цепей

человека. Затем частично модифицированных животных, которые имеют неполный набор локусов иммуноглобулинов человека, подвергают кроссбридингу с получением животного, обладающего всеми требуемыми модификациями иммунной системы. В случае введения иммуногена эти трансгенные животные продуцируют антитела, которые являются иммуноспецифическими к данному иммуногену, однако имеют скорее человеческие, а не мышинные аминокислотные последовательности, в том числе переменные области. Для дополнительной информации по таким способам см., например, WO96/33735 и WO94/02602. Дополнительные способы, относящиеся к применению трансгенных мышей для получения антител человека, описаны в патенте США № 5545807; № 6713610; № 6673986; № 6162963; № 5939598; № 5545807; № 6300129; № 6255458; № 5877397; № 5874299 и № 5545806; в публикациях согласно РСТ WO91/10741, WO90/04036, WO 94/02602, WO 96/30498, WO 98/24893, а также в EP 546073B1 и EP 546073A1.

[157] Описанные выше трансгенные мыши, обозначенные в данном документе как мыши "HuMab", содержат минилокус гена иммуноглобулина человека, который кодирует неперестроенные последовательности тяжелой (мю и гамма) и легкой каппа цепей иммуноглобулина человека наряду с направленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы мю и каппа цепей (Lonberg et al., 1994, Nature 368:856–859). Соответственно, эти мыши проявляют сниженную экспрессию IgM или каппа белков мыши, и в ответ на иммунизацию введенные трансгены тяжелой и легкой цепей человека претерпевают переключение класса и соматическую мутацию с образованием высокоаффинных моноклональных антител IgG каппа человека (Lonberg and Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13: 65–93; Harding and Lonberg, 1995, Ann. N.Y Acad. Sci. 764:536–546). Получение мышей HuMab описано подробно в Taylor et al., 1992, Nucleic Acids Research 20:6287–6295; Chen et al., 1993, International Immunology 5:647–656; Tuaillon et al., 1994, J. Immunol. 152:2912–2920; Lonberg et al., 1994, Nature 368:856–859; Lonberg, 1994, Handbook of Exp. Pharmacology 113:49–101; Taylor et al., 1994, International Immunology 6:579–591; Lonberg and Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13:65–93; Harding and Lonberg, 1995, Ann. N.Y Acad. Sci. 764:536–546; Fishwild et al., 1996, Nature Biotechnology 14:845–851; указанные выше ссылки включены в данный документ посредством ссылки в их полном объеме для всех целей. См. дополнительно патент США № 5545806; № 5569825; № 5625126; № 5633425; № 5789650; № 5877397; № 5661016; № 5814318; № 5874299 и № 5770429; а также патент США № 5545807; международные публикации №№ WO 93/1227; WO 92/22646 и WO 92/03918, раскрытия всех из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей. Технологии, применяемые для получения человеческих антител в этих трансгенных мышях, описаны также в WO 98/24893 и Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15:146–156, которые включены посредством ссылки. Например, штаммы трансгенных мышей HCo7 и HCo12 можно применять для получения полностью человеческих антител к TREM2. Одной конкретной линией трансгенных мышей, подходящей для получения полностью

человеческих антител к TREM, являются трансгенные мыши XenoMouse[®], описанные в примере 1 и в патентах США №№ 6114598; 6162963; 6833268; 7049426; 7064244; Green et al., 1994, *Nature Genetics* 7:13–21; Mendez et al., 1997, *Nature Genetics* 15:146–156; Green and Jakobovitis, 1998, *J. Ex. Med.*, 188:483–495; Green, 1999, *Journal of Immunological Methods* 231:11–23; Kellerman and Green, *Current Opinion in Biotechnology* 13, 593–597, 2002, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[158] Антитела человеческого происхождения также могут быть получены с применением методик фагового дисплея. Фаговый дисплей описан, например, в Dower et al., WO 91/17271, McCafferty et al., WO 92/01047, and Caton and Koprowski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6450–6454 (1990), содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Антитела, полученные с помощью фаговой технологии, как правило, получают в виде антигенсвязывающих фрагментов, например фрагментов Fv или Fab у бактерий, а следовательно они лишены эффекторных функций. Эффекторные функции могут быть представлены одной из двух стратегий. Фрагменты могут быть встроены либо в полные антитела для экспрессии в клетках млекопитающих, либо в фрагменты биспецифических антител со вторым сайтом связывания, способным запускать эффекторную функцию, если это требуется. Как правило, фрагмент Fd (VH–CH1) и легкую цепь (VL–CL) антител отдельно клонируют с помощью ПЦР и случайным образом рекомбинируют в комбинаторных фаг-дисплейных библиотеках, которые затем могут быть отобраны для связывания с конкретным антигеном. Фрагменты антител экспрессируются на поверхности фага, и отбор Fv или Fab (а следовательно фага, содержащего ДНК, кодирующую фрагмент антитела) путем связывания антигена осуществляется посредством нескольких раундов связывания и повторной амплификации антигена, – процедуры, называемой пэннингом. Фрагменты антител, специфические для антигена, обогащаются и, наконец, выделяются. Техники фагового дисплея также можно применять в подходе для гуманизации моноклональных антител грызунов, называемом "управляемым отбором" (см. Jespers, L. S., et al., *Bio/Technology* 12, 899–903 (1994)). Для этого фрагмент Fd моноклонального антитела мыши может быть отображен в комбинации с библиотекой легкой цепи человека, и полученная в результате гибридная библиотека Fab может быть затем отобрана с помощью антигена. Таким образом, фрагмент Fd мыши обеспечивает шаблон для отбора. Затем отобранные легкие цепи человека объединяют с библиотекой фрагментов Fd человека. Отбор полученной библиотеки дает полностью человеческий Fab.

[159] Как только клетки, продуцирующие антитела к TREM2 по настоящему изобретению, были получены с применением любой из описанных выше иммунизации и других методик, гены специфических антител могут быть клонированы путем выделения и амплификации из них ДНК или mRNA в соответствии со стандартными процедурами, описанными в данном документе. Полученные из них антитела можно секвенировать, и идентифицированными CDR и ДНК, кодирующими CDR, можно манипулировать, как

описано в данном документе, для получения других антигенсвязывающих белков–агонистов TREM2 или антител по настоящему изобретению.

[160] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению (например, моноклональные антитела или их связывающие фрагменты) конкурируют за связывание с TREM2 человека (SEQ ID NO: 1) или внеклеточным доменом TREM2 человека (SEQ ID NO: 2) с эталонным антителом, таким как одно или более из антител к TREM2, описанных в данном документе. Термин "конкурировать" относится к способности антитела или другого антигенсвязывающего белка препятствовать связыванию других антител или связывающих фрагментов с мишенью (например, TREM2 человека). Степень, с которой антитело или связывающий фрагмент способны мешать связыванию другого антитела или связывающего фрагмента с мишенью (например, TREM2 человека), а следовательно можно ли сказать о нем, что оно конкурирует, можно определить с помощью анализов конкурентного связывания. Можно использовать большое количество видов анализов конкурентного связывания, в том числе например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич–анализ (см., например, Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242–253); твердофазный прямой EIA с биотином–авидином (см., например, Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614–3619), твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич–анализ с прямым мечением (см., например, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный RIA с прямым мечением с использованием в качестве метки I–125 (см., например, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7–15); твердофазный прямой EIA с биотином–авидином (см., например, Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546–552); анализы на основе поверхностного плазмонного резонанса (например, с применением систем Biacore®); анализы на основе интерферометрии на биологическом слое (например, с применением систем Octet®) и RIA с прямым мечением (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77–82). Как правило, анализ конкурентного связывания предусматривает применение очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью или клетками, несущими антиген, немеченого исследуемого антитела или другого антигенсвязывающего белка и меченого эталонного антитела или другого антигенсвязывающего белка. Конкурентное ингибирование измеряют, определяя количество метки, связанной с твердой поверхностью, или клеток в присутствии исследуемого антитела или другого антигенсвязывающего белка. Обычно исследуемое антитело или другой антигенсвязывающий белок присутствует в избытке. Антитела или другие антигенсвязывающие белки, идентифицированные с помощью конкурентного анализа (т. е. конкурирующие антитела и антигенсвязывающие белки), включают антитела и антигенсвязывающие белки, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело или антигенсвязывающий белок. Обычно, в случае если конкурирующее антитело или антигенсвязывающий белок присутствуют в избытке, они будут ингибировать специфическое связывание эталонного антитела или антигенсвязывающего

белка с целевым антигеном на по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% или 75%. В некоторых случаях связывание эталонного антитела или другого антигенсвязывающего белка ингибируется на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 97% или больше. В некоторых вариантах осуществления конкурирующий антигенсвязывающий белок (например, антитело или его связывающий фрагмент) уменьшает связывание эталонного антитела с TREM2 человека от приблизительно 40% до приблизительно 100%, например, от приблизительно 60% до приблизительно 100%, в частности, от приблизительно 70% до приблизительно 100% и более конкретно от приблизительно 80% до приблизительно 100%.

[161] В особенно подходящем количественном анализе для выявления конкурентного связывания применяют аппарат Biacore[®], который измеряет степень взаимодействия с применением технологии поверхностного плазмонного резонанса. Типичный анализ конкурентного связывания на основе Biacore[®] предусматривает иммобилизацию эталонного антитела на сенсорном чипе. Затем целевой антиген связывается с сенсорным чипом, где целевой антиген захватывается иммобилизованным эталонным антителом. Затем исследуемые антитела вводят поверх захваченного целевого антигена. Если введенное исследуемое антитело распознает эпитоп, отличный от эпитопа, распознаваемого иммобилизованным антителом, то наблюдается второе событие связывания и считается, что исследуемое антитело не конкурирует за связывание с целевым антигеном с эталонным антителом.

[162] В другом особенно подходящем анализе для выявления конкурентного связывания применяют кинетические датчики, используемые с системами Octet[®] (Pall ForteBio), посредством которых измеряют взаимодействия связывания с применением методологии интерферометрии биослоя. Такой анализ описан в примере 4, в котором каждое из шестнадцати различных антител к TREM2, описанных в данном документе, оценивают одно относительно другого в отношении возможности конкурировать за связывание с TREM2. Результаты анализа, представленные в таблице 9, показывают, что шестнадцать различных антител могут быть сгруппированы в четыре разных эпитопных бина. То есть одна группа антител (антитела 10E3, 13E7, 24F4, 4C5, 4G10, 32E3 и 6E7) конкурировали друг с другом за связывание с TREM2 человека, что указывает на то, что они имеют такой же или аналогичный эпитоп на TREM2 человека. Антитела 16B8, 26A10, 26C10, 26F2, 33B12 и 5E3 конкурировали друг с другом за связывание с TREM2, но не конкурировали с антителами в первой группе или антителами 24A10, 24G6 или 25F12, что указывает на то, что указанная вторая группа антител связывается с отличающимся эпитопом на TREM2 человека. Антитела 24A10 и 24G6 имеют одинаковый эпитоп на TREM2 человека, так как эти два антитела конкурировали друг с другом за связывание с TREM2 человека, но не конкурировали ни с каким другим антителом. Антитело 25F12 не конкурирует ни с одним из других исследуемых антител за связывание с TREM2 человека, что указывает на то, что это антитело связывается с другим эпитопом.

[163] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист

TREM2 по настоящему изобретению конкурирует с эталонным антителом за связывание с TREM2 человека, где эталонное антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 46–63, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 110–126. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 по настоящему изобретению конкурирует с эталонным антителом за связывание с TREM2 человека, где эталонное антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 153–162, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 180–190. В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 по настоящему изобретению конкурирует с эталонным антителом за связывание с TREM2 человека, где эталонное антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 61 и 295–300, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 124 и 307–312. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 по настоящему изобретению конкурирует за связывание с TREM2 человека с одним или более антителами к TREM2, описанными в данном документе, в том числе 12G10, 26A10, 26C10, 26F2, 33B12, 24C12, 24G6, 24A10, 10E3, 13E7, 14C12, 25F12, 32E3, 24F4, 16B8, 4C5, 6E7, 5E3, 4G10, V3, V9, V10, V23, V24, V27, V30, V33, V40, V44, V48, V49, V52, V57, V60 V68, V70, V73, V76, V83, V84 и V90.

[164] В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 конкурирует с эталонным антителом за связывание с TREM2 человека, где эталонное антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 61, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 124. В таких вариантах осуществления антигенсвязывающие белки, которые конкурируют с этим эталонным антителом за связывание с TREM2 человека, будут связывать тот же или аналогичный эпитоп, что и антитело 6E7 или любое другое антитело в эпитопной группе А (например, 10E3, 13E7, 24F4, 4C5, 4G10, 32E3), как описано в примере 4.

[165] В другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 конкурирует с эталонным антителом за связывание с TREM2 человека, где эталонное антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 62, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 125. В таких вариантах осуществления антигенсвязывающие белки, которые конкурируют с этим эталонным антителом за связывание с TREM2 человека, будут связывать тот же или аналогичный эпитоп, что и антитело 5E3 или любое другое антитело в эпитопной группе В (например, 16B8, 26A10, 26C10, 26F2, 33B12), как описано в примере 4.

[166] В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 конкурирует с эталонным антителом за связывание с TREM2 человека, где

эталонное антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 52, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 115. В таких вариантах осуществления антигенсвязывающие белки, которые конкурируют с этим эталонным антителом за связывание с TREM2 человека, будут связывать тот же или аналогичный эпитоп, что и антитело 24G6 или антитело 24A10 (эпитопная группа C, как описано в примере 4).

[167] В еще другом варианте осуществления антигенсвязывающий белок-агонист TREM2 конкурирует с эталонным антителом за связывание с TREM2 человека, где эталонное антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 56, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 119. В таких вариантах осуществления антигенсвязывающие белки, которые конкурируют с этим эталонным антителом за связывание с TREM2 человека, будут связывать тот же или аналогичный эпитоп, что и антитело 25F12 (эпитопная группа D, как описано в примере 4).

[168] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению могут содержать одну или более мутаций или модификаций в константной области. Например, в вариантах осуществления, в которых антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 содержат Fc-область (например, моноклональные антитела), константные области тяжелой цепи или Fc-области антигенсвязывающих белков (например, моноклональные антитела), могут содержать одну или более аминокислотных замен которые влияют на гликозилирование, эффекторную функцию и/или связывание с Fcγ-рецептором антигенсвязывающего белка.

[169] Термин "Fc-область" относится к C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая может быть получена путем расщепления с помощью папаина интактного антитела. Fc-область иммуноглобулина обычно содержит два константных домена, домен CH2 и домен CH3, и необязательно содержит домен CH4. В определенных вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область иммуноглобулина IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит домены CH2 и CH3 из иммуноглобулина IgG1 человека или IgG2 человека. Fc-область может сохранять эффекторную функцию, такую как связывание C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), связывание с рецептором Fc, антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) и фагоцитоз. В других вариантах осуществления Fc-область может быть модифицирована для уменьшения или устранения эффекторной функции, как описано более подробно ниже.

[170] Одна из функций Fc-области иммуноглобулина заключается в том, чтобы сообщать иммунной системе, в случае если иммуноглобулин связывается со своей мишенью. Это обычно называют "эффекторной функцией". Связь осуществляется посредством ADCC, антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и/или CDC. ADCC и ADCP опосредуются связыванием Fc-области с рецепторами Fc на поверхности клеток иммунной системы. CDC опосредуется посредством связывания Fc с белками

системы комплемента, например C1q. В некоторых вариантах антигенсвязывающие белки, например моноклональные антитела по настоящему изобретению, содержат одну или более аминокислотных замен в Fc-области для усиления эффекторной функции, в том числе активности ADCC, активности CDC, активности ADCCP и/или клиренса или увеличения периода полужизни антигенсвязывающего белка. Типичные аминокислотные замены (согласно системе нумерации EU), которые могут усиливать эффекторную функцию, включают без ограничения E233L, L234I, L234Y, L235S, G236A, S239D, F243L, F243V, P247I, D280H, K290S, K290E, K290N, K290Y, R292P, E294L, Y296W, S298A, S298D, S298V, S298G, S298T, T299A, Y300L, V305I, Q311M, K326A, K326E, K326W, A330S, A330L, A330M, A330F, I332E, D333A, E333S, E333A, K334A, K334V, A339D, A339Q, P396L или комбинации любых из вышеперечисленных.

[171] В других вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 (например, моноклональные антитела) по настоящему изобретению содержат одну или более аминокислотных замен в константной области тяжелой цепи для снижения эффекторной функции. Типичные аминокислотные замены (согласно системе нумерации EU), которые могут снижать эффекторную функцию, включают без ограничения C220S, C226S, C229S, E233P, L234A, L234V, V234A, L234F, L235A, L235E, G237A, P238S, S267E, H268Q, N297A, N297G, V309L, E318A, L328F, A330S, A331S, P331S или комбинации любых из вышеперечисленных.

[172] Гликозилирование может способствовать эффекторной функции антител, в частности антител IgG1. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению могут содержать одну или более аминокислотных замен, которые влияют на уровень или тип гликозилирования связывающих белков. Гликозилирование полипептидов обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанный относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин–X–серин и аспарагин–X–треонин, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикарбоксильной группе, наиболее часто серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

[173] В определенных вариантах осуществления гликозилирование описанных в данном документе антигенсвязывающих белков–агонистов TREM2 увеличивается путем добавления одного или более сайтов гликозилирования, например к Fc-области связывающего белка. Добавление сайтов гликозилирования к антигенсвязывающему белку может быть с удобством осуществлено путем модификации аминокислотной

последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Перестройка также может быть осуществлена путем добавления или замены одного или более сериновых или треониновых остатков к исходной последовательности (для O-связанных сайтов гликозилирования). Для ясности, аминокислотная последовательность антигенсвязывающего белка может быть изменена посредством изменений на уровне ДНК, в частности, путем мутации ДНК, кодирующей целевой полипептид, в предварительно выбранных основаниях, так что образуются кодоны, которые будут транслироваться в требуемые аминокислоты.

[174] Настоящее изобретение также охватывает получение молекул антигенсвязывающего белка-агониста TREM2 с измененной структурой углеводов, что приводит в результате к измененной эффекторной активности, в том числе к антигенсвязывающим белкам с отсутствующим или пониженным фукозилированием, которые проявляют улучшенную активность ADCC. Из уровня техники известны различные способы уменьшения или исключения фукозилирования. Например, эффекторная активность ADCC опосредуется связыванием молекулы антитела с рецептором FcγRIII, который, как было показано, зависит от углеводной структуры N-связанного гликозилирования у остатка N297 домена CH2. Нефукозилированные антитела связываются с этим рецептором с повышенной аффинностью и запускают эффекторные функции, опосредуемые FcγRIII, более эффективно, чем нативные, фукозилированные антитела. Например, рекомбинантное получение нефукозилированного антитела в клетках СНО, в которых фермент альфа-1,6-фукозилтрансфераза был нокаутирован, приводит к получению антитела со 100-кратно повышенной активностью ADCC (см. Yamane-Ohnuki et al., *Biotechnol Bioeng.* 87(5):614–22, 2004). Подобные эффекты могут быть достигнуты посредством снижения активности фермента альфа-1,6-фукозилтрансферазы или других ферментов в пути фукозилирования, например, посредством обработки siRNA или антисмысловой РНК, конструирования клеточных линий для нокаута фермента(ов) или культивирования с селективными ингибиторами гликозилирования (см. Rothman et al., *Mol Immunol.* 26 (12): 1113–23, 1989). Некоторые штаммы клеток-хозяев, например Lec13 или клеточная линия гибридомы YB2/0 крысы, естественным путем продуцируют антитела с более низкими уровнями фукозилирования (см. Shields et al., *J Biol Chem.* 277(30):26733–40, 2002 и Shinkawa et al., *J Biol Chem.* 278(5):3466–73, 2003). Также было установлено, что увеличение уровня разветвленных углеводов, например, посредством рекомбинантного продуцирования антитела в клетках, которые сверхэкспрессируют фермент GnTIII, также вызывает повышение активности ADCC (см. Umana et al., *Nat Biotechnol.* 17(2):176–80, 1999).

[175] В других вариантах осуществления гликозилирование описанных в данном документе антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 снижается или устраняется путем удаления одного или более сайтов гликозилирования, например из Fc-области связывающего белка. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–

агонист TREM2 представляет собой агликозилированное моноклональное антитело человека, например агликозилированное моноклональное антитело человека к IgG1. Аминокислотные замены, которые исключают или модифицируют N-связанные сайты гликозилирования, могут уменьшать или исключать N-связанное гликозилирование антигенсвязывающего белка. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2, описанные в данном документе, содержат мутацию в положении N297 (согласно системе нумерации EU), такую как N297Q, N297A или N297G. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат Fc-область антитела IgG1 человека с мутацией в положении N297. В одном конкретном варианте осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат Fc-область антитела IgG1 человека с мутацией N297G. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 202.

[176] Для улучшения стабильности молекул, содержащих мутацию N297, Fc-область антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 может быть дополнительно сконструирована с помощью генной инженерии. Например, в некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислот в Fc-области заменены цистеином в целях содействия образованию дисульфидной связи в димерном состоянии. Таким образом, остатки, соответствующие V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 (согласно системе нумерации EU) Fc-области IgG1, могут быть замещены цистеином. Предпочтительно, конкретные пары остатков замещены цистеином так, что они предпочтительно образуют дисульфидную связь друг с другом, ограничивая таким образом или предотвращая скремблирование дисульфидной связи. Предпочтительные пары включают без ограничения A287C и L306C, V259C и L306C, R292C и V302C и V323C и I332C. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2, описанные в данном документе, содержат Fc-область антитела IgG1 человека с мутациями R292C и V302C. В таких вариантах осуществления Fc-область также может содержать мутацию N297, такую как мутация N297G. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 203.

[177] Модификации шарнирной области и/или домена CH1 тяжелой цепи и/или константной области легкой цепи антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 (например, моноклональных антител) по настоящему изобретению могут быть созданы для уменьшения или устранения дисульфидной гетерогенности. Структурная гетерогенность антител IgG2 наблюдалась в случае, в случае если дисульфидные связи в шарнирных областях и областях CH1 антител IgG2 можно перетасовывать для создания различных структурных дисульфидных изоформ (IgG2A, IgG2B и IgG2A-B), которые

могут иметь разные уровни активности. См., например, Dillon et al., J. Biol. Chem., Vol. 283: 16206–16215; Martinez et al., Biochemistry, Vol. 47: 7496–7508, 2008 и White et al., Cancer Cell, Vol. 27: 138–148, 2015. Аминокислотные замены могут быть выполнены в шарнирной области, домене CH1 и/или константной области легкой цепи для стимулирования образования одной дисульфидной изоформы или заключения антигенсвязывающего белка (например, моноклонального антитела) в конкретную дисульфидную изоформу (например, IgG2A или IgG2B). Такие мутации описаны в WO 2009/036209 и White et al., Cancer Cell, Vol. 27: 138–148, 2015, оба из которых включены в данный документ посредством ссылки в их полном объеме и включают мутации C131S, C219S и C220S (согласно системе нумерации EU) в тяжелой цепи и мутацию C214S (согласно системе нумерации EU) в легкой цепи. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению представляют собой антитела–агонисты TREM2 IgG2 человека. В некоторых таких вариантах осуществления антитела–агонисты TREM2 содержат в своих тяжелых цепях мутацию C131S (согласно системе нумерации EU). В других вариантах осуществления антитела–агонисты TREM2 содержат в своих легких цепях мутацию C214S (согласно системе нумерации EU) и в своих тяжелых цепях мутацию C220S (согласно системе нумерации EU). В еще других вариантах осуществления антитела–агонисты TREM2 содержат в своих легких цепях мутацию C214S (согласно системе нумерации EU) и в своих тяжелых цепях мутацию C219S (согласно системе нумерации EU).

[178] В других вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению представляют собой антитела–агонисты TREM2, содержащие область CH1 и шарнирную область из антитела IgG2 человека и Fc–область из антитела IgG1 человека. Сообщалось, что уникальное расположение дисульфидных связей в шарнирной области антител IgG2 придает усиленную стимулирующую активность для некоторых противоопухолевых антител (White et al, Cancer Cell, Vol. 27: 138–148, 2015). Такая повышенная активность может быть перенесена на антитела типа IgG1 путем замены области CH1 и шарнирной области антитела IgG1 на те, которые находятся в антителе IgG2 (White et al., 2015). Шарнирная область IgG2 включает аминокислотную последовательность ERKCCVECPCP (SEQ ID NO: 206). Аминокислотная последовательность CH1 и шарнирных областей антитела IgG2 человека может содержать аминокислотную последовательность ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KCCVECPCP (SEQ ID NO: 207). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитела–агонисты TREM2 содержат последовательность под SEQ ID NO: 207 в комбинации с Fc–областью из антитела IgG1 человека. В таких вариантах осуществления антитела к TREM2 могут содержать одну или более описанных выше мутаций для заключения антител к TREM2 в конкретную дисульфидную изоформу. Например, в одном варианте осуществления антитело к TREM2

содержит область CH1 и шарнирную область из антитела IgG2 человека и Fc-область из антитела IgG1 человека и содержит в своей тяжелой цепи мутацию C131S (согласно системе нумерации EU). В другом варианте осуществления антитело к TREM2 содержит область CH1 и шарнирную область из антитела IgG2 человека и Fc-область из антитела IgG1 человека и содержит в своей легкой цепи мутацию C214S (согласно системе нумерации EU) и в своей тяжелой цепи мутацию C220S (согласно системе нумерации EU). В еще другом варианте осуществления антитело к TREM2 содержит область CH1 и шарнирную область из антитела IgG2 человека и Fc-область из антитела IgG1 человека и содержит в своей легкой цепи мутацию C214S (согласно системе нумерации EU) и в своей тяжелой цепи мутацию C219S (согласно системе нумерации EU).

[179] В вариантах осуществления, в которых антитело к TREM2 содержат область CH1 и шарнирную область из антитела IgG2 человека и Fc-область из антитела IgG1 человека, антитело к TREM2 могут содержать любую из описанных выше мутаций в Fc-области для модуляции гликозилирования антител. Например, Fc-область IgG1 человека таких антител к TREM2 может содержать в своей тяжелой цепи мутацию в положении аминокислоты N297 (согласно системе нумерации EU). В одном конкретном варианте осуществления мутация N297 представляет собой мутацию N297G. В определенных вариантах осуществления Fc-область может дополнительно содержать в своей тяжелой цепи мутации R292C и V302C (согласно системе нумерации EU).

[180] В определенных вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат область CH1 и шарнирную область из антитела IgG2 человека и Fc-область из антитела IgG1 человека, где Fc-область содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 281).

[181] В других вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат область CH1 и шарнирную область из антитела IgG2 человека и Fc-область из антитела IgG1 человека, где Fc-область содержит аминокислотную последовательность:

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 282).

[182] Также могут быть желательны модификации антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 по настоящему изобретению для увеличения периода полужизни в сыворотке, например, путем включения или добавления эпитопа, связывающегося с рецептором реутилизации (например, с помощью мутации соответствующей области или с помощью включения эпитопа в пептидную метку, которая затем сливается с

антигенсвязывающим белком на любом конце или в середине, например, с помощью синтеза ДНК или пептида см., например, WO96/32478) или добавления молекул, таких как PEG или другие водорастворимые полимеры, включая полисахаридные полимеры. Эпитоп, связывающийся с рецептором реутилизации, предпочтительно представляет собой область, в которой любой один или более аминокислотных остатков из одной или двух петель Fc-области переносятся в аналогичное положение в антигенсвязывающем белке. Еще более предпочтительно, переносятся три или больше остатков из одной или двух петель Fc-области. Еще более предпочтительно, эпитоп взят из домена CH2 Fc-области (например, Fc-области IgG) и перенесен в область CH1, CH3 или VH или в более чем одну такую область антигенсвязывающего белка. Как альтернатива, эпитоп взят из домена CH2 Fc-области и перенесен на область CL или область VL или обе области антигенсвязывающего белка. См. международные заявки WO 97/34631 и WO 96/32478 для описания вариантов Fc и их взаимодействия с рецептором реутилизации.

[183] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 334, и тяжелую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 335. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 334, и тяжелую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 336. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 337, и тяжелую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 338. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 339, и тяжелую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 340. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 341, и тяжелую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 342.

[184] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат легкую цепь, состоящую или фактически состоящую из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 334, 337, 339 или 341. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат тяжелую цепь, состоящую или фактически состоящую из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 335, 336, 338, 340 или 342. В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению содержат легкую цепь и тяжелую цепь, где (a) легкая цепь состоит или фактически состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 334, и тяжелая цепь состоит или фактически состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 335; (b) легкая цепь состоит или фактически состоит

из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 334, и тяжелая цепь состоит или фактически состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 336; (с) легкая цепь состоит или фактически состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 337, и тяжелая цепь состоит или фактически состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 338; (d) легкая цепь состоит или фактически состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 339, и тяжелая цепь состоит или фактически состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 340; или (е) легкая цепь состоит или фактически состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 341, и тяжелая цепь состоит или фактически состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 342.

[185] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению являются "биспецифическими", что означает то, что они способны специфически связываться с двумя разными антигенами, TREM2 человека и вторым антигеном. В определенных вариантах осуществления второй антиген представляет собой белок, который облегчает транспорт через гематоэнцефалический барьер, такой как рецептор, который опосредует транспорт через гематоэнцефалический барьер. Такие рецепторы включают без ограничения рецептор инсулина, рецептор трансферрина, рецептор лептина, рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF), рецепторы липопротеинов низкой плотности (например, белок 8, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности (LRP8), белок 1, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности (LRP1), белок 2, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности (LRP2)), гепарин–связывающий фактор роста, подобный эпидермальному фактору роста, тяжелая цепь CD98 (CD98hc), базигин, трансмембранный белок 30A человека (TMEM30A) и транспортер глюкозы типа 1 (Glut1). В одном варианте осуществления второй антиген представляет собой рецептор инсулина человека. В одном варианте осуществления второй антиген представляет собой инсулиноподобный рецептор роста человека. В другом варианте осуществления второй антиген представляет собой рецептор трансферрина человека. В одном варианте осуществления второй антиген представляет собой TMEM30A. В любом из этих случаев домен, связывающий TREM2 человека, может находиться на N–терминальном конце или C–терминальном конце поливалентного биспецифического (IgG–Fab, IgG–scFv) или экспрессироваться в форматах мультиспецифического связывания, описанных в Spiess, C. et al., *Molecular Immunology* 67, 95–106 (2015) и Brinkman, U. et al., *MABS* 9(2)182–212 (2017).

[186] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 являются поливалентными. Валентность связывающего белка означает количество отдельных антигенсвязывающих доменов в связывающем белке. Например, термины "одновалентный", "бивалентный" и "четыревалентный" применительно к антигенсвязывающим белкам по настоящему изобретению относятся к связывающим белкам с одним, двумя и четырьмя антигенсвязывающими доменами, соответственно.

Таким образом, поливалентный антигенсвязывающий белок содержит два или больше антигенсвязывающих домена. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению являются бивалентными. Таким образом, такие биспецифические, бивалентные антигенсвязывающие белки содержат два антигенсвязывающих домена: один антигенсвязывающий домен, связывающийся с TREM2 человека, и один антигенсвязывающий домен, связывающийся со вторым антигеном, таким как антиген, который облегчает транспорт через гематоэнцефалический барьер. В других вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки являются поливалентными. Например, в некоторых вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки являются трехвалентными или четырехвалентными, содержащими три или четыре антигенсвязывающих домена: один или два антигенсвязывающих домена, связывающихся с TREM2 человека, и один или два антигенсвязывающих домена, связывающихся со вторым антигеном, таким как антиген, который облегчает транспорт через гематоэнцефалический барьер.

[187] Термин "антигенсвязывающий домен", который используется взаимозаменяемо со "связывающим доменом", относится к области антигенсвязывающего белка, которая содержит аминокислотные остатки, взаимодействующие с антигеном и придающие антигенсвязывающему белку его специфичность и аффинность к антигену. Связывающий домен может быть получен из антитела или его функционального фрагмента, который специфически связывается с антигеном. В определенных вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению содержат один антигенсвязывающий домен, связывающийся с TREM2 человека, и один антигенсвязывающий домен, связывающийся с инсулиновым рецептором человека. В других вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению содержат один антигенсвязывающий домен, связывающийся с TREM2 человека, и один антигенсвязывающий домен, связывающийся с рецептором трансферрина человека. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению содержат два антигенсвязывающих домена, связывающихся с TREM2 человека, и два антигенсвязывающих домена, связывающихся с инсулиновым рецептором человека. В других вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению содержат два антигенсвязывающих домена, связывающихся с TREM2 человека, и два антигенсвязывающих домена, связывающихся с рецептором трансферрина человека. В одном варианте осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению содержат один или два антигенсвязывающих домена, связывающихся с TREM2 человека, и один или два антигенсвязывающих домена, связывающихся с инсулиноподобным рецептором роста человека. В одном варианте осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению содержат один или два антигенсвязывающих домена, связывающихся с

TREM2 человека, и один или два антигенсвязывающих домена, связывающихся с TMEM30A. Антигенсвязывающие домены, связывающиеся с TREM2 человека, биспецифических антигенсвязывающих белков–агонистов TREM2 могут быть получены из любых антител–агонистов к TREM2, описанных в данном документе. Антигенсвязывающие домены, связывающиеся с инсулиновым рецептором человека, инсулиноподобным рецептором роста человека, TMEM30A или рецептором трансферрина человека, могут быть получены из моноклональных антител к этим рецепторам, известных из уровня техники, таких как описанные в патенте США № 7388079; патенте США № 8663598 и патентной публикации США № 2015/0110791, Abulrob, A. et al., J. Neurochem. 95, 1201–1214 (2005), а также Muruganandam, A. et al., FASEB J. 16, 240–242 (2002). В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие домены, связывающиеся с инсулиновым рецептором человека, инсулиноподобным рецептором роста человека, TMEM30A или рецептором трансферрина человека, представляют собой однодоменное антитело. В определенных вариантах осуществления домен, связывающий TREM2 человека, находится на N–терминальном конце или C–терминальном конце поливалентного биспецифического (IgG–Fab, IgG–scFv) или экспрессируется в форматах мультиспецифического связывания, известных из уровня техники, таких как те, которые описаны в Spiess, C. et al., Molecular Immunology 67, 95–106 (2015) и Brinkman, U. et al., MABS 9(2)182–212 (2017).

[188] Способы получения биспецифических антител известны из уровня техники. Один из таких способов получения "биспецифического" антигенсвязывающего белка или антитела предусматривает слияние гибридом или связывание Fab'–фрагментов. См., например, Songsivilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315–321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547–1553. Другой способ включает конструирование Fc–части тяжелых цепей, например, для создания "выступов" и "впадин", которые способствуют образованию гетеродимеров тяжелых цепей при совместной экспрессии в клетке. См., например, WO 96/027011. Еще один способ также включает конструирование Fc–части тяжелой цепи, но с применением электростатического управления для стимуляции образования гетеродимера, в то же время препятствуя образованию гомодимера тяжелых цепей при совместной экспрессии в клетке. См., например, WO2009089004 и WO2014081955.

[189] Настоящее изобретение предусматривает один или более выделенных полинуклеотидов или выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 такие как моноклональные антитела–агонисты TREM2, описанные в данном документе. Кроме того, настоящее изобретение охватывает векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, клетки–хозяева или клеточные линии, содержащие нуклеиновые кислоты, и способы получения антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению. Нуклеиновые кислоты включают, например, полинуклеотиды, которые кодируют весь или часть антигенсвязывающего белка, например, одну или обе цепи антитела по настоящему изобретению, или его фрагмент,

производное, мутеин или его вариант, полинуклеотиды, достаточные для применения в качестве зондов гибридизации, праймеры для ПЦР или праймеры для секвенирования для идентификации, анализа, мутации или амплификации полинуклеотида, кодирующего полипептид, антисмысловые олигонуклеотиды для ингибирования экспрессии полинуклеотида и комплементарные последовательности вышеуказанного. Нуклеиновые кислоты могут быть любой длины, подходящей для требуемого применения или функции, и могут содержать одну или более дополнительных последовательностей, например регуляторных последовательностей, и/или быть частью большей нуклеиновой кислоты, например вектора. Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включают ДНК и РНК как в одноцепочечной, так и в двухцепочечной форме, а также соответствующие комплементарные последовательности. ДНК включает, например, кДНК, геномную ДНК, химически синтезированную ДНК, ДНК, амплифицированную с помощью ПЦР, и их комбинации. Молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению включают полноразмерные гены или молекулы кДНК, а также комбинацию их фрагментов. Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут быть получены из человеческих источников, а также из видов, отличных от человека.

[190] Соответствующие аминокислотные последовательности из иммуноглобулина или его области (например, вариабельной области, Fc-области и т. д.) или представляющего интерес полипептида могут быть определены посредством прямого секвенирования белка, и подходящие кодирующие нуклеотидные последовательности могут быть сконструированы в соответствии с универсальной таблицей кодонов. Как альтернатива, геномные или кДНК, кодирующие моноклональные антитела или их связывающие фрагменты по настоящему изобретению, могут быть выделены и секвенированы из клеток, продуцирующих такие антитела (например, гибридомы), с применением стандартных процедур, таких как способы, описанные в примере 3.

[191] Термин "выделенная нуклеиновая кислота", который используется в данном документе взаимозаменяемо с "выделенным полинуклеотидом", представляет собой нуклеиновую кислоту, которая была отделена от смежных генетических последовательностей, присутствующих в геноме организма, из которого нуклеиновую кислоту выделяют, в случае нуклеиновых кислот, выделенных из встречающихся в природе источников. В случае нуклеиновых кислот, синтезированных ферментативно из матрицы или химически, таких как продукты ПЦР, молекулы кДНК или, например, олигонуклеотиды, понятно, что нуклеиновые кислоты, образующиеся в результате таких процессов, представляют собой выделенные нуклеиновые кислоты. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты относится к молекуле нуклеиновой кислоты в виде отдельного фрагмента или в качестве компонента более крупной конструкции нуклеиновой кислоты. В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеиновые кислоты фактически свободны от загрязняющего эндогенного материала. Молекулу нуклеиновой кислоты предпочтительно получают из ДНК или РНК, выделенной по меньшей мере один раз, фактически в чистой форме и в количестве или концентрации, дающих возможность

идентифицировать, манипулировать и восстанавливать составляющие ее нуклеотидные последовательности с помощью стандартных биохимических способов (таких, как описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Такие последовательности предпочтительно предоставляются и/или сконструированы в виде открытой рамки считывания, не прерываемой внутренними нетранслируемыми последовательностями или интронами, которые обычно присутствуют в эукариотических генах. Последовательности нетранслируемой ДНК могут быть представлены 5'– или 3'–концами из открытой рамки считывания, где то же самое не мешает манипуляции или экспрессии кодирующей области. Если не указано иное, то левый конец любой обсуждаемой в данном документе одноцепочечной полинуклеотидной последовательности является 5'–концом; левое направление двухцепочечных полинуклеотидных последовательностей называется 5'–направлением. Направление от 5'– к 3'–концу, в котором происходит выработка возникающих РНК–транскриптов, называется направлением транскрипции; области последовательности цепи ДНК, имеющие такую же последовательность, как и РНК–транскрипт, которые расположены в направлении 5' по отношению к 5'–концу РНК–транскрипта, называются "вышележащими последовательностями"; области последовательности цепи ДНК, имеющие такую же последовательность, как и РНК–транскрипт, которые расположены в направлении 3' по отношению к 3'–концу РНК–транскрипта, называются "нижележащими последовательностями".

[192] Настоящее изобретение также включает нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в умеренно строгих условиях и, более предпочтительно, в очень жестких условиях с нуклеиновыми кислотами, кодирующими полипептиды, как описано в данном документе. Основные параметры, влияющие на выбор условий гибридизации, и руководство для разработки подходящих условий приведены в Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., главы 9 и 11, и *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., разделы 2.10 и 6.3–6.4), и могут быть легко определены специалистами обычной квалификации в данной области техники, исходя, например, из длины и/или нуклеотидного состава нуклеиновой кислоты. Один из способов достижения умеренно строгих условий включает использование раствора для предварительной промывки, содержащего 5 x SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0), гибридизационный буфер с приблизительно 50% формамида, 6 x SSC и температуру гибридизации приблизительно 55°C (или другие подобные гибридизационные растворы, такие как раствор, содержащий приблизительно 50% формамида, с температурой гибридизации приблизительно 42°C) и условия промывания приблизительно 60°C, в 0,5 x SSC, 0,1% SDS. Как правило, очень жесткие условия определяются как условия гибридизации, как указано выше, но с промывкой при приблизительно 68°C, 0,2 x SSC, 0,1% SDS. SSPE (1 x SSPE представляет собой 0,15 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ и 1,25 mM EDTA, pH 7,4) можно заменить на SSC (1 x SSC представляет собой 0,15 M NaCl и 15 mM

цитрата натрия) в буферах для гибридизации и промывки; промывки осуществляют в течение 15 минут после завершения гибридизации. Следует понимать, что температуру промывки и концентрацию промывочной соли можно регулировать по мере необходимости для достижения требуемой степени жесткости, с использованием основных принципов, с помощью которых регулируют реакции гибридизации и стабильность дуплекса, как известно специалистам в данной области техники и дополнительно описано ниже (см., например, Sambrook et al., 1989).

[193] При гибридизации нуклеиновой кислоты с целевой нуклеиновой кислотой неизвестной последовательности предполагают, что длина гибрида равна длине гибридизующейся нуклеиновой кислоты. В случае если гибридизуют нуклеиновые кислоты известной последовательности, – длина гибрида может быть определена путем выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот и определения области или областей комплементарности оптимальной последовательности. Температура гибридизации для гибридов, предполагаемая длина которых составляет меньше чем 50 пар оснований, должна быть на 5–10°C ниже температуры плавления (T_m) гибрида, где T_m определяют в соответствии со следующими уравнениями. Для гибридов длиной меньше чем 18 пар оснований $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 (\text{количество оснований A+T}) + 4(\text{количество оснований G+C})$. Для гибридов длиной более 18 пар оснований $T_m (^{\circ}\text{C}) = 81,5 + 16,6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{ G+C}) - (600/N)$, где N представляет собой количество оснований в гибриде, и $[\text{Na}^+]$ представляет собой концентрацию ионов натрия в буфере для гибридизации ($[\text{Na}^+]$ для 1 x SSC=0,165 M). Предпочтительно, каждая такая гибридизующаяся нуклеиновая кислота имеет длину, которая составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов (или более предпочтительно по меньшей мере 18 нуклеотидов, или по меньшей мере 20 нуклеотидов, или по меньшей мере 25 нуклеотидов, или по меньшей мере 30 нуклеотидов, или по меньшей мере 40 нуклеотидов, или наиболее предпочтительно по меньшей мере 50 нуклеотидов) или по меньшей мере 25% (более предпочтительно, по меньшей мере 50%, или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%) длины нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, с которой она гибридизуется, и характеризуется по меньшей мере 60% идентичностью последовательности (более предпочтительно, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99,5%) с нуклеиновой кислотой по настоящему изобретению, с которой она гибридизуется, где идентичность последовательности определяют путем сравнения последовательностей гибридизующихся нуклеиновых кислот, в случае если они выровнены, чтобы максимизировать перекрытие и идентичность при минимизации гэпов

в последовательности, как более подробно описано выше.

[194] Варианты антигенсвязывающих белков, в том числе варианты, описанные в данном документе, могут быть получены путем сайт-специфического мутагенеза нуклеотидов в ДНК, кодирующей полипептид, с применением каскадного или ПЦР-мутагенеза или других методик, хорошо известных из уровня техники, для получения ДНК, кодирующей вариант, и последующей экспрессии рекомбинантной ДНК в клеточной культуре, как описано в данном документе. Однако антигенсвязывающие белки, содержащие варианты CDR, имеющие не более приблизительно 100–150 остатков, можно получать путем синтеза *in vitro* с применением известных методик. Варианты обычно проявляют ту же качественную биологическую активность, что и встречающийся в природе аналог, например связывание с антигеном. Такие варианты включают, например, делеции, и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антигенсвязывающих белков. Для достижения конечной конструкции выполняют любую комбинацию удаления, вставки и замены при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками. Аминокислотные изменения также могут изменять посттрансляционные процессы антигенсвязывающего белка, в том числе изменение количества или положения сайтов гликозилирования. В определенных вариантах осуществления варианты антигенсвязывающего белка получают с целью модификации тех аминокислотных остатков, которые непосредственно участвуют в связывании эпитопа. В других вариантах осуществления модификация остатков, которые непосредственно не участвуют в связывании эпитопа, или остатков, не вовлеченных каким-либо образом в связывание эпитопа, является желательной для целей, обсуждаемых в данном документе. Предполагается мутагенез в любой из областей CDR, каркасных областей и/или константных областей. Специалисты в данной области техники могут использовать методики ковариационного анализа для конструирования полезных модификаций в аминокислотной последовательности антигенсвязывающего белка. См. например, Choulier, et al., *Proteins* 41:475–484, 2000; Demarest et al., *J. Mol. Biol.* 335:41–48, 2004; Hugo et al., *Protein Engineering* 16(5):381–86, 2003; Aurora et al., публикацию патента США № 2008/0318207 A1; Glaser et al., публикацию патента США № 2009/0048122 A1; Urech et al., WO 2008/110348 A1; Borrás et al., WO 2009/000099 A2. Такие модификации, определенные с помощью ковариационного анализа, могут улучшить характеристики эффективности, фармакокинетики, фармакодинамики и/или технологичности антигенсвязывающего белка.

[195] В таблице 6 приведены типичные последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие переменные области легкой и тяжелой цепей антител к TREM2, описанных в данном документе. Полинуклеотиды, кодирующие переменные области антитела к TREM2, можно применять для конструирования антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе.

Таблица 6. Типичные последовательности нуклеиновых кислот переменной области антитела к TREM2

ID Ab	Группа VL или VH Обозначение	Последовательность нуклеиновой кислоты.	SEQ ID NO:
<i>Вариабельные области легкой цепи:</i>			
12G 10	LV-01	CAGGCTGTGCCGACTCAGCCGTCTTCCCTCTCTGCATC TCCTGGAGTATTAGCCAGTCTCACCTGCACCTTACGCA GTGGCATCAATGTTGGTACCTACAGGATATACTGGTA CCAGCAGAAGCCAGGGAGTCCTCCCCAGTATCTCCTG AGGTACAAATCAGACTCAGATAAGCAGCAGGGCTCTG GAGTCCCCAGCCGCTTCTCTGGATCCAAGGATGCTTC GGCCAATGCAGGGATTTTACTCATCTCTGGGCTCCAGT CTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTATGATTTGGTA CAGCAGTGCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAACCTG ACCGTCCTA	208
26A 10	LV-02	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTC CCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCTGGAGAT AAATTGGGAGATAAGTATGTTTGCTGGTATCAGCAGA AGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCAAGA TAGCAAGCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCT GGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCA GCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTG TCAGGCGTGGGACAGTAACACTGTGGTATTCGGCGGA GGGACCAAGCTGACCGTCCTA	209
26C 10	LV-03	TCCTTTGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTC CCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCTGGAGAT AAATTGGGGGATAAGTATGTTTGCTGGTATCAGCAGA AGCCAGGCCAGTCCCCTATGTTGGTCATCTATCAAGA TACCAAGCGGCCCTCAGGGATCCCTGAACGATTCTCT GGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCA GCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTG TCAGGCGTGGGACAGCAGCACTGTGGTCTTCGGCGGA GGGACCAAGCTGACCGTCCTA	210

26F2	LV-04	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTC CCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCTGGAGAT AAATTGGGGGATAAGTATGTTTGCTGGTATCAGCAGA AGCCAGGCCAGTCCCCTGTGTTGGTCATCTTTCAAGAT AGCAAGCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTG GCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAG CGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGT CAGGCGTGGGACAGCAGCACTGTGGTATTCGGCGGAG GGACCAAGCTGACCGTCCTA	211
33B 12	LV-05	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTC CCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCTGGAGAT AAATTGGGGGATAAGTATGTTTGCTGGTATCAGCAGA AGCCAGGCCAGTCCCCTGTGTTGGTCATCTATCAAGA TAGCAAGCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCT GGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCA GCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTG TCAGGCGTGGGACAGTAGCACTGTGGTATTCGGCGGA GGGACCAAGCTGACCGTCCTA	212
24C 12	LV-06	GGCATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTG TGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTC CAGCCGGAGTGTTTTGTACAGCTCCAACAATAAGAAC TACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTC CTAAGGTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATC CGGGGTCCCTGACCGATTCACTGGCAGCGGGTCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTG AAGATGTGGCAGTTTATAACTGTCAGCAATATTATATT ACTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGA TTAAA	213
24G 6	LV-07	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTG TGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTC CAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAACAATAAGCAC TTCTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTC CTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAGTCC GGGGTCCCTGACCGATTCACTGGCAGCGGGTCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGA	214

		AGATGTGGCATT TTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTA CTCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGAT CAAA	
24A 10	LV-08	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTG TGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCACCTGCAAGTC CAGCCACAATGTTTTATACAGCTCCAACAATAAGAAC TACTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTC CTAAACTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCC GGGGTCCCTGACCGATT CAGTGGCAGCGGGTCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGA AGATGTGGCAGTTTATTACTGTCACCAATATTATAGTA CTCCGTGCAGTTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT CAAA	215
10E3	LV-09	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTG TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGC CAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTTCCAG CAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATG GTGCTTCCACCAGGGCCACTGGTATTCCAGCCAGGTT CAGTGTCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCATTTTATTA CTGTCTGCAGGATAATAATTGGCCTCCCACTTTCGGCC CTGGGACCAAAGTGGATATCAAA	216
13E7	LV-10	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTG TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGC CAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTTCCAG CAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATG GTGCTTCCACCAGGGCCACTGGTATTCCAGCCAGGTT CAGTGTCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTA CTGTCTGCAGGATAATAATTGGCCTCCCACTTTCGGCC CTGGGACCAAAGTGGATATCAAA	217
25F1 2	LV-11	GAAAAAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTG TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGC CAGTCAGAGTGTTAACAACAACCTTAGCCTGGTACCAG CAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATG	218

		GTGCATCCACCAGGGGCACTGGTATCCCAGCCAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTA CTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCGGACGTTTCGGC CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA	
32E3	LV-12	GAATTTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTT GTCTCCGGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC AGTCAGATTATTAGCAGCAACTACTTAGCCTGGTACC AGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTA TAGTGCATCCAGCAGGGGCACTGGCATCCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCA CCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTA TACTGTCAGCAGTTTGATAGCTCACCGATCACCTTCG GCCGAGGGACACGACTGGACATTAAA	219
24F4	LV-13	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTT GTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC AGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACC AGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTA TGGTGCATCCAGCAGGGGCACTGGCATCCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCA CCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTA TACTGTCAGCAGTATGATACCTCACCATTCACCTTCG GCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA	220
16B 8	LV-14	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCGTCACTTGTCGGGCG AGTCAGGATATTAACAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCTCTTTGCAAACCTGGGGTCCCTTCAAGGTTCA GCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAT CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTCTT GTCAACAGTCTAACAGTTTCCCGATCACCTTCGGCCA AGGGACACGACTGGAGATTAAA	221
4C5	LV-15	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAACTGGTTAGCCTGGTATCAGC	222

		AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTTTGCAAGTTGGGGTCCCATTAAGGTTCA GCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAT CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATT GTCAACAGGCTGACAGTTTCCCTCGCAATTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	
6E7 V9 V30 V33 V44 V68	LV-16	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTTTGCAAAATGGGGTCCCATCAAGGTTT AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT TGTCAACAGGCTGACAGTTTCCCTCGCACTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	223
5E3	LV-17	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAGCCTGGTTTCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAATCCCTGATCTATGC TGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAAGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTAC TGCCAACAGTATAGTACTTACCCATTCACTTTCGGCCC TGGGACCAAAGTGGATATCAAA	224
4G1 0	LV-18	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA AGTCAGGGCATAAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAATGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGC TGCATCCAGTTTGCCAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTT AGCGGCAGTGGATCTGGGCCAGAATTCCTCTCACAA TCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTAC TGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTTCGGCC AAGGGACCAAGGTGGAAATCACA	225
V3	LV-101	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG	226

		AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTAGGCAAAATGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT TGTCAACAGGCTGACAGGTTCCCTCGCACTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	
V24	LV-102	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTTTGCAAAAGGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT TGTCAACAGGCTGACAGTTTCCCTCATACTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	227
V27	LV-103	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTTTGCAACGTGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT TGTCAACAGGCTGACAGTTTCCCTCGCACTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	228
V40	LV-104	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTTTGCAACTTGGGGTCCCATCAAGGTTC GCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAT CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT GTCAACAGGCTGACCGTTTCCCTCGCACTTTTGGCCAG GGGACCAAGCTGGAGATCAAA	229
V48	LV-105	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC	230

		ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTTTGCAAACGGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT TGTCAACAGGCTGACAGTTTGCCTCGCACTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	
V49	LV-106	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTCGGCAAAATGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT TGTCAACAGGCTGACAGTTATCCTCGCACTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	231
V52	LV-107	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTTTGCAAAGGGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT TGTCAACAGGCTGACCGTTTCCCTCGCACTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	232
V60	LV-108	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTTTGCAAAGGGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT TGTGGGCAGGCTGACAGTTTCCCTCGCACTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	233

V73	LV-106	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTCGTCAAAATGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT TGTCAACAGGCTGACAGTTATCCTCGCACTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	234
V76	LV-109	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTTTGCAAAAGGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGAGAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT TGTCAACAGGCTGACAGTTTCCCTCGCACTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	235
V84	LV-110	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGG TGCATCCAGTTTGCAAAATGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT TGTCAACAGGCTGACAGTTTCCCGCGCACTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	236
V10	LV-201	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTC TGCATCCAGTTTGCAAAATGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT TGTCAACAGGCTGACAGTTTCCCTCGCACTTTTGGCCA	313

		GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	
V23	LV-202	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTTTGCAAAATGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT TGTC AACAGGCTGACAGTTTCCCTCTTACTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	314
V57	LV-203	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTTTGCAAAATGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT TGTC AACAGGCTGACAGTTTCCCTCGCACTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	315
V70	LV-204	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCAGGGAGTTTGCAAAATGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT TGTC AACAGGCTGACAGTTTCCCTCGCACTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	316
V83	LV-205	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTTTGCAAAATGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT	317

		TGTCAACAGGCTGTGAGTTTCCCTCGCACTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	
V90	LV-206	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG AGTCAGGGTATTAGCAGATGGTTAGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC TGCATCCAGTTTGCAAAATGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTT TGTCAACAGGCTGACAGTTTCCCTCGCACTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	318
<i>Вариабельные области тяжелой цепи:</i>			
12G 10 24C 12	HV-01	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAC AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGC TATTGGTGGTGGTGGTGTAGCACATACTGCGCAGAC TCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATTT TATATAGCAGTGGCTGGTTCTCACTTTGACTACTGGGG CCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	237
26A 10	HV-02	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCTTGGTAC AGCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC TAGATTCACCTTCAGTAGCTTTGGCATGAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTCATA CATTAGTAGTAGTAGTTTTACCATATATTACGCAGACT CTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGC CAAGAATTCATTCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GACGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGG GGGGTCTTACTATGGTTTCGGGGAGTCTCTTCCTACGGT TTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCT CCTCA	238
26C	HV-03	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCTTGGTAC	239

10		AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTACCTTCAGTAGCTTTGGCATGAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATA CATTAGTAGTAGTAGTTTTACCATATACTACGCAGACT CTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGC CAAGAATTCGTTCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GACGAGGACACGGCTGTGTATTTCTGTGTGAGAGAGG GGGGTATAACTATGGTTCGGGGAGTCTCTTCCTACGG TATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA	
26F2	HV-04	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCTTGGTAC AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTACCTTCAGTAGCTTTGGCATGAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTTCATA CATTAGTAGTAGTAGTTTTACCATATACTACGCAGACT CTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGC CAAGAATTCATTCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GACGAGGACACGGCTGTGTATTTCTGTGCGAGAGAGG GGGGTATTACTATGGTTCGGGGAGTCTCTTCCTACGGT ATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCT CCTCA	240
33B 12	HV-05	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCTTGGTAC AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTACCTTCAGTAGCTTTGGCATGAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTTTCATA CATTAGTAAAAGTAGTTTTACCATATACTACGCAGAC TCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATG CCAAGAATTCATTCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG AGACGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAG GGGGGTCTTACTATGGTTCGGGGAGTCTCTTCCTACGG TTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA	241
24G 6	HV-06	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAC AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCC	242

		GCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGGTCTCAGC TATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGAC TCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAGGCG TATACACCTATGGCATTCTTTGACTACTGGGGCCAGG GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	
24A 10	HV-07	GAGGTGCAGGTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAC AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTCACCTTTAGCAACTATGCCATGAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGC TATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGAC TCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGA GGGTGGGAGCTATTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGG TCACCGTCTCCTCA	243
10E3	HV-08	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGATGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGCTTTACCAACTACTGGATCGGCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGAGACTCTGATACCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGA CGGAGACAGGGGATCTGGGGTGATGCTCTTGATATCT GGGGCCAAGGGACATTGGTCACCGTCTCTTCA	244
13E7	HV-09	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGATGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGAGACTCTGATACCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGA	245

		CGGAGACAGGGGATCTGGGGTGATGCTCTTGATTTCT GGGGCCAAGGGACATTGGGTCACCGTCTCTTCA	
25F1 2	HV-10	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGA AGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTAT GGTGGGTCCTTCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCC GCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGG AAATCAATCATAGTGGAACACCAACTACAACCCGTC CCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCC AAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCG CCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGG GTATTACGATATCTTGACTGGTTATCATGATGCTTTTG ATATTGGGACCAAGGGACAATGGGTCACCGTNTTTTC A	246
32E3	HV-11	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCACCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATATATTACTGTGCGCGA CATGACATTATACCAGCAGCCCCTGGTGCTTTTGATAT CTGGGGCCAAGGGACAATGGGTCACCGTCTCTTCA	247
24F4	HV-12	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACACCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGTCGACA AGTCCAGCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATATATTACTGTACGAGA CAGGCCATAGCAGTGACTGGTTTGGGGGGTTTCGACC CCTGGGGCCAGGGAACCCTGGGTCACCGTCTCCTCA	248
16B 8	HV-13	CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTC	249

		TGGTTACACCTTTACCAACTATGGTATCAGCTGGGTGC GACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATG GATCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTATGCACAG AAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACAT CCACGAGTACAGTCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAG ATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACGG GGATACAGCTATGGTTCCTTTGACTACTGGGGCCAGG GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	
4C5	HV-14	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAAAGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGACACAGTTTTACCAACTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCGTGTATTTCTGTGCGAGA CAAAGGACGTTTTACTATGATAGTAGTGGTTATTTGA CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	250
6E7	HV-15	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGTTTTACCAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGA CAAAGGACGTTTTATTATGATAGTAGTGATTATTTGA CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	251
5E3	HV-16	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTC TGGATACACCTTCACCGGCTACTATATACTGGGTG CGACAGGCCCTGGACTAGGGCTTGAGTGGATGGGAT GGATCAACCCTTACAGTGGTGGCACAACCTCTGCACA GAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACG TCCATCAGCTCAGCCTACATGGAAGTGAAGCAGGCTGA	252

		GATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGA TGGAGGCTACCTGGCCCTCTACGGTACGGACGTCTGG GGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA	
4G1 0	HV-17	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGCTTTCCAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTTTTTGAAGTGGAGTAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGCGA CAGGGTATAGAAGTGACTGGTACGGGAGGTTTGGACG TCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA	253
V3	HV-101	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGTTTTGCGAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGATCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGA GGGAGGACGTTTTATTATGATAGTAGTGATTATTTTGA CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA	254
V24	HV-102	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGTTTTACCAGCTACTGGATTGCCTGGGTG CGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGG ATCATCTATCCTGGTGACTCTGATGTGAGATACAGCCC GTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAG TCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCTGA AGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGATC TAGGACGTTTTATTATGATAGTAGTGATTATTTTGA CTGGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA	255
V27	HV-103	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT	256

		CTGGATACAGTTTTTACCAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACGCTC CGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAA GTCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCTG AAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGTGAGAA GTAGGACGTTTTTATTATGATAGTAGTGATTATTTTGAC TACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA	
V40	HV-104	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGTTTTTGGGAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATGTTAGATACAGCC CGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAA GTCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCTG AAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGAC AAAGGACGTTTTTATTATGATAGTAGTGATTATTCGGA CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA	257
V48	HV-105	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGTTTTTGGTAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATGTGAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGA ATGAGGACGTTTTTATTATGATAGTAGTGATTATTTTGA CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA	258
V49	HV-106	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGTTTTTAATAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GACGATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGACTGAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCT	259

		GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGA AGTAGGACGTTTTATTATGATAGTAGTGATTATTTTGA CTACTGGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA	
V52	HV-107	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGTTTTTGAGAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGA GGGAGGACGTTTTATTATGATAGTAGTGATTATTTTGA CTACTGGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA	260
V60	HV-108	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACCATTTTACCAGCTACTGGATCGCCTGGGTG CGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGG ATCATCTATCCTGGTGACTCTGATGTGAGATACAGCCC GTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAG TCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCTGA AGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGACA AAGGACGTTTTATTATGATAGTAGTGATTATAGTGACT ACTGGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA	261
V73	HV-109	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGTTTTGGTAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGC CCGGGGTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGA GGGAGGACGTTTTATTATGATAGTAGTGATTATTTTGA CTACTGGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA	262
V76	HV-110	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT	263

		CTGGATACAGTTTTTGGGAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGC CCGGAGTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGA CAAAGGACGTTTTTATTATGATAGTAGTGATTATAGTG ACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTC A	
V84	HV-111	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACGGGTTTACCAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACAGTGATACCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGA CAAAGGACGTTTTTATTATGATAGTAGTGATTATTCGG ACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTC A	264
V9	HV-201	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGTTTTTACCAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGA CAAAGGGGGTTTTTATTATGATAGTAGTGATTATTTGA CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCA	319
V10 V23 V57 V70 V83	HV-15	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGTTTTTACCAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGC	320

		CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGA CAAAGGACGTTTTATTATGATAGTAGTGATTATTTTGA CTACTGGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA	
V30	HV-202	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATCGAGTTTTACCAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGA CAAAGGACGTTTTATTATGATAGTAGTGATTATTTTGA CTACTGGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA	321
V33	HV-203	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGTTTTACCAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGA CAAAGGACGTTTTATGGGGATAGTAGTGATTATTTTG ACTACTGGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTC A	322
V44	HV-204	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGTTTTACCAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTAGTGACTCTGATACCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGA CAAAGGACGTTTTATTATGATAGTAGTGATTATTTTGA	323

		CTACTGGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA	
V68	HV-205	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGTTTTTACCAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGA CAAAGGACGTTTATAGGTATGATAGTAGTGATTATTTTG ACTACTGGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTC A	324
V90	HV-206	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTT CTGGATACAGTTTTTACCAGCGAGTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGG GATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCT GAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGA CAAAGGACGTTTTTATTATGATAGTAGTGATTATTTTGA CTACTGGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCTCTCA	325

[196] Выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие домен, связывающий TREM2, антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению могут содержать нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична, на по меньшей мере 90% идентична, на по меньшей мере 95% идентична или на по меньшей мере 98% идентична любой из нуклеотидных последовательностей, перечисленных в таблице 6. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область легкой цепи антитела к TREM2, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична, на по меньшей мере 90% идентична, на по меньшей мере 95% идентична или на по меньшей мере 98% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 208–236 и 313–318. В определенных вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область легкой цепи антитела к TREM2, содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 208–236 и 313–318. В связанных вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи антитела к TREM2, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%

идентична, на по меньшей мере 90% идентична, на по меньшей мере 95% идентична или на по меньшей мере 98% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 237–264 и 319–325. В других связанных вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи антитела к TREM2, содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 237–264 и 319–325.

[197] Последовательности нуклеиновых кислот, представленные в таблице 6, являются только иллюстративными. Как будет понятно специалистам в данной области техники, из-за вырожденности генетического кода может быть получено чрезвычайно большое количество нуклеиновых кислот, все из которых кодируют CDR, вариабельные области и тяжелые и легкие цепи или другие компоненты антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе. Таким образом, идентифицировав конкретную аминокислотную последовательность, специалисты в данной области техники могут получить любое количество различных нуклеиновых кислот с помощью простой модификации последовательности одного или более кодонов таким путем, который не приводит к изменению аминокислотной последовательности кодируемого белка.

[198] Настоящее изобретение также включает векторы, содержащие одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих один или более компонентов антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению (например, вариабельные области, легкие цепи и тяжелые цепи). Термин "вектор" означает любую молекулу или единицу (например, нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг или вирус), используемые для переноса кодирующей белок информации в клетку-хозяина. Примеры векторов включают без ограничения плазмиды, вирусные векторы, неэписомные векторы млекопитающих и экспрессионные векторы, например рекомбинантные экспрессионные векторы. Используемые в данном документе термины "вектор экспрессии" или "экспрессионная конструкция" относятся к молекуле рекомбинантной ДНК, содержащей требуемую кодирующую последовательность и соответствующие контрольные последовательности нуклеиновой кислоты, необходимые для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретной клетке-хозяине. Вектор экспрессии может включать без ограничения последовательности, которые влияют на транскрипцию, трансляцию или регулируют их и при наличии интронов влияют на РНК-сплайсинг кодирующей области, функционально связанной с ними. Последовательности нуклеиновых кислот, необходимые для экспрессии в прокариотах, включают промотор, необязательно последовательность оператора, сайт связывания рибосомы и, возможно, другие последовательности. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, энхансеры и сигналы терминации и полиаденилирования. Кроме того, если требуется, последовательность секреторного сигнального пептида может необязательно кодироваться вектором экспрессии, функционально связанным с представляющей интерес кодирующей последовательностью таким образом, что экспрессируемый полипептид может секретироваться рекомбинантной клеткой-хозяином для более легкого выделения представляющего интерес полипептида из клетки. Например, в некоторых вариантах

осуществления сигнальные пептидные последовательности могут быть присоединены/слиты с аминоконцом любой из полипептидных последовательностей вариательной области, перечисленных в таблицах 1A, 1B, 2A, 2B, 3A и 3B. В определенных вариантах осуществления сигнальный пептид, имеющий аминокислотную последовательность MDMRVPAQLLGLLLWLARGARC (SEQ ID NO: 265), слит с аминоконцом любой из полипептидных последовательностей вариательной области из таблиц 1A, 1B, 2A, 2B, 3A и 3B. В других вариантах осуществления сигнальный пептид, имеющий аминокислотную последовательность MAWALLLLTLLTQGTGWSA (SEQ ID NO: 266), слит с аминоконцом любой из полипептидных последовательностей вариательной области из таблиц 1A, 1B, 2A, 2B, 3A и 3B. В еще других вариантах осуществления сигнальный пептид, имеющий аминокислотную последовательность MTCSPLLLTLLHCTGWSA (SEQ ID NO: 267), слит с аминоконцом любой из полипептидных последовательностей вариательной области из таблиц 1A, 1B, 2A, 2B, 3A и 3B. Другие подходящие сигнальные пептидные последовательности, которые могут быть слиты с аминоконцом полипептидных последовательностей вариательной области, описанных в данном документе, включают: MEAPAQLLFLLLLWLPGDTTG (SEQ ID NO: 268), MEWTWRVFLVAAATGAHS (SEQ ID NO: 269), METPAQLLFLLLLWLPGDTTG (SEQ ID NO: 270), MKHLWFFLLLVAAAPRWVLS (SEQ ID NO: 272), MEWSWVFLFLSVTTGVHS (SEQ ID NO: 273), MDIRAPTQLLGLLLLWLPGAKC (SEQ ID NO: 274), MDIRAPTQLLGLLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 275), MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATF (SEQ ID NO: 276), MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 277), METGLRWLLLVAVLKGVC (SEQ ID NO: 278), METGLRWLLLVAVLKGVCQE (SEQ ID NO: 279) и MDMRAPTQLLGLLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 280). Другие сигнальные или секреторные пептиды известны специалистам в данной области техники и могут быть слиты с любой из полипептидных цепей вариательной области, перечисленных в таблицах 1A, 1B, 2A, 2B, 3A и 3B, например, для облегчения или оптимизации экспрессии, в частности в клетках-хозяевах.

[199] Как правило, векторы экспрессии, применяемые в клетках-хозяевах для получения антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 по настоящему изобретению, будут содержать последовательности для поддержания плазмиды и для клонирования и экспрессии экзогенных нуклеотидных последовательностей, кодирующих компоненты антигенсвязывающих белков. Такие последовательности, обобщенно называемые "фланкирующими последовательностями", в некоторых вариантах осуществления, как правило, содержат одну или более из следующих нуклеотидных последовательностей: промотор, одну или более энхансерных последовательностей, точку начала репликации, последовательность терминации транскрипции, полную интронную последовательность, содержащую донорный и акцепторный участки сплайсинга, последовательность, кодирующую лидерную последовательность для секреции полипептида, участок связывания рибосомы, последовательность полиаденилирования, полилинкерную область для вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей предназначенный для экспрессии

полипептид, и элемент селективируемого маркера. Каждая из этих последовательностей рассматривается ниже.

[200] Необязательно, вектор может содержать последовательность, кодирующую "метку", т. е., молекулу олигонуклеотида, расположенную на 5'– или 3'–конце кодирующей последовательности полипептида; олигонуклеотидную последовательность–метку, кодирующую polyHis (такую как hexaHis) или другую "метку" такую как FLAG®, HA (гемагглютинин вируса гриппа) или тус, для которых существуют коммерчески доступные антитела. Как правило, эта метка слита с полипептидом при экспрессии полипептида, и она может служить в качестве средства для аффинной очистки или выявления полипептида из клетки–хозяина. Аффинную очистку можно осуществлять, например, с помощью колоночной хроматографии с использованием антител к метке в качестве аффинной матрицы. Необязательно, впоследствии метка может быть удалена из очищенного полипептида с помощью различных средств, таких как применение определенных пептидаз для расщепления.

[201] Фланкирующие последовательности могут быть гомологичными (т. е. принадлежать к тому же виду и/или штамму, что и клетка–хозяин), гетерологичными (т. е. принадлежать к виду, отличному от вида или штамма клетки–хозяина), гибридными (т. е. комбинация фланкирующих последовательностей из более чем одного источника), синтетическими или нативными. Следовательно, источником фланкирующей последовательности может быть любой прокариотический или эукариотический организм, любой позвоночный или беспозвоночный организм или любое растение, при условии, что фланкирующая последовательность является функциональной и может быть активирована аппаратом клетки–хозяина.

[202] Фланкирующие последовательности, применяемые в векторах по настоящему изобретению, можно получить любым из нескольких способов, хорошо известных из уровня техники. Как правило, применяемые в данном документе фланкирующие последовательности были предварительно идентифицированы с помощью картирования и/или расщепления рестрикционными эндонуклеазами, а следовательно могут быть выделены из соответствующего тканевого источника с использованием подходящих рестрикционных эндонуклеаз. В некоторых случаях может быть известна полная нуклеотидная последовательность фланкирующей последовательности. В данном случае фланкирующая последовательность может быть синтезирована с помощью стандартных способов для синтеза и клонирования нуклеиновых кислот.

[203] Вне зависимости от того, известна вся или только часть фланкирующей последовательности, ее можно получить с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или при скрининге геномной библиотеки с подходящим зондом, таким как олигонуклеотид и/или фрагмент фланкирующей последовательности из того же или другого вида. Если фланкирующая последовательность неизвестна, то фрагмент ДНК, содержащий фланкирующую последовательность, можно выделить из более крупного участка ДНК, который может содержать, например, кодирующую последовательность и

даже другой ген или гены. Выделение можно осуществлять путем расщепления рестрикционными эндонуклеазами для получения надлежащего фрагмента ДНК с последующим выделением с помощью очистки в агарозном геле, колоночной хроматографии Qiagen® (Чатсворт, Калифорния, США) или других способов, известных специалисту в данной области. Выбор подходящих ферментов для осуществления этой цели очевиден для специалиста обычной квалификации в данной области техники.

[204] Как правило, точка начала репликации является частью приобретенных на коммерческой основе прокариотических экспрессионных векторов и способствует амплификации вектора в клетке-хозяине. Если выбранный вектор не содержит точку начала репликации, то ее можно химически синтезировать на основании известной последовательности и лигировать в вектор. Например, точка начала репликации из плазмиды pBR322 (New England Biolabs, Беверли, Массачусетс, США) подходит для большинства грамотрицательных бактерий, и различные вирусные источники (например, SV40, вирус полиомы, аденовирус, вирус везикулярного стоматита (VSV) или папилломавирусы, такие как HPV или BPV) подходят для клонирования векторов в клетках млекопитающих. В целом, компонент точки начала репликации необязателен в экспрессионных векторах млекопитающих (например, точка SV40 часто используется только потому, что она также содержит ранний вирусный промотор).

[205] Как правило, последовательность терминации транскрипции расположена в 3'-направлении относительно конца кодирующей полипептид области и служит для терминации транскрипции. Обычно последовательность терминации транскрипции в прокариотических клетках представляет собой G-C-богатый фрагмент, за которым следует последовательность поли-T. Хотя данную последовательность легко клонировать из библиотеки или даже приобрести коммерческим путем в качестве части вектора, ее также можно легко синтезировать с применением известных способов синтеза нуклеиновых кислот.

[206] Ген селективируемого маркера кодирует белок, необходимый для выживаемости и роста клетки-хозяина, растущей в селективной среде для культивирования. Типичные гены селективных маркеров кодируют белки, которые (a) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, тетрациклину или канамицину в случае прокариотических клеток-хозяев; (b) восполняют ауксотрофный дефицит в клетке; или (c) обеспечивают необходимые питательные вещества, недоступные из комплексной или определенной среды. Конкретными селективируемыми маркерами являются ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к ампициллину и ген устойчивости к тетрациклину. Преимущественно, может также использоваться ген устойчивости к неомицину для селекции как в прокариотических, так и в эукариотических клетках-хозяевах.

[207] Для амплификации гена, предназначенного для экспрессии, можно использовать другие селективируемые гены. Амплификация представляет собой процесс, в котором гены, необходимые для продуцирования белка, крайне важного для роста или

выживаемости клеток, повторяются последовательно в хромосомах последующих поколений рекомбинантных клеток. Примеры подходящих селектируемых маркеров для клеток млекопитающих включают дигидрофолатредуктазу (DHFR) и гены тимидинкиназы, не содержащие промоторов. Трансформанты клеток млекопитающих помещают в условия селекционного давления, в которых только трансформанты однозначно способны к выживанию благодаря селектируемому гену, присутствующему в векторе. Селекционное давление устанавливают посредством культивирования трансформированных клеток в условиях, при которых концентрация средства для селекции в среде последовательно увеличивается, обеспечивая тем самым амплификацию как селектируемого гена, так и ДНК, которая кодирует другой ген, такой как один или более компонентов антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе. В результате из амплифицированной ДНК синтезируется повышенное количество полипептида.

[208] Участок связывания рибосомы обычно необходим для инициации трансляции mRNA и характеризуется наличием последовательности Шайна–Дальгарно (прокариоты) или последовательности Kozak (эукариоты). Как правило, этот элемент расположен в направлении 3'-конца относительно промотора и в 5'-конца относительно кодирующей последовательности полипептида, предназначенного для экспрессии. В определенных вариантах осуществления одна или более кодирующих областей могут быть функционально связаны с внутренним сайтом связывания рибосом (IRES), что дает возможность переносить две открытые рамки считывания из единичного транскрипта РНК.

[209] В некоторых случаях, например, в случае если в системе экспрессии эукариотической клетки-хозяина требуется гликозилирование, можно манипулировать с разными пре- или пропоследовательностями для улучшения состояния гликозилирования или выхода. Например, можно изменять участок расщепления пептидазами конкретного сигнального пептида или добавлять пропоследовательности, которые также могут влиять на гликозилирование. Конечный белковый продукт может содержать в положении –1 (по отношению к первой аминокислоте зрелого белка) одну или более дополнительных аминокислот, связанных с экспрессией, которые могли быть не полностью удалены. Например, конечный белковый продукт может содержать один или более аминокислотных остатков, находящихся в сайте расщепления пептидазами, присоединенных к амино-концу. Как альтернатива, применение некоторых сайтов расщепления может приводить к слегка укороченной форме требуемого полипептида, если фермент делает надрез в такой области зрелого полипептида.

[210] Векторы экспрессии и клонирования по настоящему изобретению обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с молекулой, кодирующей полипептид. Используемый в данном документе термин "функционально связанный" относится к связыванию двух или больше последовательностей нуклеиновой кислоты таким образом, что получается молекула

нуклеиновой кислоты, способная направлять транскрипцию данного гена и/или синтез требуемой молекулы белка. Например, регуляторная последовательность в векторе, которая "функционально связана" с кодирующей белок последовательностью, лигирована таким образом, что экспрессия кодирующей белок последовательности достигается в условиях, совместимых с транскрипционной активностью регуляторных последовательностей. Более конкретно, последовательность промотора и/или энхансера, в том числе любая комбинация цис-действующих элементов контроля транскрипции, функционально связана с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или другой системе экспрессии.

[211] Промоторы представляют собой нетранскрибируемые последовательности, расположенные против хода транскрипции от стартового кодона (т. е., 5'-конца) структурного гена (как правило, в пределах от приблизительно 100 до 1000 п. о.), которые регулируют транскрипцию структурного гена. Традиционно промоторы подразделяют на два класса: индуцибельные промоторы и конститутивные промоторы. Индуцибельные промоторы иницируют повышенные уровни транскрипции из ДНК, находящейся под их управлением, в ответ на некоторые изменения в культуральных условиях, такие как присутствие или отсутствие питательных веществ или изменение температуры. С другой стороны, конститутивные промоторы равномерно транскрибируют ген, с которым они функционально связаны, т. е. происходит незначительный контроль экспрессии гена или он отсутствует. Хорошо известно большое число промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами. Подходящий промотор функционально связан с ДНК, кодирующей, например, тяжелую цепь, легкую цепь или другой компонент антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению с помощью удаления промотора из исходной ДНК путем расщепления рестриктазой и вставки требуемой последовательности промотора в вектор.

[212] Также из уровня техники хорошо известны промоторы, подходящие для применения с дрожжевыми хозяевами. Дрожжевые энхансеры предпочтительно используют с дрожжевыми промоторами. Подходящие промоторы для применения с клетками-хозяевами млекопитающих хорошо известны и включают без ограничения: промоторы, полученные из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (например, серотипы аденовируса 2, 8 или 9), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирусы, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40). Другие подходящие промоторы млекопитающих включают гетерологичные промоторы млекопитающих, например, промоторы теплового шока и промотор актина.

[213] Дополнительные промоторы, которые могут представлять интерес, включают без ограничения: ранний промотор SV40 (Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304–310); промотор CMV (Thornsen et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659–663); промотор, содержащийся в 3'-концевом длинном повторе вируса саркомы Рауса (Yamamoto et al.,

1980, *Cell* 22:787–797); промотор тимидинкиназы герпеса (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 1444–1445); промоторные и регуляторные последовательности из гена металлотионина Prinster et al., 1982, *Nature* 296:39–42) и прокариотические промоторы, такие как бета–лактамазный промотор (Villa–Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727–3731); или tac промотор (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21–25). Также представляют интерес следующие транскрипционные регуляторные области животных, которые демонстрируют тканевую специфичность и применялись в трансгенных животных: регуляторная область гена эластазы I, активная в панкреатических ацинарных клетках (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639–646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50: 399–409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425–515); область контроля гена инсулина, которая активна в бета–клетках поджелудочной железы (Hanahan, 1985, *Nature* 315: 115–122); область контроля гена иммуноглобулина, которая активна в лимфоидных клетках (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38: 647–658; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533–538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7: 1436–1444); область контроля вируса опухоли молочной железы мыши, которая активна в клетках яичка, молочной железы, лимфоидных и тучных клетках (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485–495); область контроля гена альбумина, которая активна в печени (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268–276); область контроля гена альфа–фето–белка, которая активна в печени (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5: 1639–1648; Hammer et al., 1987, *Science* 253:53–58); область контроля гена альфа–1–антитрипсина, которая активна в печени (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1: 161–171); область контроля гена бета–глобина, которая активна в миелоидных клетках (Mogram et al., 1985, *Nature* 315:338–340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89–94); область контроля гена основного белка миелина, которая активна в олигодендроцитах в головном мозге (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703–712); область контроля гена легкой цепи 2 миозина, которая активна в скелетных мышцах (Sani, 1985, *Nature* 314:283–286); и область контроля гена гонадотропного релизинг–гормона, которая активна в гипоталамусе (Mason et al., 1986, *Science* 234: 1372–1378).

[214] Последовательность энхансера может быть вставлена в вектор для увеличения транскрипции ДНК, кодирующей компонент антигенсвязывающих белков (например, легкой цепи, тяжелой цепи или переменных областей), высшими эукариотами. Энхансеры представляют собой цис–действующие элементы ДНК длиной обычно приблизительно 10–300 п. о., которые воздействуют на промотор для повышения транскрипции. Энхансеры являются относительно ориентационно и позиционно независимыми и могут находиться в положениях как 5', так и 3' по отношению к транскрипционной единице. Известно несколько энхансерных последовательностей, доступных из генов млекопитающих (например, глобин, эластаза, альбумин, альфа–фетопротеин и инсулин). При этом, как правило, используют энхансеры из вирусов. Известные из уровня техники энхансер SV40, энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы и энхансер аденовируса представляют собой типовые энхансерные элементы для активации эукариотических промоторов. Хотя

энхансер может находиться в векторе как с 5'-, так и с 3'-конца по отношению к кодирующей последовательности, как правило, он расположен с 5'-конца от промотора. Последовательность, кодирующая соответствующую нативную или гетерологичную сигнальную последовательность (лидерную последовательность или сигнальный пептид), может быть встроена в экспрессионный вектор для способствования внеклеточной секреции антигенсвязывающего белка. Выбор сигнального пептида или лидерной последовательности зависит от типа клеток-хозяев, в которых продуцируется антигенсвязывающий белок, и гетерологичная сигнальная последовательность может заменить нативную сигнальную последовательность. Примеры сигнальных пептидов описаны выше. Другие сигнальные пептиды, которые являются функциональными в клетках-хозяевах млекопитающих, включают следующее: сигнальную последовательность интерлейкина-7 (IL-7), описанную в патенте США № 4965195; сигнальную последовательность рецептора интерлейкина-2, описанную в публикации Cosman et al., 1984, *Nature* 312:768; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-4, описанный в европейском патенте № 0367566; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа I, описанный в патенте США № 4968607; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа II, описанный в европейском патенте № 0460846.

[215] Векторы экспрессии могут быть сконструированы из исходного вектора, такого как коммерчески доступный вектор. Такие векторы могут содержать все необходимые фланкирующие последовательности или не содержать их. Если одна или более из описанных в данном документе фланкирующих последовательностей изначально не присутствует в векторе, то их можно получить отдельно и лигировать в вектор. Способы, применяемые для получения каждой из фланкирующих последовательностей, хорошо известны специалисту в данной области техники. Векторы экспрессии могут быть введены в клетки-хозяева, чтобы тем самым получать белки, в том числе слитые белки, кодируемые нуклеиновыми кислотами, как описано в данном документе.

[216] В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие различные компоненты антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 по настоящему изобретению, могут быть вставлены в один и тот же вектор экспрессии. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь или переменную область антитела к TREM2, может быть клонирована в тот же вектор, что и нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь или переменную область антитела к TREM2. В таких вариантах осуществления две нуклеиновые кислоты могут быть разделены участком внутренней посадки рибосомы (IRES) и под контролем одного промотора таким образом, что легкая цепь и тяжелая цепь экспрессируются из одного и того же транскрипта mRNA. Как альтернатива, две нуклеиновые кислоты могут находиться под контролем двух отдельных промоторов таким образом, что легкая цепь и тяжелая цепь экспрессируются из двух отдельных транскриптов mRNA. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь или переменную область антитела к TREM2, клонируется в один вектор экспрессии, и нуклеиновая кислота, кодирующая

тяжелую цепь или вариабельную область антитела к TREM2, клонируется во второй вектор экспрессии. В таких вариантах осуществления клетка–хозяин может быть совместно трансфицирована посредством двух векторов экспрессии для получения полных антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению.

[217] После того как вектор был сконструирован, и одна или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих компоненты антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе, были вставлены в соответствующий(–е) сайт(–ы) вектора или векторов, готовый(–е) вектор(–ы) может(–гут) быть вставлен(–ы) в подходящую клетку–хозяин для амплификации и/или экспрессии полипептида. Таким образом, настоящее изобретение охватывает выделенную клетку–хозяина или клеточную линию, содержащую один или более векторов экспрессии, кодирующих компоненты антигенсвязывающих белков–агонистов TREM2, описанных в данном документе. Используемый в данном документе термин "клетка–хозяин" относится к клетке, которая была трансформирована или способна трансформироваться нуклеиновой кислотой и тем самым экспрессирует представляющий интерес ген. Данный термин включает в себя потомство исходной клетки вне зависимости от того, идентично или нет это потомство по морфологии или по генетической конструкции исходной родительской клеткой, до тех пор, пока присутствует представляющий интерес ген. Клетка–хозяин, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, предпочтительно функционально связанную с по меньшей мере одной последовательностью контроля экспрессии (например, промотором или энхансером), представляет собой "рекомбинантную клетку–хозяин".

[218] Трансформация вектора экспрессии для антигенсвязывающего белка в выбранную клетку–хозяин может быть выполнена с помощью хорошо известных способов, в том числе трансфекции, инфекции, совместного осаждения фосфатом кальция, электропорации, микроинъекции, липофекции, трансфекции, опосредованной DEAE–декстраном, или других известных методик. Выбранный способ частично будет зависеть от используемого типа клетки–хозяина. Такие способы и другие подходящие способы широко известны специалистам в данной области техники и приведены, например, в Sambrook et al., 2001.

[219] При культивировании в подходящих условиях клетка–хозяин синтезирует антигенсвязывающий белок, который впоследствии может быть собран из культуральной среды (если клетка–хозяин секретирует его в среду) или непосредственно из клетки–хозяина, продуцирующей его (если оно не секретируется). Выбор подходящей клетки–хозяина будет зависеть от различных факторов, таких как требуемые уровни экспрессии, полипептидные модификации, желательные или необходимые для активности (такие как гликозилирование или фосфорилирование), и легкость сворачивания в биологически активную молекулу.

[220] Типичные клетки–хозяева включают прокариотические, дрожжевые или высшие эукариотические клетки. Прокариотические клетки–хозяева включают

эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, Enterobacteriaceae такие как *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans* и *Shigella*, а также *Bacillus*, например, *B. subtilis* и *B. licheniformis*, *Pseudomonas* и *Streptomyces*. Эукариотические микробы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии рекомбинантных полипептидов. *Saccharomyces cerevisiae* или обыкновенные пекарские дрожжи наиболее часто применяются среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако несколько других родов, видов и штаммов являются общедоступными и применимыми в данном документе, например, такие как *Pichia*, например, *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*, *Yarrowia*; *Candida*; *Trichoderma reesia*; *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, например *Schwanniomyces occidentalis*; и нитчатые грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* и хозяева *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

[221] Клетки-хозяева для экспрессии гликозилированных антигенсвязывающих белков могут быть получены из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы и варианты и соответствующие пермиссивные клетки-хозяева насекомых из таких хозяев, как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (фруктовая муха) и *Bombyx mori*. Общедоступно множество вирусных штаммов для трансфекции таких клеток, например, вариант L-1 *Autographa californica* NPV и штамм Bm-5 *Bombyx mori* NPV.

[222] Клетки-хозяева позвоночных также являются подходящими хозяевами, и рекомбинантное получение антигенсвязывающих белков из таких клеток стало обычной процедурой. Клеточные линии млекопитающих, доступные как хозяева для экспрессии, хорошо известны из уровня техники и включают без ограничения immortalized клеточные линии, доступные из Американской коллекции типовых культур (ATCC), в том числе без ограничения клетки яичника китайского хомяка (CHO), в том числе клетки CHOK1 (ATCC CCL61), DXB-11, DG-44 и клетки яичника китайского хомяка/-DHFR (CHO, Urlaub et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216, 1980); линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); эмбриональная почечная линия человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре (Graham et al, J. Gen Virol. 36: 59, 1977); клетки почки детеныша хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251, 1980); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы линии buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки гепатомы человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC

CCL51); клетки TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44–68, 1982); клетки MRC 5 или клетки FS4; клетки миеломы млекопитающих и несколько других клеточных линий. В определенных вариантах осуществления клеточные линии могут быть выбраны посредством определения того, какие клеточные линии обладают высокими уровнями экспрессии и конститутивно продуцируют антигенсвязывающие белки со свойствами, заключающимися в связывании TREM2 человека. В другом варианте осуществления может быть выбрана клеточная линия из В-лимфоцитарной линии дифференцировки, которая не продуцирует свое собственное антитело, но обладает способностью продуцировать и секретировать гетерологичное антитело. Клетки СНО являются предпочтительными клетками-хозяевами в некоторых вариантах осуществления для экспрессии антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 по настоящему изобретению.

[223] Клетки-хозяева трансформируют или трансфицируют с помощью описанных выше нуклеиновых кислот или векторов для получения антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 и культивируют в стандартных питательных средах, модифицированных в зависимости от необходимости индуцирования промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности. Кроме того, новые векторы и трансфицированные клеточные линии с несколькими копиями транскрипционных единиц, разделенных селективным маркером, особенно полезны для экспрессии антигенсвязывающих белков. Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу получения описанного в данном документе антигенсвязывающего белка-агониста TREM2, такого как моноклональное антитело-агонист TREM2, или его связывающего фрагмента, предусматривающему культивирование клетки-хозяина, содержащей один или более векторов экспрессии, описанных в данном документе, в культуральной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию антигенсвязывающего белка, кодируемого одним или более векторами экспрессии; и выделение антигенсвязывающего белка из культуральной среды или клетки-хозяина.

[224] Клетки-хозяева, применяемые для получения антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению, можно культивировать в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как Ham's F10 (Sigma), минимальная питательная среда (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная по Дульбекко среда Игла (DMEM, Sigma), подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, любая из сред, описанных в Ham et al., *Meth. Enz.* 58: 44, 1979; Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102: 255, 1980; патентах США №№ 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; или 5122469; WO90103430; WO 87/00195; или патенте США № RE30985, может быть использована как культуральная среда для клеток-хозяев. Любую из этих сред можно, при необходимости, дополнить гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как Gentamycin™ лекарственное средство), микроэлементами

(определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые должны быть известны специалистам в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т. п., являются такими, которые ранее использовались для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и будут очевидны для специалиста обычной квалификации в данной области техники.

[225] После культивирования клеток-хозяев антигенсвязывающий белок может продуцироваться внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или непосредственно секретироваться в среду. Если антигенсвязывающий белок продуцируется внутриклеточно, то в качестве первой стадии удаляют твердые остатки, либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты, например путем центрифугирования или ультрафильтрации. Антигенсвязывающий белок можно очищать с применением, например, гидроксиапатитовой хроматографии, катионной или анионообменной хроматографии, эксклюзионной хроматографии или предпочтительно аффинной хроматографии с применением представляющего(-их) интерес антигена(-ов), или белка, А или белка G как аффинного лиганда. Белок А можно применять для очистки белков, которые включают полипептиды, которые основаны на тяжелых цепях иммуноглобулина $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (Lindmark et al, J. Immunol. Meth. 62: 1–13, 1983). Белок G рекомендуется для всех изотипов мыши и для иммуноглобулина $\gamma 3$ человека (Guss et al., EMBO J. 5: 15671575, 1986). Матрица, к которой присоединяется аффинный лиганд, наиболее часто является агарозой, но также доступны другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают более высокие скорости потока и меньшее время обработки, чем те, которые достигаются при использовании агарозы. В случае если белок содержит домен СНЗ, для очистки можно применять смолу Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Другие методики очистки белков, такие как осаждение этанолом, обращенно-фазовая HPLC, хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония, также возможны в зависимости от конкретного антигенсвязывающего белка, который необходимо извлечь.

[226] В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции (например, фармацевтической композиции), содержащей один или множество антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 по настоящему изобретению (например, моноклональные антитела-агонисты TREM2 или их связывающие фрагменты) вместе с фармацевтически приемлемыми разбавителями, носителями, вспомогательными веществами, солюбилизаторами, эмульгаторами, консервантами и/или адъювантами. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают без ограничения жидкие, замороженные и лиофилизированные композиции. "Фармацевтически приемлемый" относится к молекулам, соединениям и композициям, которые нетоксичны для людей-реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях и/или не вызывают

аллергических или побочных реакций в случае введения людям. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать материалы лекарственного состава для изменения, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникающей способности композиции. В таких вариантах осуществления подходящие материалы лекарственного состава включают без ограничения аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин); противомикробные препараты; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидрогенсульфит натрия); буферы (такие как борат, бикарбонат, Трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты); объемобразующие препараты (такие как маннит или глицин); хелатирующие средства (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); комплексообразующие средства (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); красители, ароматизаторы и разбавители; эмульгирующие вещества, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как бензалкония хлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенол, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие средства; поверхностно-активные вещества или увлажняющие средства (такие как плуроники, PEG, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат 80, тритон, триметамин, лецитин, холестерин, тилоксапал); средства, повышающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); средства, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); средства доставки; разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические адъюванты. Способы и подходящие материалы для составления молекул для терапевтического применения известны в фармацевтике и описаны, например, в REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

[227] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит стандартный фармацевтический носитель, такой как стерильный забуференный фосфатом физиологический раствор, бактериостатическая вода и т. п. Можно применять различные водные носители, например, воду, забуференную воду, 0,4% физиологический раствор, 0,3% глицин и т. п., и они могут включать другие белки для повышенной стабильности, такие как альбумин, липопротейн, глобулин и т. д., подвергнутые небольшим химическим модификациям или т. п.

[228] Примерные концентрации антигенсвязывающих белков в композиции могут

составлять от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, или от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, или от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл, или в качестве альтернативы от приблизительно 2 мг/мл до приблизительно 10 мг/мл. Водный состав антигенсвязывающего белка может быть получен в рН-буферном растворе, например, при рН в диапазоне от приблизительно 4,5 до приблизительно 6,5, или от приблизительно 4,8 до приблизительно 5,5, или в качестве альтернативы приблизительно 5,0. Примеры буферов, подходящих для рН в этом диапазоне, включают ацетатные (например, ацетат натрия), сукцинатные (такие как сукцинат натрия), глюконатные, гистидиновые, цитратные и другие буферы органических кислот. Концентрация буфера может составлять от приблизительно 1 мМ до приблизительно 200 мМ или от приблизительно 10 мМ до приблизительно 60 мМ, в зависимости, например, от буфера и требуемой изотоничности состава.

[229] В состав может быть включен регулятор тоничности, который также может участвовать в стабилизации антигенсвязывающего белка. Примеры регуляторов тоничности включают полиолы, такие как маннит, сахароза или трегалоза. Предпочтительно, водная композиция является изотонической, хотя подходящими могут быть гипертонические или гипотонические растворы. Примерные концентрации полиола в композиции могут составлять от приблизительно 1% до приблизительно 15% вес/об.

[230] Поверхностно-активное вещество также может быть добавлено к составу антигенсвязывающего белка для уменьшения агрегации составленного антигенсвязывающего белка, и/или минимизации образования частиц в составе, и/или снижения адсорбции. Типичные поверхностно-активные вещества включают неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты (например, полисорбат 20 или полисорбат 80) или полуксамеры (например, полуксамер 188). Примерные концентрации поверхностно-активного вещества могут составлять от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,5%, или от приблизительно 0,005% до приблизительно 0,2%, или в качестве альтернативы от приблизительно 0,004% до приблизительно 0,01% вес/об.

[231] В одном варианте осуществления композиция содержит идентифицированные выше средства (т. е. антигенсвязывающий белок, буфер, полиол и поверхностно-активное вещество) и фактически не содержит одного или более консервантов, таких как бензиловый спирт, фенол, м-крезол, хлорбутанол и хлорид бензетония. В другом варианте осуществления в композицию может быть включен консервант, например, в концентрациях, составляющих от приблизительно 0,1% до приблизительно 2% или в качестве альтернативы от приблизительно 0,5% до приблизительно 1%. Один или более других фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ или стабилизаторов, таких как те, которые описаны в REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (AR Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company, могут быть включены в состав при условии, что они не оказывают неблагоприятного воздействия на требуемые характеристики состава.

[232] Терапевтические составы антигенсвязывающего белка готовят для хранения

путем смешивания антигенсвязывающего белка, характеризующегося требуемой степенью чистоты, с необязательными физиологически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company) в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при применяемых дозах и концентрациях и включают буферы (например, фосфатный, цитратный и буферы на основе других органических кислот); антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту и метионин); консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (например, меньше чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); гидрофильные полимеры (например, поливинилпирролидон); аминокислоты (например, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин); моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкоза, манноза или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты (например, полисорбат 20 или полисорбат 80) или полуксамеры (например, полуксамер 188) или полиэтиленгликоль (PEG).

[233] В одном варианте осуществления подходящая композиция согласно заявленному изобретению содержит изотонический буфер, такой как фосфатный, ацетатный или Трис-буфер, в комбинации с регулятором тоничности, таким как полиол, сорбит, сахароза или хлорид натрия, который тонизирует и стабилизирует. Одним примером такого регулятора тоничности является 5% сорбит или сахароза. Кроме того, состав может необязательно включать поверхностно-активное вещество в количестве от 0,01% до 0,02% вес/об., например, для предотвращения агрегации или улучшения стабильности. Значение pH композиции может составлять от 4,5 до 6,5 или от 4,5 до 5,5. Другие иллюстративные описания фармацевтических составов для антигенсвязывающих белков можно найти в публикации патента США № 2003/0113316 и патенте США № 6171586, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[234] Также рассматриваются суспензии и кристаллические формы антигенсвязывающих белков. Способы получения суспензий и кристаллических форм известны специалисту в данной области техники.

[235] Составы, применяемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Композиции по настоящему изобретению могут быть стерилизованы с помощью стандартных, хорошо известных методик стерилизации. Например, стерилизация легко

осуществляется путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. Полученные растворы могут быть упакованы для применения или отфильтрованы в асептических условиях и лиофилизированы, причем лиофилизированный препарат объединяют со стерильным раствором перед введением.

[236] Процесс высушивания вымораживанием часто используется для стабилизации полипептидов для длительного хранения, особенно в случае если полипептид относительно нестабилен в жидких композициях. Цикл лиофилизации обычно состоит из трех стадий: замораживание, первичное высушивание и вторичное высушивание (см. Williams and Polli, *Journal of Parenteral Science and Technology*, Volume 38, Number 2, pages 48–59, 1984). На стадии замораживания раствор охлаждают до тех пор, пока он не будет надлежащим образом заморожен. Объемная вода в растворе на этой стадии образует лед. Лед сублимирует на стадии первичного высушивания, которую осуществляют путем понижения давления в камере ниже давления паров льда с применением вакуума. Наконец, сорбированную или связанную воду удаляют на стадии вторичного высушивания при пониженном давлении в камере и повышенной температуре полки. Посредством такого способа получают материал, известный как лиофилизированная масса. После этого масса может быть восстановлена перед применением.

[237] Стандартная практика восстановления лиофилизированного материала заключается в добавлении объема чистой воды (обычно эквивалентного объему, удаленному во время лиофилизации), хотя при производстве фармацевтических препаратов для парентерального введения иногда используются разбавленные растворы антибактериальных средств (см. Chen, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, Volume 18: 1311–1354, 1992).

[238] Было отмечено, что в некоторых случаях вспомогательные вещества действуют как стабилизаторы для продуктов, подвергнутых сублимационному высушиванию (см. Carpenter et al., Volume 74: 225–239, 1991). Например, известные вспомогательные вещества включают полиолы (в том числе маннит, сорбит и глицерин); сахара (в том числе глюкозу и сахарозу) и аминокислоты (в том числе аланин, глицин и глутаминовую кислоту).

[239] Кроме того, полиолы и сахара также часто применяют для защиты полипептидов от замерзания и повреждения, вызванного высыханием, и для повышения стабильности при хранении в высушенном состоянии. В целом, сахара, в частности дисахариды, эффективны как в способе сублимационного высушивания, так и при хранении. Другие классы молекул, включая моно- и дисахариды и полимеры, такие как PVP, также были описаны как стабилизаторы лиофилизированных продуктов.

[240] Для инъекции фармацевтическая композиция и/или лекарственный препарат могут быть представлены в виде порошка, подходящего для разбавления подходящим раствором, как описано выше. Их примеры включают без ограничения лиофилизированные, ротационно-высушенные или высушенные с помощью

распылительного высушивания порошки, аморфные порошки, гранулы, осадки или частицы. Для инъекции составы могут необязательно содержать стабилизаторы, модификаторы pH, поверхностно-активные вещества, модификаторы биодоступности и комбинации указанных.

[241] Можно получать препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антигенсвязывающий белок, причем эти матрицы имеют форму формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и этил-L-глутамата, неразлагаемый этилен-винилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как Lupron Depot™ (инъецируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и ацетата лейпролида) и поли-D-(-)-3-гидрокси-масляную кислоту. Хотя полимеры, такие как этилен-винилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота, дают возможность высвобождать молекулы в течение более 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. В случае если инкапсулированные полипептиды остаются в организме в течение длительного времени, они могут денатурировать или агрегировать в результате воздействия влаги при 37°C, что приводит к потере биологической активности и возможным изменениям в иммуногенности. Для стабилизации могут быть разработаны рациональные стратегии в зависимости от используемого механизма. Например, если обнаружено, что механизм агрегации заключается в образовании межмолекулярных S-S-связей посредством тиодисульфидного обмена, то стабилизация может быть достигнута путем модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислых растворов, контроля содержания влаги, применения соответствующих добавок и разработки специфических полимерных матричных композиций.

[242] Составы по настоящему изобретению могут быть разработаны для кратковременного, быстрого высвобождения, длительного действия или замедленного высвобождения. Таким образом, фармацевтические составы также могут быть составлены для контролируемого высвобождения или для медленного высвобождения.

[243] Конкретные дозы могут быть скорректированы в зависимости от заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению (например, болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, лобно-височная деменция или болезнь Насу-Хаккола), возраста, веса тела, общего состояния здоровья, пола и рациона питания субъекта, интервалов доз, путей введения, скорости выведения и комбинаций лекарственных средств.

[244] Антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению можно вводить любыми подходящими способами, включая парентеральное, подкожное,

внутрибрюшинное, внутрилегочное, интратекальное, интрацеребральное, интрацеребровентрикулярное и интраназальное и, если требуется, для местного лечения, внутриочаговое введение. Парентеральное введение включает внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутримышечное, внутрикожное или подкожное введение. Кроме того, антигенсвязывающий белок подходящим образом вводят путем импульсной инфузии, в частности при снижающихся дозах антигенсвязывающего белка. Предпочтительно дозу вводят путем инъекций, наиболее предпочтительно внутривенных или подкожных инъекций, в зависимости от того, является ли введение краткосрочным или длительным. Предусматриваются другие способы введения, в том числе местное, в частности, трансдермальное, трансмукозальное, ректальное, пероральное или местное введение, например, через катетер, расположенный рядом с нужным участком. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 по настоящему изобретению вводят внутривенно или подкожно в физиологическом растворе в дозе от 0,01 мг/кг до 100 мг/кг, с частотой от ежедневной до еженедельной или ежемесячной (например, каждый день, через день, каждый третий день или 2, 3, 4, 5 или 6 раз в неделю), предпочтительно, доза составляет в диапазоне от 0,1 до 45 мг/кг, от 0,1 до 15 мг/кг или от 0,1 до 10 мг/кг с частотой один раз в неделю, один раз каждые две недели или один раз в месяц.

[245] Описанные в данном документе антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 (например, моноклональные антитела–агонисты TREM2 и их связывающие фрагменты) полезны для предупреждения, лечения или улучшения состояния, связанного с дефицитом TREM2 или утратой биологической функции TREM2 у нуждающегося в этом пациента. Используемый в данном документе термин "осуществление лечения" или "лечение" представляет собой вмешательство, выполненное с целью предупреждения развития или изменения патологии нарушения. Соответственно "лечение" относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам. К пациентам, нуждающимся в лечении, относятся пациенты, у которых уже диагностировано нарушение или состояние или которые страдают от них, а также пациенты, у которых надлежит предупредить расстройство или состояние, такие как пациенты, которые имеют риск развития нарушения или состояния, например, на основании генетических маркеров. Термин "лечение" относится к любому признаку успеха в уменьшении выраженности повреждения, патологии или состояния, включая любой объективный или субъективный параметр, такой как ослабление боли или выраженности симптомов, ремиссия, ослабление симптомов или способствование лучшей переносимости повреждения, патологии или состояния у пациента, замедление темпов дегенерации или ухудшения, способствование менее тяжелому протеканию конечной стадии дегенерации или улучшение физического или психического здоровья пациента. Лечение или облегчение симптомов может быть основано на объективных или субъективных параметрах, в том числе по результатам физического осмотра, самоотчетов пациента, когнитивных тестов, моторных функциональных тестов, психоневрологических

обследований и/или психиатрической оценки.

[246] Биологическая активность TREM2 задействована в различных физиологических процессах, в том числе процессах в миелоидных клетках, таких как фагоцитоз, пролиферация, выживание и регуляция продукции воспалительных цитокинов; остеокластогенез; дифференцировка остеокластов; отрицательная регуляция аутоиммунитета; воспалительные ответы; реконструкция и восстановление костей; резорбция кости; восстановление тканей, микроглиоз и гомеостаз мозга. См. например, Colonna, *Nature Reviews Immunology*, Vol. 3: 445–453, 2003; Paradowska–Gorycka et al., *Human Immunology*, Vol. 74: 730–737, 2013 и Ulrich and Holtzman, *ACS Chem. Neurosci.*, Vol. 7: 420–427, 2016. Утрата функции TREM2 или дефицит TREM2 связывают с несколькими нарушениями и заболеваниями, в том числе поликистозной липомембранозной остеодисплазией со склерозирующей лейкоэнцефалопатией (PLOS; также известная как болезнь Насу–Хакола), болезнью Альцгеймера, лобно–височной деменцией, рассеянным склерозом, прионной болезнью, инсультом и остеопетрозом. См. например., Jonsson et al., *New England Journal of Medicine*, Vol. 368: 107–116, 2013; Guerreiro et al., *New England Journal of Medicine*, Vol. 368: 117–127, 2013; Paradowska–Gorycka et al., *Human Immunology*, Vol. 74: 730–737, 2013 и Ulrich and Holtzman, *ACS Chem. Neurosci.*, Vol. 7: 420–427, 2016. Таким образом, антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению можно вводить пациентам для предупреждения, ослабления или лечения любого из этих заболеваний или нарушений или других состояний, связанных с дефицитом TREM2 или утратой биологической функции или активности TREM2. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам предупреждения, лечения или улучшения состояния, связанного с дефицитом TREM2 или утратой функции TREM2 у пациента, нуждающегося в этом, предусматривающим введение пациенту эффективного количества антигенсвязывающего белка–агониста TREM2, описанного в данном документе. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2 представляет собой моноклональное антитело–агонист TREM2 или его связывающий фрагмент. Термин "пациент" включает пациентов–людей и используется взаимозаменяемо с термином "субъект".

[247] Как правило, "эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для уменьшения выраженности и/или частоты симптомов, устранения симптомов и/или основной причины, предотвращения возникновения симптомов и/или их основной причины и/или улучшения или устранения повреждения, которое является результатом или связано с конкретным состоянием. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой терапевтически эффективное количество или профилактически эффективное количество. "Терапевтически эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для ослабления интенсивности патологического состояния или симптома(–ов), в частности, состояния или симптома(–ов), связанных с патологическим состоянием, или иного предупреждения,

препятствования, замедления или обращения вспять прогрессирования патологического состояния или любого другого нежелательного симптома, связанного с заболеванием в какой бы то ни было форме (т. е. которое обеспечивает "терапевтическую эффективность") "Профилактически эффективное количество" представляет собой количество антигенсвязывающего белка, которое при введении субъекту будет оказывать предполагаемый профилактический эффект, например, предупреждение или задержка возникновения (или повторения) состояния или снижение вероятности возникновения (или повторения) состояния. Полный терапевтический или профилактический эффект не обязательно возникает в результате введения одной дозы и может возникнуть только после введения серии доз. Таким образом, терапевтически или профилактически эффективное количество может быть введено одним или большим количеством введений.

[248] Состояния или нарушения, связанные с дефицитом TREM2 или утратой функции TREM2, которые можно предупреждать, лечить или улучшать в соответствии со способами по настоящему изобретению, включают без ограничения болезнь Насу–Хакола, болезнь Альцгеймера, лобно–височную деменцию, рассеянный склероз, синдром Гийена–Барре, боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона, черепно–мозговую травму, повреждение спинного мозга, системную красную волчанку, ревматоидный артрит, прионную болезнь, инсульт, остеопороз, остеопетроз и остеосклероз. В определенных вариантах осуществления состояние или нарушение, которое подлежит предупреждению, лечению или улучшению в соответствии со способами по настоящему изобретению, представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Насу–Хакола, лобно–височную деменцию, рассеянный склероз, прионную болезнь или инсульт.

[249] В одном варианте осуществления настоящее изобретение предоставляет способ предупреждения, лечения или ослабления болезни Альцгеймера у пациента, нуждающегося в этом, предусматривающий введение пациенту эффективного количества антигенсвязывающего белка–агониста TREM2, описанного в данном документе. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2, вводимый пациенту, представляет собой моноклональное антитело–агонист TREM2, такое как антитела, чьи вариабельные последовательности и последовательности CDR приведены в таблицах 1A, 1B, 2A, 2B, 3A и 3B. В некоторых вариантах осуществления пациент, которому вводят антигенсвязывающий белок–агонист TREM2, является пациентом с риском развития болезни Альцгеймера. Например, в одном варианте осуществления было определено, что у пациента имеется по меньшей мере один аллель, содержащий мутацию rs75932628–Т в гене TREM2, например, у пациента наблюдался генотип СТ при rs75932628. В связанных вариантах осуществления пациент с риском развития болезни Альцгеймера является пациентом, у которого определено наличие аллеля варианта TREM2, который кодирует гистидин вместо аргинина в положении 47 в SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления было определено, что пациент имеет по меньшей мере один аллель, содержащий мутацию rs143332484–Т в гене TREM2, например, у пациента наблюдался генотип СТ при rs143332484. В связанных вариантах

осуществления пациент с риском развития болезни Альцгеймера является пациентом, у которого определено наличие аллеля варианта TREM2, который кодирует гистидин вместо аргинина в положении 62 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления было установлено, что у пациента с риском развития болезни Альцгеймера имеется по меньшей мере один аллель, содержащий мутацию rs6910730–G в гене TREM1, по меньшей мере один аллель, содержащий мутацию rs7759295–C перед геном TREM2, и/или по меньшей мере один ε4–аллель гена APOE.

[250] В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу предупреждения, лечения или ослабления лобно–височной деменции или болезни Насу–Хакола у пациента, нуждающегося в этом, предусматривающему введение пациенту эффективного количества антигенсвязывающего белка–агониста TREM2, описанного в данном документе. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2, вводимый пациенту, представляет собой моноклональное антитело–агонист TREM2, такое как антитела, чьи вариабельные последовательности и последовательности CDR приведены в таблицах 1A, 1B, 2A, 2B, 3A и 3B. В некоторых вариантах осуществления пациент, которому вводят антигенсвязывающий белок–агонист TREM2, является пациентом с риском развития лобно–височной деменции или болезни Насу–Хакола. Например, в одном таком варианте осуществления было установлено, что у пациента имеется по меньшей мере один аллель, содержащий мутацию rs104894002–A в гене TREM2, например, у пациента наблюдался генотип GA или AA при rs104894002. В связанных вариантах осуществления пациент с риском развития лобно–височной деменции или болезни Насу–Хакола является пациентом, у которого определено наличие аллеля варианта TREM2, который кодирует усеченный белок TREM2 в результате замены стоп–кодона вместо глутамина в положении 33 в SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления было определено, что у пациента имеется по меньшей мере один аллель, содержащий мутацию rs201258663–A в гене TREM2, например, у пациента наблюдался генотип GA или AA при rs201258663. В связанных вариантах осуществления пациент с риском развития лобно–височной деменции или болезни Насу–Хакола является пациентом, у которого определено наличие аллеля варианта TREM2, который кодирует метионин вместо треонина в положении 66 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления пациент с риском развития лобно–височной деменции или болезни Насу–Хакола является пациентом, у которого определено наличие аллеля варианта TREM2, который кодирует цистеин вместо тирозина в положении 38 в SEQ ID NO: 1.

[251] В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу предупреждения, лечения или ослабления рассеянного склероза у пациента, нуждающегося в этом, предусматривающему введение пациенту эффективного количества антигенсвязывающего белка–агониста TREM2, описанного в данном документе. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2, вводимый пациенту, представляет собой моноклональное антитело–агонист TREM2, такое как антитела, чьи вариабельные последовательности и

последовательности CDR приведены в таблицах 1A, 1B, 2A, 2B, 3A и 3B. В некоторых вариантах осуществления пациент, которому вводят антигенсвязывающий белок–агонист TREM2, является пациентом с риском развития рассеянного склероза.

[252] Как описано в примерах 9 и 10, антитело–агонист TREM2, способное активировать передачу сигналов TREM2/DAP12, измеряемую по увеличению уровней pSyk, устраняет дефект жизнеспособности у макрофагов и микроглии в результате мутации с утратой функции в TREM2 и восстанавливает секрецию CCL2 из TREM2–дефицитных макрофагов. Эти результаты показывают, что активация передачи сигналов TREM2/DAP12 с помощью антитела–агониста к TREM2 может усиливать функцию макрофаг/микроглия, которая в свою очередь может быть терапевтической в условиях, связанных с недостаточной функцией макрофаг/микроглия. Таким образом, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ повышения выживаемости или пролиферации миелоидных клеток, таких как клетки микроглии, макрофаги или дендритные клетки, у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества антигенсвязывающего белка–агониста TREM2, описанного в данном документе. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок–агонист TREM2, вводимый пациенту, представляет собой моноклональное антитело–агонист TREM2, такое как антитела, чьи переменные последовательности и последовательности CDR приведены в таблицах 1A, 1B, 2A, 2B, 3A и 3B. В некоторых вариантах осуществления пациент, нуждающийся в лечении, находится в группе риска, страдает или у него было диагностировано нейродегенеративное нарушение. В одном варианте осуществления нейродегенеративное нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления пациент, нуждающийся в лечении, находится в группе риска, страдает или у него было диагностировано аутоиммунное нарушение. В одном варианте осуществления аутоиммунное нарушение представляет собой рассеянный склероз.

[253] Антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 по настоящему изобретению также применимы для выявления TREM2 человека в биологических образцах и идентификации клеток или тканей, которые экспрессируют TREM2 человека. Например, антигенсвязывающие белки можно применять в диагностических анализах, например, в иммуноанализах для выявления и/или количественного определения TREM2, экспрессируемого в ткани или клетке (макрофаги или микроглия), или наличия растворимых форм TREM2 в жидкости организма, такой как цереброспинальная жидкость, кровь, сыворотка или плазма. Кроме того, описанные в данном документе антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 можно применять для активации передачи сигналов TREM2/DAP12 в миелоидных клетках, модулируя тем самым биологическую активность этих клеток. Такие биологические активности включают высвобождение цитокинов, фагоцитоз и микроглиоз.

[254] Антигенсвязывающие белки–агонисты TREM2 описанные в данном документе, можно применять для диагностических целей для выявления, диагностики или

мониторинга состояний, связанных с дисфункцией TREM2, таких как нейродегенеративные заболевания (например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона), повреждение центральной нервной системы (травматическое повреждение головного мозга, повреждение спинного мозга, инсульт), аутоиммунные заболевания (рассеянный склероз, ревматоидный артрит, системная красная волчанка), лобно-височная деменция, болезнь Насу-Хакола и заболевания костей (например, остеопороз, остеопетроз, остеосклероз). Например, повышение уровня растворимой формы TREM2 в спинномозговой жидкости наблюдалось у пациентов с рассеянным склерозом (Piccio et al., *Brain*, Vol. 131: 3081–3091, 2008). Также предусмотрены способы выявления присутствия TREM2 в образце с применением классических иммуногистологических способов, известных специалистам в данной области техники (например, Tijssen, 1993, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, Vol 15 (Eds R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg, Elsevier, Amsterdam); Zola, 1987, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147–158 (CRC Press, Inc.); Jalkanen et al., 1985, *J. Cell. Biol.* 101:976–985; Jalkanen et al., 1987, *J. Cell Biol.* 105:3087–3096). Примеры способов, применяемых для выявления наличия TREM2, включают иммуноанализы, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и радиоиммуноанализ (RIA), с применением антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе. Выявление TREM2 может быть проведено *in vivo* или *in vitro*.

[255] Для диагностических применений антигенсвязывающий белок можно подвергать мечению с помощью выявляемой группы мечения. Подходящие группы мечения включают без ограничения радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные группы (например, FITC, родамин, люминофоры на основе комплексов лантанидов), ферментные группы (например, пероксидазу хрена, β -галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентные группы, биотинильные группы или заданные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновых застёжек, сайты связывания для вторичных антител, домены связывания металлов, эпитопные метки). В некоторых вариантах осуществления группа метки соединена с антигенсвязывающим белком через спейсерные плечи различной длины для уменьшения потенциального стерического препятствия. Различные способы мечения белков известны из уровня техники и могут быть применены.

[256] В другом варианте осуществления антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, можно применять для идентификации клетки или клеток, которые экспрессируют TREM2. В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий белок подвергают мечению посредством группы мечения и при этом выявляют связывание меченого антигенсвязывающего белка с TREM2. Антигенсвязывающие белки также можно применять в анализах иммунопреципитации в биологических образцах. В еще одном конкретном варианте осуществления связывание антигенсвязывающего белка с TREM2 выявляют *in vivo*. В дополнительном конкретном варианте осуществления

антигенсвязывающий белок выделяют и измеряют с применением методик, известных из уровня техники. См., например, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor (ред.1991 и периодические дополнения); John E. Coligan, ed., 1993, *Current Protocols In Immunology* New York: John Wiley & Sons.

[257] Следующие примеры, в том числе проведенные эксперименты и достигнутые результаты, предоставлены только для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие объем прилагаемой формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 Получение антител к TREM2 человека

Иммунизации

[258] Полностью человеческие антитела к TREM2 человека получали путем иммунизации трансгенных мышей XenoMouse[®]. Такие трансгенные мыши несут трансгены иммуноглобулина человека, которые обеспечивают выработку антигенспецифических полностью человеческих антител при иммунизации. См., например, патенты США 6114598; 6162963; 6833268; 7049426; 7064244; Green et al., 1994, *Nature Genetics* 7:13–21; Mendez et al., 1997, *Nature Genetics* 15:146–156; Green and Jakobovitis, 1998, *J. Ex. Med*, 188:483–495; Green, 1999, *Journal of Immunological Methods* 231:11–23; Kellerman and Green, *Current Opinion in Biotechnology* 13, 593–597, 2002, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Для иммунизации использовали животных из штаммов XMG2–K, XMG2–KL, XMG4–K и XMG4–KL XenoMouse[®]. Мыши из штаммов XMG2–K и XMG2–KL XenoMouse[®] продуцируют полностью человеческие антитела IgG2 с каппа–легкими цепями (XMG2–K) или с каппа– и ламбда–легкими цепями (XMG2–KL). Мыши из штаммов XMG4–K и XMG4–KL XenoMouse[®] продуцируют полностью человеческие антитела IgG4 с каппа–легкими цепями (XMG4–K) или с каппа– и ламбда–легкими цепями (XMG4–KL).

[259] Для получения иммунного ответа в отношении TREM2 человека в штаммах XenoMouse[®] применяли множественные иммуногены и пути иммунизации. Для иммунизации растворимым рекомбинантным белком мышей иммунизировали растворимым белком TREM2, который представлял собой гибридный белок, содержащий внеклеточный домен (ECD) TREM2 человека (аминокислоты 1–174; SEQ ID NO: 2), слитый с N–концом Fc–области IgG1 человека посредством линкера Gly–Ser–Ser. Животных иммунизировали растворимым белком TREM2, смешанным с олигодезоксинуклеотидами CpG (CpG–ODN) или CpG–ODN, а также полиинозиновой:полицитидиловой кислотой (Poly I: C) и адъювантом QS–21 8–12 раз в течение 4–8 недель с применением подкожных инъекций. Первоначальное стимулирование содержало 10 мкг белка, тогда как последующие стимулирования содержали по 5 мкг белка.

[260] Иммуноген для генетической иммунизации был создан путем покрытия золотых шариков (BioRad, Геркулес, Калифорния, США) GM–CSF, CpG–ODN мыши и векторами экспрессии, кодирующими человеческий TREM2 дикого типа (SEQ ID NO: 1) и

человеческий DAP12 дикого типа (SEQ ID NO: 3). Генетический иммуноген доставляли в эпидермис выбритой части живота мыши с применением системы Helios Gene Gun в соответствии с инструкциями производителя (BioRad, Геркулес, Калифорния, США). Мышей иммунизировали генетическим иммуногеном 12–16 раз в течение 6–8 недель.

[261] Титры сыворотки, специфические для TREM2 человека, контролировали с помощью анализа FACS живых клеток на проточном цитометре Accuri или FACS Calibur (BD Biosciences) или с помощью TREM2-специфического ELISA. Животных с самыми высокими нативными сывороточными титрами, направленными против TREM2 человека из четырех отдельных сборов, умерщвляли и использовали для образования гибридомы. В таблице 7 ниже приводится описание каждой собранной группы.

Таблица 7. Группы иммунизации TREM2

Группа	Иммуноген	Адьювант	Штамм XenoMouse®	Сбор
Сбор 1	Растворимый белок TREM2 человека	CpG	G2K	3 мыши
			G2KL	3 мыши
Сбор 3	Растворимый белок TREM2 человека	CpG+Poly I:C+QS-21	G2K	6 мышей
			G2KL	4 мыши
Сбор 4	pTT5 вектор/TREM2 человека+pTT5 вектор/DAP12 человека	CpG+mGM-CSF	G2K	10 мышей
			G2KL	4 мыши
Сбор 5	pTT5 вектор/TREM2 человека+pTT5 вектор/DAP12 человека	CpG+mGM-CSF	G4K	4 мыши
			G4KL	4 мыши

Получение моноклональных антител

[262] Животных, имеющих подходящие антигенспецифические титры сыворотки, идентифицировали и лимфоциты получали из селезенки и/или дренирующих лимфатических узлов. Объединенные лимфоциты (из каждого сбора) отделяли от лимфоидной ткани путем измельчения в подходящей среде (например, модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM); Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). В-клетки отбирали и/или размножали с применением стандартных способов и сливали с подходящим партнером по слиянию (например, несекреторные клетки миеломы

P3X63Ag8.653) с применением традиционных методик.

[263] Для сбора 1 пулы слитых гибридом из сбора выбранной иммунной ткани высевали в виде поликлональных лунок, истощали для создания кондиционированной среды, а затем подвергали скринингу в отношении связывания с растворимым белком TREM2 человека (слитый белок, описанный выше). Хиты от этого покрытия объединяли, а затем клонально FACS–сортировали с получением одной живой клетки на лунку. Для сборов 3, 4 и 5 пулы слитых гибридом из выбранной иммунной ткани использовали как источник материала для обогащения на основе FACS. В частности, клетки гибридомы оттаивали и культивировали в средах DMEM для селекции в течение 3–4 дней. Среду заменяли на гибридомную среду BDQY за день до массовой сортировки. Клетки промывали в 10 мл стерильного буфера FACS, а затем инкубировали с биотинилированным растворимым белком TREM2 при концентрации от 2 до 5 мкг/мл, при реакционном объеме 1 мл в течение 1 часа при 4°C. Для группы сбора 3, которую иммунизировали растворимым белком TREM2, данную стадию выполняли в присутствии 100 мкг/мл поликлонального IgG человека (Jackson ImmunoResearch) для блокирования любых связующих веществ в Fc–области. Стадию блокирования поликлонального IgG человека пропускали для сборов 4 и 5, поскольку эти сборы были получены от генетически иммунизированных животных.

[264] После промывки одним разбавлением в 10 мл буфера FACS к клеткам добавляли 1 мл коктейля антител, содержащего 5 мкг/мл каждого из антитела козы к IgG человека, конъюгированного с Alexa Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch) и конъюгированного со стрептавидином Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch). Затем клетки инкубировали при 4°C в течение 30 минут. После инкубации клетки промывали в 10 мл буфера FACS, ресуспендировали в 2 мл гибридомной среды BDQY, содержащей 5 мкл 7–AAD (BD Pharmingen, Cat: 559925), а затем пропускали через сито для клеток 40 микрон, чтобы удалить любые скопления. Клетки сортировали по массе на BD FACSAria путем отбора популяции живых клеток с двойным положительным сигналом флуоресценции Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 647.

[265] Отсортированные клетки переносили в 24–луночные планшеты для тканевых культур и культивировали в течение нескольких дней, после чего их подсчитывали и снова окрашивали с помощью описанного выше способа для проверки на обогащение антигенспецифических клеток. Затем клетки отделяли по одной клетке в 384–луночные планшеты для микротитрования, содержащие гибридомную среду BDQY, и культивировали в течение до 2 недель перед тем, как супернатанты собирали для скрининга.

Пример 2. Отбор TREM2–специфических связывающих антител

[266] Антитела, полученные из гибридом, описанных в примере 1, подвергали скринингу в отношении связывания с TREM2 человека, агонистической активности TREM2 человека и перекрестной реактивности с другими белками TREM. Способы и результаты таких скринингов описаны ниже.

Первичный скрининг в отношении связывания TREM2

[267] Истощенные супернатанты гибридомы исследовали в отношении связывания с TREM2 человека с помощью ELISA. Вкратце, планшеты с нейтравидином получали путем инкубации 384-луночного планшета для анализа Corning 3702 с нейтравидином (Thermo 3100B) при 10 мкг/мл (40 мкл/лунка) в 1X PBS при 4°C в течение ночи. Планшеты промывали 1X PBS с применением машины для мойки планшетов Biotek, а затем блокировали 1% молоко/1X PBS (90 мкл/лунка) при комнатной температуре (RT) в течение 30 минут. Затем планшеты снова промывали с помощью 1X PBS с применением машины для мойки планшетов. Образец для захвата представлял собой биотинилированный растворимый белок TREM2 человека (слитый белок TREM2 ECD–huIgG1 Fc), и его добавляли в концентрации 0,5 мкг/мл в 1% молоко/1X PBS при объеме 40 мкл/лунка. Затем планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа для иммобилизации белка TREM2 в лунках планшетов. После инкубации планшеты снова промывали с помощью 1X PBS с применением машины для мойки планшетов. 10 мкл каждого супернатанта гибридомы, подлежащего исследованию, и 40 мкл 1% молоко/1X PBS (разбавление 1:5) добавляли в каждую лунку планшетов и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшеты снова промывали с помощью 1X PBS с применением машины для мойки планшетов. Антитело козы к каппа–HRP человека (Southern Biotech, 2060–05) и антитело козы к лямбда–HRP человека (Southern Biotech, 2070–05), разбавленные вместе 1:2000 в 1% молоко/1X PBS, или антитело козы к IgG Fc POD человека, разбавленное 1:4000 в 1% молоко/1X PBS, добавляли в планшеты (40 мкл/лунка) и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После того как планшеты промывали с помощью 1X PBS с применением машины для мойки планшетов, в планшеты добавляли 40 мкл/лунка субстрата TMB (Neogen, партия № 150114), и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Реакцию гасили 1 н. соляной кислотой (40 мкл/лунка) после периода инкубации. Показания OD при 450 нм получали с помощью планшет–ридера.

[268] Первичный скрининг ELISA выявил 2523 антитела, которые были положительными в отношении связывания TREM2 из четырех отдельных групп сборов. Эти идентифицированные антитела были переданы на функционально–аналитический скрининг.

Функционально–аналитический скрининг в отношении TREM2

[269] Антитела, которые дали положительный результат в отношении связывания TREM2 в анализе ELISA, оценивали на агонистическую активность в отношении TREM2 человека в клеточном анализе передачи сигналов фосфо–Syk (pSyk). TREM2 человека, который представляет собой трансмембранный гликопротеин, соединяется с адаптерным белком, DAP12, для передачи сигналов и функционирования посредством рекрутирования тирозинкиназы, ассоциированной с ζ–цепью белка 70 (ZAP70) и тирозинкиназы селезенки (Syk) (Colonna, Nature Reviews Immunology, Vol. 3: 445–453, 2003). Фосфорилированная форма Syk указывала на активацию передачи сигналов TREM2/DAP12. Таким образом,

разработали клеточный анализ AlphaLISA (Perkins Elmer) для выявления фосфорилированных форм Syk в ответ на модуляцию TREM2/DAP12. В анализе использовали антитело кролика к pSyk, биотинилированное антитело мыши к общему Syk, акцепторные гранулы, конъюгированные с антителами кролика к IgG, и донорные гранулы, покрытые стрептавидином. Фосфорилированные формы Syk, присутствующие в клеточных лизатах, связаны как антителом кролика к pSyk, так и антителом мыши к общему Syk. Акцепторные гранулы, которые конъюгированы с антителом кролика к IgG, связываются с антителом кролика к pSyk, а покрытые стрептавидином донорные гранулы связываются с биотинилированным антителом мыши к общему Syk. Возбуждение донорных гранул на длине волны 680 нм приводило к выделению синглетного кислорода, который, в свою очередь, генерировал усиленный флуоресцентный сигнал в акцепторных гранулах, создавая тем самым излучение при 615 нм. Излучение при 615 нм не обнаруживается, если донорные и акцепторные гранулы не расположены в непосредственной близости друг от друга (т. е. акцепторная гранула не рекрутируется в комплекс, поскольку Syk не фосфорилируется, а следовательно не связывается с антителом кролика к pSyk). Таким образом, количество светового излучения, излучаемого при 615 нм, пропорционально количеству фосфорилированного Syk, присутствующего в клеточном лизате, что в свою очередь указывает на активацию передачи сигналов TREM2/DAP12 посредством антитела к TREM2.

[270] Клетки HEK293T, стабильно экспрессирующие TREM2 человека и DAP12 человека (клеточная линия G13), высевали в среду для роста при 40000 клеток на лунку (в 90 или 80 мкл) в обработанные тканевой культурой 96–луночные планшеты с лунками или 50000 клеток на лунку (в 200 мкл) в планшетах с поли-D–лизином. Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. Антитела к TREM2 человека добавляли либо в одной концентрации (для первоначального скрининга в одной точке), либо в диапазоне концентраций (для исследования активности). После инкубации клеток и антител при комнатной температуре в течение 30–40 минут культуральную среду полностью удаляли. Клетки лизировали с помощью 20 мкл (для 40000 клеток) или 25 мкл (для 50000 клеток) буфера для лизиса, содержащего ингибиторы протеазы/фосфатазы, на льду в течение 45–60 минут. Клеточный лизат (5 мкл) переносили в соответствующие лунки 384–луночного белого планшета для анализа, содержащего 15 мкл смеси антител кролика к pSyk (конечная концентрация: 1 нМ), биотинилированных антител мыши к Syk (конечная концентрация: 1 нМ) и акцепторных гранул, конъюгированных с антителами кролика к IgG (конечная концентрация: 10 мкг/мл). Затем планшеты для анализа инкубировали на льду в течение 2 часов. Затем донорные гранулы, покрытые стрептавидином (5 мкл), добавляли в лунки (конечная концентрация: 40 мкг/мл) и планшеты для анализа инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа в темноте. Сигнал AlphaLISA (количество) измеряли с помощью многоканального ридера EnVision Multilabel Reader. Активность антител–агонистов сообщали как кратность контролю (S/B): S/B=сигнал образца pSyk (число импульсов)/базальный сигнал pSyk (число сигналов изотипического

контроля pSyk).

[271] Антитела из супернатантов гибридомы, которые дали положительный результат в отношении связывания TREM2, первоначально исследовали в одной концентрации в анализе pSyk. Для такого скрининга в одной точке к клеткам добавляли истощенный супернатант гибридомы (ESN), содержащий антитело к huTREM2, либо на основе объема (10 мкл для сбора 1, разбавления 1:10), либо концентрации (20 мкл ESN, которая ранее была нормализована по 10 мкг/мл для сборов 3, 4 и 5, разбавление 1:5). Из 2523 антител, положительных по связыванию TREM2 из четырех отдельных сборов, 140 антител проявляли активность в анализе pSyk в одной концентрации. Такие антитела были переданы для скрининга активности.

[272] Первоначально скрининг активности осуществляли на неочищенных количественных клональных антителах к TREM2, полученных из гибридомы, а затем на очищенных и/или рекомбинантных моноклональных антителах, полученных из гибридом. Для сбора 1, антитела к TREM2 серийно титровали 3-кратно от 100 мкг/мл до 0,005 мкг/мл, и к клеткам добавляли 10 мкл каждого разбавления (конечные концентрации антител от 10 мкг/мл до 0,0005 мкг/мл, от 66,67 нМ до 0,003 нМ). Для скрининга активности сбора 3, 4 и 5 культуральную среду полностью удаляли от клеток. Антитела к TREM2 серийно титровали 3-кратно от 2 мкг/мл до 0,003 мкг/мл в питательной среде, и к клеткам добавляли по 50 мкл каждого разбавления (конечная концентрация антитела от 13,33 нМ до 0,02 нМ). Значения EC₅₀ для каждого антитела к TREM2 определяли с помощью четырехпараметрической логистической модели подгонки GraphPad Prism Version 6.07 из 10-точечных кривых доза-ответ.

[273] Из 140 антител, подвергнутых скринингу в отношении активности, 93 антитела были отобраны для дальнейшего скрининга и определения характеристик. На фигуре 1А показаны кривые доза-ответ для лучших антител-агонистов к TREM2 из сбора 1, тогда как на фигуре 1В показаны кривые доза-ответ для лучших антител-агонистов к TREM2 из сборов 3, 4 и 5. Значения EC₅₀ для 18 лучших антител из всех четырех сборов представлены в таблице 8 ниже. Как видно из низких наномолярных или субнаномолярных значений EC₅₀, большинство антител к TREM2 являются сильными агонистами передачи сигналов TREM2/DAP12. Некоторые из антител являются более сильнодействующими и дают более высокий уровень максимальной активации передачи сигналов TREM2/DAP12, чем коммерчески доступное антитело крысы/мыши к TREM2 человека (mAb17291; IgG2b крысы клон № 237920, R&D Systems), которое имело значение EC₅₀ 0,50 нМ и E_{max} 13,8 в данном анализе. Важно отметить, что агонистическая активность антител к TREM2 наблюдалась в отсутствие перекрестносшивающего средства (например, белка G, белка A или вторичного антитела Ig человека) или иммобилизации антител (например, антител, связанных с планшетом), что свидетельствует о том, что антитела могут эффективно вовлекать и активировать TREM2 человека в растворимой мономерной форме. Для многих антител-агонистов сшивание их Fc-областей необходимо для кластеризации антител для эффективной

активации целевого рецептора. См., например, Natoni et al., British Journal of Haematology, Vol. 139: 568–577, 2007; Vonderheide and Glennie, Clin. Cancer Res., Vol. 19: 1035–1043, 2013. Такое требование к сшиванию для достижения агонистической активности наблюдали для других антител к TREM2. См., например, патент США № 8981061 и WO 2016/023019. Антитела к TREM2, описанные в данном документе, имеют преимущество перед такими другими антителами к TREM2 в том, что они являются независимыми от перекрестного сшивания агонистами TREM2 человека (например, они не требуют перекрестного сшивания или олигомеризации посредством их Fc-доменов для агонистической активности).

Селективность и перекрестная реактивность антител к TREM2

[274] Антитела к TREM2, демонстрирующие агонистическую активность в ходе скрининга в отношении активности, дополнительно оценивали на перекрестную реактивность к TREM2 мыши и макака-крабоеда, а также перекрестную реактивность к белку TREM1 человека. Для скрининга в отношении перекрестной реактивности видов, клетки HEK293 трансфицировали посредством векторов экспрессии, содержащих либо кДНК TREM2 мыши и кДНК DAP12 мыши, либо кДНК TREM2 макака-крабоеда и кДНК DAP12 макака-крабоеда, среду Gibco™ Opti-MEM® (Gibco, № по каталогу 31985088) и реагент 293Fectin™ (Invitrogen, № по каталогу 12347019) в соответствии с протоколом, установленным производителем. Перекрестную реактивность TREM1 оценивали с использованием клеточной линии, стабильно экспрессирующей TREM1/DAP12 человека. Супернатанты гибридомы подвергали скринингу в отношении наличия моноклональных антител, связывающихся с TREM1 человека, TREM2 мыши или TREM2 макака-крабоеда, с помощью инкубирования супернатантов на каждой из трансфицированных клеток в течение 1 часа с последующими стадиями промывки. Затем клетки инкубировали с антителом козы к Fc человека, конъюгированным с Alexa Fluor 647 (Jackson Immunochemicals 109–605–098), в течение 15 минут. Связывание обнаруживали с помощью FACS с применением прибора Accuri FACS с автосэмплером Intellicyt. Нерелевантные антитела изотипического контроля включали в анализ FACS. Данные представлены как кратность геометрического среднего (GM) по сравнению с нерелевантным связыванием контрольного антитела. Из 93 антител из четырех сборов, подвергнутых скринингу в отношении перекрестной реактивности, 50 антител характеризовались перекрестной реактивностью в отношении TREM2 макака-крабоеда и 9 антител характеризовались перекрестной реактивностью в отношении TREM2 мыши. Ни одно из исследуемых антител не было перекрестно реактивным в отношении TREM1 человека. Данные всех скринингов в отношении 18 лучших моноклональных антител к TREM2 из всех четырех сборов приведены в таблице 8 ниже.

Таблица 8. Сводные данные по лучшим моноклональным антителам к TREM2 из скрининга гибридомы

ID антитела	OD 450 TREM2	Изотип	Кратность pSyk по	pSyk EC50	Кратность GM	Кратность GM	Кратность GM
----------------	-----------------	--------	----------------------	--------------	-----------------	-----------------	-----------------

	человека (ELISA)		сравнению с контролем	(нМ)	TREM2 макака– крабоеда	TREM2 мыши	TREM1 человека
4C5	3,62	G2	9,26	0,18	42,3	0,4	0,8
4G10	3,17	G2	11,72	0,47	96,3	4,1	1,2
5E3	3,88	G2	8,02	0,24	89,6	2,6	1,1
6E7	3,17	G2	13,69	0,29	82,7	1,2	1,2
24A10	2,75	G2	6,8	32,9	1,4	1,1	1,1
24F4	1,20	G2	5,8	2,4	34,0	10,1	1,2
24G6	2,76	G2	11,8	1,0	12,2	0,9	1,3
25F12	1,29	G2	4,2	2,6	2,2	0,8	1,2
26A10	1,16	G2	6,0	1,3	37,5	0,8	1,5
26C10	1,59	G2	4,8	2,2	46,0	0,9	1,7
26F2	1,48	G2	5,4	1,4	72,8	1,1	1,6
32E3	1,41	G2	8,2	1,2	31,0	1,0	1,1
33B12	1,34	G2	6,0	1,0	21,7	1,0	1,4
10E3	0,55	G2	12,1	0,4	82,8	1,1	1,6
12G10	3,49	G2	11,1	0,4	2,1	1,1	1,1
13E7	0,73	G2	11,4	0,4	67,5	1,1	1,4
14C12	0,71	G2	11,1	0,4	63,2	1,1	1,4
16B8	0,59	G4	ND	ND	23,3	1,1	1,1

Пример 3. Секвенирование антител–агонистов к TREM2 человека

[275] РНК (суммарную или mRNA) очищали из лунок, содержащих клетки гибридомы, продуцирующие антитела–агонисты TREM2, с применением набора Qiagen RNeasy mini или набора Invitrogen mRNA plus. Очищенную РНК использовали для амплификации генов варибельной области (V) тяжелой и легкой цепей антитела с применением синтеза кДНК посредством обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (RT–PCR). Тяжелую цепь гамма полностью человеческого антитела получали с применением набора для ПЦР с использованием обратной транскриптазы Qiagen One Step (Qiagen). Этот набор применяли для получения кДНК первой цепи из матрицы РНК, а затем для амплификации варибельной области гамма–тяжелой цепи с применением мультиплексной ПЦР. Специфический для гамма–цепи 5'–праймер отжигали с сигнальной последовательностью тяжелой цепи антитела, тогда как 3'–праймер отжигали с областью константного домена гамма–цепи. Полностью человеческую легкую цепь каппа получали с применением набора для ПЦР с использованием обратной транскриптазы Qiagen One Step (Qiagen). Этот набор применяли

для получения кДНК первой цепи из матрицы РНК, а затем для амплификации переменной области каппа-легкой цепи с применением мультиплексной ПЦР. Специфический для каппа легкой цепи 5'-праймер отжигали с сигнальной последовательностью легкой цепи антитела, тогда как 3'-праймер отжигали с областью константного домена каппа-цепи. Полностью человеческую легкую цепь лямбда получали с применением набора для ПЦР с использованием обратной транскриптазы Qiagen One Step (Qiagen). Этот набор применяли для получения кДНК первой цепи из матрицы РНК, а затем для амплификации переменной области легкой цепи лямбда с применением мультиплексной ПЦР. Специфический для легкой цепи лямбда 5'-праймер отжигали с сигнальной последовательностью легкой цепи, тогда как 3'-праймер отжигали с областью константного домена цепи лямбда.

[276] Амплифицированную кДНК очищали ферментативно с применением экзонуклеазы I и щелочной фосфатазы, и последовательность очищенного продукта ПЦР определяли прямым секвенированием. Аминокислотные последовательности выводили из соответствующих последовательностей нуклеиновой кислоты биоинформативным методом. Для каждого образца гибридомы выполняли два дополнительных независимых полных цикла RT-PCR амплификации и секвенирования, чтобы подтвердить то, что любые наблюдаемые мутации не являлись следствием ПЦР. Аминокислотные последовательности для переменных областей легкой цепи и связанные CDR для типичных антител представлены в таблице 1А, тогда как аминокислотные последовательности для переменных областей тяжелой цепи и связанных CDR для антител представлены в таблице 1В. В таблице 6 представлены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие переменные области легкой и тяжелой цепей типичных антител.

[277] Полученные аминокислотные последовательности для каждой переменной области легкой и тяжелой цепей затем анализировали для определения происхождения антител зародышевого типа и выявления отклонений от последовательности зародышевого типа. Сравнение каждой из последовательностей переменной области легкой цепи и тяжелой цепи с их исходными последовательностями зародышевого типа показано на фигурах 2А–4В. Идентичность генов зародышевого типа указана рядом с каждым номером клона антитела. Аминокислотные последовательности, соответствующие CDR секвенированных антител, выравнивают, и результаты такого выравнивания используют для группировки клонов по подобию.

Пример 4. Эпитоп-специфическая сортировка антител-агонистов к TREM2

[278] Эпитопные библиотечки подмножества антител-агонистов к TREM2 человека определяли с применением датчиков (Kinetic) к Fc человека (18–5090) на устройстве Octet® HTX (Pall ForteBio). Каждое из шестнадцати различных антител к TREM2, полученных из гибридом, количественно определяли и загружали на один из датчиков к Fc человека при 5 мкг/мл в течение 2 минут ("загрузка антитела"). Затем датчик блокировали посредством 100 мкг/мл нерелевантного антитела IgG2 человека в течение 5

минут. Рекомбинантный растворимый белок TREM2 человека (внеклеточный домен TREM2 человека (аминокислоты 1–174), связанный с меткой Flag/His (ECD–FlagHis TREM2 человека)), добавляли к датчику при 4 мкг/мл в течение 5 минут, чтобы обеспечить связывание растворимого белка TREM2 с загруженным антителом. Затем каждое из шестнадцати различных антител к TREM2 ("сэндвич–антитело") добавляли к датчику при 5 мкг/мл и обеспечивали связывание в течение 5 минут. Все буферы для анализа содержали 10 мМ Трис (pH 7,6), 0,1% Triton X–100, 150 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂ и 1 мг/мл BSA. Анализ проводили при 25°C. Экспериментальные кинетические результаты соответствовали модели связывания 1:1.

[279] Если загруженное антитело и сэндвич–антитело связывается с идентичным эпитопом на TREM2 человека, то добавление сэндвич–антитела к датчику не будет вызывать событие связывания. Однако, если добавление сэндвич–антитела вызывает событие связывания, тогда сэндвич–антитело связывается с другим эпитопом на TREM2 человека, чем загруженное антитело, и два антитела классифицируют в разные эпитопные бины. На фигуре 5 изображены данные связывания от датчика, загруженного антителом 6E7 и подвергающегося воздействию либо антитела 5E3, либо антитела 6E7 как сэндвич–антитела. Как и ожидалось, увеличение связывания наблюдали при добавлении растворимого белка TREM2 человека, что указывает на то, что антитело 6E7 специфически связывало эпитоп на TREM2 человека. Дальнейшее связывание не наблюдали, в случае если 6E7 добавляли как сэндвич–антитело, поскольку иммобилизованное датчиком антитело 6E7 уже было связано с этим конкретным эпитопом на TREM2 человека. Однако в случае если антитело 5E3 добавляли как сэндвич–антитело, наблюдали увеличение связывания, что указывает на то, что антитело 5E3 связывается с другим эпитопом на TREM2 человека, чем антитело 6E7.

[280] Сводные данных по связыванию эпитопа для шестнадцати различных антител к TREM2 приведены ниже в таблице 9. На основании данных связывания, антитела можно сгруппировать в четыре отдельных эпитопных бина. Антитела 10E3, 13E7, 24F4, 4C5, 4G10, 32E3 и 6E7, по–видимому, имеют сходный эпитоп (бин А), который отличается от эпитопа, связанного антителами 16B8, 26A10, 26C10, 26F2, 33B12 и 5E3 (бин В). Антитела 24A10 и 24G6 имеют сходный эпитоп на TREM2 человека (бин С), тогда как антитело 25F12 имеет отличающийся эпитоп связывания (бин D) от любого из других исследуемых антител.

Таблица 9. Краткое описание эпитоп–специфической сортировки

Загружен нос Ab	Сэндвич-антитело															Бин	
	10E3	13E7	24F4	4C5	4G10	32E3	6E7	16B8	26A10	26C10	26F2	33B12	5E3	24A10	24G6		25F12
10E3	-0,024	-0,019	-0,032	-0,005	-0,019	-0,023	0,051	0,280	0,259	0,285	0,275	0,271	0,222	0,347	0,331	0,089	A
13E7	-0,019	-0,017	-0,015	ND	ND	-0,027	0,051	0,312	0,272	0,323	0,294	0,287	0,259	0,375	0,356	0,104	A
24F4	-0,002	-0,002	0,038	ND	ND	-0,021	0,054	0,454	0,449	0,552	0,477	0,454	0,434	0,585	0,523	0,180	A
4C5	0,000	Н.Д.	Н.Д.	-0,014	-0,018	-0,016	Н.Д.	Н.Д.	Н.Д.	Н.Д.	0,368	Н.Д.	Н.Д.	Н.Д.	0,438	0,154	A
4G10	-0,008	Н.Д.	Н.Д.	-0,011	-0,026	-0,020	Н.Д.	Н.Д.	Н.Д.	Н.Д.	0,334	Н.Д.	Н.Д.	Н.Д.	0,376	0,142	A
32E3	0,007	0,010	-0,001	-0,010	-0,029	-0,010	0,079	0,400	0,362	0,419	0,411	0,384	0,338	0,461	0,444	0,236	A
6E7	-0,012	-0,010	-0,039	ND	ND	-0,024	0,009	0,504	0,491	0,594	0,523	0,520	0,514	0,616	0,583	0,213	A
16B8	0,330	0,329	0,270	ND	ND	0,120	0,429	-0,009	-0,018	-0,031	-0,003	-0,017	-0,047	0,481	0,481	0,252	B
26A10	0,367	0,371	0,319	ND	ND	0,157	0,475	0,028	-0,001	-0,017	0,009	0,023	-0,052	0,596	0,557	0,347	B
26C10	0,348	0,369	0,346	ND	ND	0,141	0,472	0,006	-0,033	-0,032	-0,003	-0,009	-0,073	0,605	0,554	0,327	B
26F2	0,354	0,363	0,282	0,31	0,18	0,143	0,506	0,031	-0,016	-0,015	-0,008	0,002	-0,045	0,544	0,529	0,330	B
33B12	0,303	0,303	0,250	ND	ND	0,132	0,434	0,007	-0,020	-0,033	-0,009	-0,014	-0,055	0,439	0,446	0,275	B
5E3	0,415	0,428	0,311	ND	ND	0,176	0,565	-0,004	-0,027	-0,042	-0,014	-0,015	-0,165	0,530	0,552	0,335	B
24A10	0,380	0,383	0,335	ND	ND	0,162	0,499	0,423	0,454	0,541	0,490	0,470	0,441	0,023	0,000	0,340	C
24G6	0,317	0,338	0,251	0,268	0,184	0,126	0,412	0,369	0,354	0,384	0,399	0,388	0,328	-0,031	-0,019	0,284	C
25F12	0,273	0,278	0,244	0,265	0,199	0,154	0,371	0,399	0,343	0,418	0,366	0,345	0,380	0,509	0,488	0,011	D

Пример 5. Определение аффинности связывания антител–агонистов к TREM2

[281] Для количественной оценки аффинности связывания антител–агонистов к TREM2 человека константы скорости ассоциации и диссоциации, а также константу равновесной диссоциации, определяли с применением (Kinetic) датчиков к Fc человека на устройстве Octet® HTX (Pall ForteBio). Антитела–агонисты к TREM2 получали в нулевой среде DMEM, 250 мкл при 10 мкг/мл. Добавляли 250 мкл буфера для анализа (10 mM Трис (pH 7,6), 0,1% Triton X–100, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ и 1 мг/мл BSA) к растворам антител до конечного объема 500 мкл и конечной концентрации антител 5 мкг/мл. Датчик к Fc человека предварительно инкубировали в 200 мкл буфера для анализа в течение минимум 10 минут. Затем датчик регенерировали в течение 5 секунд в 10 mM глицине, pH 1,5. Исследуемые антитела–агонисты к TREM2 загружали на датчик в течение 2 минут, и базовые измерения проводили в течение 2 минут. Датчик с загруженными антителами связывали с рекомбинантным растворимым белком TREM2 человека (внеклеточный домен TREM2 человека (аминокислоты 1–174), связанный с меткой Flag/His (ECD–FlagHis TREM2 человека)) или рекомбинантным растворимым белком TREM2 макака–крабояда (внеклеточный домен TREM2 макака–крабояда, связанный с меткой Flag/His) в 2–кратной серии серийных разбавлений, начиная с 100 нМ с 6–точечной серией разбавлений. Обеспечивали связывание рекомбинантных белков TREM2 с нагруженным антителами датчиком в течение 10 минут, а затем измеряли диссоциацию в течение 10 минут. Анализ проводили при 25°C. Экспериментальные кинетические результаты в целом соответствовали модели связывания 1:1 для определения константы скорости ассоциации и диссоциации, а также константы равновесной диссоциации. В таблице 10 представлены результаты анализа TREM2 человека для выбранных антител, и в таблице 11 представлены результаты анализа TREM2 макака–крабояда для выбранных антител.

Таблица 10. Аффинность связывания TREM2 человека

ID антитела	K _D (M)	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (с ⁻¹)
4C5	3,1E–09	1,6E+05	4,9E–04
4G10	3,3E–09	3,0E+05	9,8E–04

ID антитела	K_D (М)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})
5E3	2,1E-09	2,5E+05	5,3E-04
6E7	2,6E-09	2,7E+05	6,9E-04
10E3	1,03E-08	1,77E+05	1,82E-03
13E7	1,10E-08	1,44E+05	1,58E-03
24G6	3,13E-09	2,20E+05	6,88E-04

Таблица 11. Аффинность связывания TREM2 макака-крабоеда

ID антитела	K_D (М)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})
4C5	3,6E-09	3,3E+05	1,2E-03
4G10	1,7E-09	5,6E+05	9,6E-04
5E3	1,6E-09	7,0E+05	1,1E-03
6E7	2,5E-09	4,6E+05	1,1E-03
10E3	1,13E-08	3,24E+05	3,66E-03
13E7	8,71E-09	2,72E+05	2,37E-03
24G6	1,99E-08	4,86E+05	9,65E-03

Пример 6. Агонистическая активность антител к TREM2 в клетках THP-1

[282] Отобранные антитела к TREM2 оценивали на их способность активировать передачу сигналов TREM2/DAP12 человека в клетках THP-1. Клеточная линия THP-1 представляет собой моноцитарную линию клеток лейкоза человека, которую обычно используют в качестве модели *in vitro* функции моноцитов и макрофагов человека (Chanput et al, International Immunopharmacology, Vol. 23: 37–45, 2014).

[283] Клетки суспензии THP-1 (1×10^6 клеток/мл) дифференцировали с помощью инкубации в среде для роста (RPMI, 10% FBS (инактивированная нагреванием, 1% Glutamax, 1% Hepes, 1% Pen/Strep), содержащей 20 нМ Phorbol 12–миристат 13–ацетат (PMA) при 37°C/5% CO₂ в течение 72 часов. После 72-часовой стимуляции клетки прикрепляли к поверхности обработанных для культуры ткани чашек. PMA осторожно промывали с помощью PBS и добавляли в свежую питательную среду, содержащую 10 нг/мл IL-4. Клетки непрерывно инкубировали при 37°C/5% CO₂ в течение еще 72 часов. На 6-й день (окончание дифференцировки клеток) клетки собирали с помощью неферментативного буфера диссоциации клеток или десорбера клеток и высевали в питательную среду при 100000 клеток на лунку в 96–луночные планшеты, обработанные для тканевой культуры. Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO₂.

[284] На следующий день клетки обрабатывали антителами к TREM2 человека в течение 10 минут при комнатной температуре, а затем среду удаляли. Клетки лизировали

посредством 30 мкл буфера для лизиса в течение 45–60 минут на льду. Клеточный лизат (5 мкл) переносили в 384-луночные планшеты для определения уровней фосфорилированного Syk (pSyk) с использованием анализа AlphaLISA, описанного в примере 2. EC50 для каждого антитела к TREM2 определяли по кривой доза–ответ с помощью четырехпараметрической логистической модели подгонки GraphPad Prism Version 6.07.

[285] Результаты эксперимента показаны на фигуре 6 и в таблице 12. Все исследованные антитела к TREM2 индуцировали уровни pSyk в зависимости от дозы в дифференцированных клетках THP–1. Все антитела к TREM2 давали большую активацию Syk, чем mAB17291 ("RnD"), коммерческое антитело крысы/мыши (IgG2b крысы клон № 237920, R&D Systems), причем десять антител приводили к 2-кратной или большей максимальной активации по сравнению с коммерческим антителом. Антитела 10E3 и 13E7 проявляли самые высокие значения E_{max}, которые были приблизительно в 4,5 раза выше, чем у коммерческого антитела.

Таблица 12. Активация передачи сигналов TREM2/DAP12 в клетках THP–1 посредством антител к TREM2

ID антитела	EC50 (нМ)	E _{max} *
4C5	1,715	265,4
4G10	0,5791	235,7
5E3	0,5935	194,8
6E7	0,8989	273,4
10E3	1,004	456,5
13E7	0,4617	459,6
16B8	0,4176	139,8
24G6	0,6622	221,1
25F12	1,048	121,5
26F2	0,07778	207,4
32E3	1,246	196,6
33B12	2,845	245,7
RnD	0,3834	100*

*E_{max} = % максимальной активации антитела по сравнению с антителом RnD (зафиксировано как 100%)

Пример 7. Конструирование антител–агонистов к TREM2

[286] Отбирали подмножество антител к TREM2 для последующего конструирования для улучшения биофизических, экспрессионных свойств и/или свойств стабильности антител. Последовательности переменных областей легкой и тяжелой цепей антител 10E3, 13E7, 4C5, 6E7, 5E3 и 24G6 анализировали в отношении

потенциальных химически "горячих точек" (например, изомеризации аспартата, дезамидирования аспарагина и окисления триптофана) и нарушений ковариации. Коррекция нарушений ковариации может улучшить термостабильность, экспрессию и биофизические свойства антител (см., например, WO 2012/125495). В таблицах 13–18 ниже суммированы результаты анализа последовательности для каждого из шести антител и определены специфические мутации в определенных положениях в последовательностях вариабельной области тяжелой и легкой цепей, которые могут быть сделаны для улучшения стабильности, экспрессии и/или биофизических свойств антител. Также указываются конкретные области (например, каркасные области 1, 2, 3 или 4 (FR1, FR2, FR3 или FR4) или определяющие комплементарность области 1, 2 или 3 (CDR1, CDR2 или CDR3) в последовательности.

Таблица 13. Сконструированные варианты антитела 10E3

Положение в последовательности VL или последовательности VH 10E3	Область	"Горячая точка"	Исходная аминокислота	Аминокислотные замены
Вариабельная последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 54)				
64	FR3	Ковариационный нарушитель	V	G, A
79	FR3	Ковариационный нарушитель	Q	E, D
80	FR3	Ковариационный нарушитель	S	P, A
85	FR3	Ковариационный нарушитель	F	V, L, A, D, I, L, M, T
94	CDR3	Потенциальный сайт окисления триптофана	W	F, Y, S, T, A, H, I, Q
100	FR4	Ковариационный нарушитель	P	R, Q, G
Вариабельная последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 117)				
19	FR1	Ковариационный нарушитель	M	K, R, T, E, N, Q
55–56	CDR2	Потенциальный сайт изомеризации	DS	ES, QS, DA, NS, DQ, TS, DV

57–58	CDR2	Потенциальный сайт изомеризации	DT	ST, ET, DA, DV, QT
104	CDR3	Потенциальный сайт окисления триптофана	W	F, Y, T, S, A, H, I, Q

Таблица 14. Сконструированные варианты антитела 13E7

Положение в последовательности VL или последовательности VH 13E7	Область	"Горячая точка"	Исходная аминокислота	Аминокислотные замены
Варибельная последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 55)				
64	FR3	Ковариационный нарушитель	V	G, A
79	FR3	Ковариационный нарушитель	Q	E, D
80	FR3	Ковариационный нарушитель	S	P, A
94	CDR3	Потенциальный сайт окисления триптофана	W	F, Y, S, T, A, H, I, Q
100	FR4	Ковариационный нарушитель	P	R, Q, G
Варибельная последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 118)				
19	FR1	Ковариационный нарушитель	M	K, R, T, E, N, Q
55–56	CDR2	Потенциальный сайт изомеризации	DS	ES, QS, DA, DQ, NS, TS, DV
57–58	CDR2	Потенциальный сайт изомеризации	DT	ST, ET, DA, DV, QT
104	CDR3	Потенциальный сайт окисления триптофана	W	F, Y, T, S, A, H, I, Q

Таблица 15. Сконструированные варианты антитела 4C5

Положение в последовательности VL или последовательности VH 4C5	Область	"Горячая точка"	Исходная аминокислота	Аминокислотные замены
Варибельная последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 60)				
60	FR3	Ковариационный нарушитель	L	S, P, D, A
92–93	CDR3	Потенциальный сайт изомеризации	DS	ES, QS, DA, DN, DQ, TS, NS, DV
Варибельная последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 123)				
27	FR1	Ковариационный нарушитель	H	Y, D, F, N
55–56	CDR2	Потенциальный сайт изомеризации	DS	ES, QS, DA, DQ, DV, TS, NS
57–58	CDR2	Потенциальный сайт изомеризации	DT	ST, ET, DA, DV, QT
105–106	CDR3	Потенциальный сайт изомеризации	DS	ES, QS, DA, DQ, DV, TS, NS, GT

Таблица 16. Сконструированные варианты антитела 6E7

Положение в последовательности VL или последовательности VH 6E7	Область	"Горячая точка"	Исходная аминокислота	Аминокислотные замены
Варибельная последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 61)				
56–57	Граница CDR2/FR3	Потенциальный сайт дезамидирования	NG	SG, TG, QG, NA, EG, NV
92–93	CDR3	Потенциальный сайт изомеризации	DS	ES, QS, DA, DN, DQ, DV, TS, NS
Варибельная последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 124)				
55–56	CDR2	Потенциальный сайт изомеризации	DS	ES, QS, DA, DQ, DV, TS,

				NS
57–58	CDR2	Потенциальный сайт изомеризации	DT	ST, ET, DA, DV, QT
105–106	CDR3	Потенциальный сайт изомеризации	DS	ES, QS, DA, DQ, DV, TS, NS, GT

Таблица 17. Сконструированные варианты антитела 5E3

Положение в последовательности VL или последовательности VH 5E3	Область	"Горячая точка"	Исходная аминокислота	Аминокислотные замены
Варибельная последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 62)				
36	FR2	Консенсусный нарушитель	F	Y
46	FR2	Ковариационный нарушитель	S	L, R, V, F
61	FR3	Консенсусный нарушитель	K	R
100	FR4	Ковариационный нарушитель	P	Q, G, R
Варибельная последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 125)				
43	FR2	Ковариационный нарушитель	L	Q, K, H
76	FR3	Ковариационный нарушитель	I	T
85	FR3	Ковариационный нарушитель	R	S, G, N, D
99–100	CDR3	Потенциальный сайт изомеризации	DG	EG, DA, DY, DV, QG, SG, TG
116	FR4	Ковариационный нарушитель	T	L, M, P, R

Таблица 18. Сконструированные варианты антитела 24G6

Положение в последовательности VL или последовательности VH 24G6	Область	"Горячая точка"	Исходная аминокислота	Аминокислотные замены
Варибельная последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 52)				
91	FR3	Ковариационный нарушитель	F	V, I, T, L, D
Варибельная последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 115)				
62–63	CDR2	Потенциальный сайт изомеризации	DS	ES, QS, DA, DQ, TS, DV, NS

Таблица 19. Типичные аминокислотные последовательности варибельной области сконструированных антител

ID Ab	Последовательность варибельной области LC	Последовательность варибельной области HC
24G6 (SST28 347 и SST204 812)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ SVLYSSNNKHFLAWYQQKPGQPPKL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFG GGTKVEIK (SEQ ID NO: 326)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGSTYYAESVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKAYTPMAFFDYWGQGTTLV TVSS (SEQ ID NO: 327)
6E7 (SST29 857)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYFCQQADAFPRTFGQGKLEIK (SEQ ID NO: 328)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDADARYSPSFQGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYFCARQRTFYDSSDYFDYWG QGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 329)
13E7 (SST20 2443)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQ SVSSNLAWFQQKPGQAPRLLIYGAST RATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQPE DFAVYYCLQDNNFPPTFGQGKVDIK (SEQ ID NO: 330)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDADARYSPSFQGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYFCARRRQGIFGDALDFWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 331)
5E3 (SST29)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQ GISNYLAWYQQKPGKAPKSLIYAASS	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTGYYIHWVRQAPGQG

825)	LQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPE DFATYYCQQYSTYPFTFGQGTKVDIK (SEQ ID NO: 332)	LEWMGWINPYSGGT TSAQKFQG RVTMTRDTSTSSAYMELSRLRSD DTAVYYCARDAGYLALYGTDV WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 333)
------	--	--

Таблица 20. Типичные переменные нуклеотидные последовательности сконструированных антител

ID Ab	Варибельная область LC	Варибельная область HC
24G6 (SST283 47 и SST2048 12)	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCA GACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCG AGAGGGCCACCATCAACTGCAAGT CCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTC CAACAATAAGCACTTCTTAGCTTG GTACCAGCAGAAACCAGGACAGCC TCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCA TCTACCCGGGAGTCCGGGGTCCCT GACCGATT CAGTGGCAGCGGGTCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTG GCAGTTTATTACTGTCAGCAATATT ATAGTACTCCGCTCACTTTCGGCGG AGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 343)	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTG GGGGAGGCTTGGTACAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT GCAGCCTCTGGATT CACCTTTAG CAGCTATGCCATGAGCTGGGTC CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGAC TGGAGTGGGTCTCAGCTATTAG TGGTAGTGGTGGTAGCACATAC TACGCAGAATCCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCTCCAGAGACAA TTCCAAGAACACGCTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCG AGGACACGGCCGTATATTACTG TGCGAAGGCGTATACACCTATG GCATTCTTTGACTACTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCA (SEQ ID NO: 344)
6E7 (SST298 57)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCA TCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAG ACAGAGTCACCATCACTTGTCGGG CGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGT TAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAG GGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCT ATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGA AGATTTTGCAACTTACTTTTGTCAA	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTG GAGCAGAGGTGAAAAAGCCCG GGGAGTCTCTGAAGATCTCCTG TAAGGGTTCTGGATACAGTTTTA CCAGCTACTGGATCGCCTGGGT GCGCCAGATGCCCGGGAAAGGC CTGGAGTGGATGGGGATCATCT ATCCTGGTGACGCTGATGCCAG ATACAGCCCGTCCTTCCAAGGC CAGGTCACCATCTCAGCCGACA AGTCCATCAGCACCGCCTACCT

	CAGGCTGACGCTTTCCCTCGCACTT TTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGA TCAA (SEQ ID NO: 345)	ACAGTGGAGCAGCCTGAAGGCC TCGGACACCGCCATGTATTTCTG TGCGAGACAAAGGACGTTTTAT TATGATAGTAGTGATTATTTTGA CTACTGGGGCCAGGGAACCCTG GTCACCGTGTCTCA (SEQ ID NO: 346)
13E7 (SST202 443)	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCA GCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGG AAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG CCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACT TAGCCTGGTTCCAGCAGAAACCTG GCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTA TGGTGCTTCCACCAGGGCCACTGG TATTCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAG TGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGA AGATTTTGCAGTTTATTACTGTCTG CAGGATAATAATTTCCCTCCCCTT TCGGCCAAGGGACCAAAGTGGATA TCAA (SEQ ID NO: 347)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTG GAGCAGAGGTGAAAAAGCCCG GGGAGTCTCTGAAGATCTCCTG TAAGGGTTCTGGATACAGCTTT ACCAGCTACTGGATCGGCTGGG TGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGG CCTGGAGTGGATGGGGATCATC TATCCTGGAGATGCTGATGCCA GATACAGCCCGTCCTTCCAAGG CCAGGTCACCATCTCAGCCGAC AAGTCCATCAGCACCGCCTACC TGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGC CTCGGACACCGCCATGTATTTCT GTGCGAGGCGGAGACAGGGGAT CTTCGGTGATGCTCTTGATTCT GGGGCCAAGGGACATTGGTCAC CGTGTCTTCA (SEQ ID NO: 348)
5E3 (SST298 25)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCA TCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAG ACAGAGTCACCATCACTTGTCGGG CGAGTCAGGGCATTAGCAATTATT TAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAG GGAAAGCCCCCTAAATCCCTGATCT ATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGA AGATTTTGCAACTTATTACTGCCAA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTG GGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG GGCCTCAGTGAAGGTGTCCTGC AAGGCTTCTGGATACACCTTCA CCGGCTACTATATCCACTGGGT GCGACAGGCCCTGGACAAGGG CTTGAGTGGATGGGATGGATCA ACCCTTACAGTGGTGGCACAAC CTCTGCACAGAAGTTTCAGGGC AGGGTCACCATGACCAGGGACA CGTCCACCAGCTCAGCCTACAT

	CAGTATAGTACTTACCCATTCACTT TCGGCCAAGGGACCAAAGTGGATA TCAAA (SEQ ID NO: 349)	GGAAGTGGAGCAGGCTGAGATCT GACGACACGGCCGTGTATTACT GTGCGAGAGATGCAGGCTACCT GGCCCTCTACGGTACGGACGTC TGGGGCCAAGGGACCTTGGTCA CCGTGTCCTCA (SEQ ID NO: 350)
--	---	---

[287] Отобранные антитела к TREM2, которые были выделены из гибридом в виде антител к IgG2 человека, были преобразованы в антитела IgG1 человека или агликозилированные варианты антител к IgG1 человека (мутации N297G, R292C, V302C согласно нумерации EU) путем переноса вариабельных областей антител на константные области IgG1 человека. Антитела типа IgG1 оценивали на агонистическую активность с использованием анализа на активацию AlphaLISA pSyk, описанного в примере 2. Удивительно, но преобразование таких отобранных антител изотипа IgG2 в изотип IgG1 привело к частичной потере агонистической активности (фигура 7).

[288] Сообщалось, что уникальное расположение дисульфидных связей в шарнирной области антител IgG2 придает усиленную стимулирующую активность для некоторых противоопухолевых антител (White et al, Cancer Cell, Vol. 27: 138–148, 2015). Такая повышенная активность может быть перенесена на антитела типа IgG1 путем замены области CH1 и шарнирной области антитела IgG1 на те, которые находятся в антителе IgG2 (White et al., 2015).

[289] Чтобы оценить, можно ли усиливать или сохранять агонистическую активность антител 24G6, 6E7 и 5E3 IgG2 к TREM2 при преобразовании в изотипы IgG1, были созданы конструкции, в которых последовательности вариабельной области тяжелой цепи от каждого из антител 24G6, 6E7 и 5E3 вставляли в рамку последовательности, кодирующей области CH1 и шарнирные области из антитела IgG2 человека и последовательности, кодирующие Fc-область (области CH2 и CH3) из агликозилированного антитела IgG1 человека. Fc-область агликозилированного IgG1-антитела человека содержала последовательность Fc-области IgG1z человека с мутациями N297G, R292C и V302C согласно нумерации EU (SEQ ID NO: 282).

[290] В дополнение к замене областей CH1 и шарнирных областей антител IgG1 участками антител IgG2, были сделаны точечные мутации в специфических остатках внутри шарнирных областей и областей CH1 для фиксации антител в конкретной конфигурации дисульфидной связи. Сообщалось, что дисульфидные связи в шарнирных областях и областях CH1 антител IgG2 можно перетасовывать для создания различных структурных дисульфидных изоформ (IgG2A, IgG2B и IgG2A–B), которые могут иметь разные уровни активности. См., например, Dillon et al., J. Biol. Chem., Vol. 283: 16206–16215; Martinez et al., Biochemistry, Vol. 47: 7496–7508, 2008 и White et al., Cancer Cell, Vol. 27: 138–148, 2015. Чтобы зафиксировать шарнир-модифицированные антитела IgG1 в дисульфидной конфигурации IgG2B, были сделаны два набора точечных мутаций: (1)

мутация C127S нумерация согласно Kabat (C131S нумерация согласно EU) в тяжелой цепи и (2) мутация C214S в легкой цепи в комбинации с мутацией C233S в тяжелой цепи, обе нумерация согласно Kabat (C214S и C220S нумерация согласно EU). См., например, WO 2009/036209, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Предполагают, что шарнир–модифицированные IgG2 версии IgG1 антител 6E7 и 5E3, содержащие дополнительные точечные мутации, как ожидалось, продемонстрируют эквивалентную или превосходящую агонистическую активность в анализе на активацию AlphaLISA pSyk в качестве исходных молекул IgG2.

Таблица 21. Аминокислотные последовательности легкой цепи и тяжелой цепи типичных антител

ID Ab		Последовательность
24G6 (SST28347)	LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKSSQSVLYSSNNKHFLAWYQQKPGQPPKLLIWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 334)
	HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAES VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAYTPMAFF DYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 335)
24G6 (SST204812)	LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKSSQSVLYSSNNKHFLAWYQQKPGQPPKLLIWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 334)
	HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEVQLLESGGGLVQPGGSLRL

ID Ab		Последовательность
		SCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAES VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAYTPMAFF DYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVDK TVERKCCVECPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 336)
6E7 (SST29857)	LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSVSASVGDRVTI TCRASQGISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGS GSGTDFTLT ISSLQPEDFATYFCQQADAFPRTFGQGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 337)
	HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDADARYSPS FQGQVTISADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYFCARQRTFYDSS DYFDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDK TVERKCCVECPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 338)
13E7 (SST202443)	LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEIVMTQSPATLSVSPGERATL SCRASQSVSSNLAWFQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGS GSGTEFTLT ISSLQPEDFAVYYCLQDNNFPPTFGQGTKVDIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV

ID Ab		Последовательность
		THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 339)
	HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDADARYSPS FQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYFCARRRQGI FGDA LDFWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 340)
5E3 (SST29825)	LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTYPFTFGQGTKVDIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 341)
	HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPYSGGTTS QKFQGRVTMTRDTSTSSAYMELSRLRSDDTAVYYCARDAGYL ALYGTDVWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPEL LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 342)

Таблица 22. Нуклеотидные последовательности легкой цепи и тяжелой цепи типичных антител

ID Ab	Последовательность
-------	--------------------

24G6 (SST28347)	LC	ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTGACATCGTGATGACCCA GTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCAC CATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAA CAATAAGCACTTCTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGAC AGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAGT CCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACA GATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTG GCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACTCCGCTCACTT TCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACGGTGGCT GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGC CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACG CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 351)
	HC	ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTGAGGTGCAGCTGTTGGA GTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCAT GAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGG TCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAG AATCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCA AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAGGCGTATACACCTATG GCATTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTC GTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA

		AGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGC CCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC TTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGTGCGAGGAGCAG TACGGCAGCACGTACCGTTGCGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT GTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAA A (SEQ ID NO: 352)
24G6 (SST204812)	LC	ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTGACATCGTGATGACCCA GTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCAC CATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAA CAATAAGCACTTCTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGAC AGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAGT CCGGGGTCCCTGACCGATT CAGTGGCAGCGGGTCTGGGACA GATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTG GCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACTCCGCTCACTT TCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACGGTGGCT GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGC CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACG CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA

	GCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 351) HC ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTGAGGTGCAGCTGTTGGA GTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCAT GAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGG TGTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAG AATCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCA AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAGGCGTATACACCTATG GCATTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTG TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCG CCCAGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTC GTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCC AGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT GGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACAC CTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCAACCGTGCC CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGTGCGAGGAGCAGTACGGCAGCA CGTACCGTTGCGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAA GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT CCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAA GCTCACCGTGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAAA (SEQ ID NO:
--	---

		353)
6E7 (SST29857)	LC	ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTGACATCCAGATGACCCA GTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGC CTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGA TCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCA GCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTTTTGTCAAC AGGCTGACGCTTTCCCTCGCACTTTTGGCCAGGGGACCAAGC TGGAGATCAAACGAACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTG TTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA CAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG T (SEQ ID NO: 354)
	HC	ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTGAGGTGCAGCTGGTGCA GTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGA TCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTTACCAGCTACTGGA TCGCCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGG ATGGGGATCATCTATCCTGGTGACGCTGATGCCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTACCATCTCAGCCGACAAGTCC ATCAGCACCGCCTACCTACAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTC GGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGACAAAGGACGTTTTA TTATGATAGTAGTGATTATTTTGACTIONTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTGTCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGT CTTCCCCCTGGCGCCCAGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCAC AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTTCGTGGAAGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC TGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCA

		CCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGA GTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGTGCGAGGA GCAGTACGGCAGCACGTACCGTTGCGTCAGCGTCCTCACCGT CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTGTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA CACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG CAA (SEQ ID NO: 355)
13E7 (SST202443)	LC	ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTGAAATAGTGATGACGCA GTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGC CTGGTTCCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT CTATGGTGCTTCCACCAGGGCCACTGGTATTCCAGCCAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAG CAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCTGCA GGATAATAATTTCCCTCCCCTTTTCGGCCAAGGGACCAAAGT GGATATCAAACGAACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGT TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT ACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGA GAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCC

		TGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 356)
	HC	ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTGAGGTGCAGCTGGTGCA GTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGA TCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGA TCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGG ATGGGGATCATCTATCCTGGAGATGCTGATGCCAGATACAGC CCGTCCTTCCAAGGCCAGGTACCATCTCAGCCGACAAGTCC ATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTC GGACACCGCCATGTATTTCTGTGCGAGGCGGAGACAGGGGA TCTTCGGTGATGCTCTTGATTTCTGGGGCCAAGGGACATTGG TCACCGTGTCTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA CACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC CACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCT CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGA CGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGTGC GAGGAGCAGTACGGCAGCACGTACCGTTGCGTCAGCGTCCT CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGG CTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA

		GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGCAAA (SEQ ID NO: 357)
5E3 (SST29825)	LC	ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTGACATCCAGATGACCCA GTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAGC CTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAATCCCTGA TCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCA GCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAAC AGTATAGTACTTACCCATTCACTTTTCGGCCAAGGGACCAAAG TGGATATCAAACGAACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTG TTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA CAGCCTCAGCAGCACCTTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG T (SEQ ID NO: 358)
	HC	ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTCAGGTGCAGCTGGTGCA GTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGG TGTCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATA TCCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGG ATGGGATGGATCAACCCTTACAGTGGTGGCACAACCTCTGCA CAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTC CACCAGCTCAGCCTACATGGAAGTGGAGGCTGAGATCTG ACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGCAGGCTAC CTGGCCCTCTACGGTACGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCTTG GTCACCGTGTCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC CCCCTGGCGCCCAGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGC GGCCCTGGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT GACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC

	TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCC AGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTG CCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGACCGTCAGT CTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGTGCGAGGAGCA GTACGGCAGCACGTACCGTTGCGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TGTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAG CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAA A (SEQ ID NO: 359)
--	--

Пример 8. Модулирование аффинности антител–агонистов к TREM2

[291] Для создания вариантов антител с повышенной или пониженной аффинностью к TREM2 человека модулировали аффинность моноклонального антитела–агониста 6E7 к TREM2 с использованием флуоресцентно–активируемой сортировки клеток (FACS) библиотек Fab с дрожжевым дисплеем. Применяли стратегию конструирования ненаправленной библиотеки, где мутагенез с насыщением NNK завершали для каждого аминокислотного остатка каждой CDR легкой и тяжелой цепей для получения точечных мутаций. Для каждой CDR получали отдельную библиотеку Fab. Шесть библиотек Fab с дрожжевым дисплеем отдельно сортировали и подвергали скринингу в отношении вариантов с улучшенным и уменьшенным связыванием с TREM2 человека с использованием FACS. Вторичные библиотеки, которые комбинировали мутации обогащения связыванием посредством CDR и шаффлинг цепей, также были сконструированы, отсортированы и подвергнуты скринингу. Данные скрининга с помощью проточной цитометрии для вариантов 6E7 показаны в таблице 19 ниже. Аминокислотные положения точечных мутаций в указанных областях переменных областей тяжелой и легкой цепей 6E7 пронумерованы относительно последовательности переменной области тяжелой цепи 6E7 (SEQ ID NO: 124) и последовательности

вариабельной области легкой цепи 6E7 (SEQ ID NO: 61). Двадцать два варианта были отобраны для дальнейшей оценки и определения характеристик. Полные последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей и ассоциированные CDR для выбранных вариантов, имеющих улучшенную аффинность связывания в отношении антитела 6E7, представлены в таблицах 2А и 2В, тогда как полные последовательности вариабельной области тяжелой цепи и легкой цепи и ассоциированные CDR для выбранных вариантов, имеющих пониженную аффинность связывания в отношении антитела 6E7, представлены в таблицах 3А и 3В.

Таблица 23. Варианты модуляции аффинности антител 6E7

ID варианта антитела	Замены в соответствии с последовательностью VH 6E7 (SEQ ID NO: 124)			Замены в соответствии с последовательностью VL 6E7 (SEQ ID NO: 61)			Сигнал связывания (кратность по сравнению с исходным антителом 6E7)			
	HC FR1– CDR1	HC CDR2	HC CDR3	LC CDR1	LC CDR2	LC CDR3	1 ^{-й} скрининг 110 нМ или 10 нМ ^a	2 ^{-й} скрининг 2 нМ	2 ^{-й} скрининг 10 нМ	2 ^{-й} скрининг 100 нМ
V1	Y32S		Q99S		Q55T	F94Y	1,68	1,29	1,92	
V2	Y27S	S56G	Q99S		L54R	S93R	2,55	2,23	2,90	
V3	T30A	G66D	Q99G		L54R	S93R	1,97	1,95	2,24	
V4	T30G	Y60V	Q99S		S53R	F94Y	6,00	5,88	5,51	
V5		I50T				F94H	2,73	1,25	2,84	
V6	Y32M						0,20*			0,56
V7	Y32E						0,11*			0,32
V8		R59K					0,28*			0,77
V9			T101G				0,67*			0,54
V10					A50S		0,76*			0,70
V11						D92A	0,79*			0,42
V12	S28E	T58V	Q99G		N56R		2,29	1,04	2,58	
V13	T30G	P62A	Q99G		N56G	F94M	1,31	1,15	1,35	
V14	T30G	S56Q	Q99G		S53R		4,71	2,57	4,64	
V15	T30A	I50T	Q99S		S53W	F94Y	5,23	4,72	4,78	
V16	F29M	S56G	Q99S		S53N		4,01	3,57	4,04	

V17	T30G		Q99S		L54R	F94S	5,37	4,22	5,51	
V18	W33H						0,17*			0,42
V19	Y32S						0,59*			0,48
V20		I50R					0,18*			0,52
V21			Y109F				0,76*			0,68
V22					A50R		0,30*			0,71
V23						R96L	0,40*			0,40
V24		T58V	Q99S		N56K	R96H	2,64	1,42	2,90	
V25	T30G	I50L	Q99S		Q55A	F94M	4,23	3,15	4,70	
V26	A35G	I50T	F102M, Y112A		N56R	F94Y	3,57	2,83	3,47	
V27		S61A	Q99S		N56R		5,50	5,67	5,69	
V28	T30Q	I50T	Y103F		N56S	F94L	3,08	2,63	3,61	
V29	T30K						1,53	0,84	1,67	
V30	Y27S						0,79*			0,72
V31		D57E					0,61*			0,73
V32		P62N					0,82*			0,89
V33			Y104G				0,23*			0,34
V34					N56D		0,34*			1,02
V35						D92Y	0,21*			0,29
V36	I34L		Q99S		L54R	F94Y	3,38	4,00	3,44	
V37	F29H	Q65A	Q99S		N56W	F94Y	3,46	3,69	3,49	
V38	T30G	T58V			L54R	F94H	4,34	3,44	4,36	
V39	T30G	S61N	Q99G		Q55V	F94S	6,15	5,11	5,81	
V40	T30G	T58V	F110S		N56L	S93R	4,48	3,41	4,16	
V41		I50T					1,74	0,58	1,72	
V42	Y32A						0,45*			0,41
V43		D57G					0,20*			0,33
V44		G54S					0,65*			0,52
V45				W32F			0,43*			0,53
V46					S53T		0,83*			0,96
V47						R96M	0,42*			0,47
V48	T30G	T58V	Q99M		N56T	F94L	2,42	2,30	2,54	
V49	T30N	I50T,	Q99S		L54R	F94Y	6,51	5,02	6,58	

		Y60L								
V50	T30G	I50V	F110L		L54R	F94L	4,10	3,39	4,16	
V51		T58V	Q99G, Y112N		L54R		2,81	1,83	3,18	
V52	T30E		Q99G		N56R	S93R	3,00	1,78	3,09	
V53		S63H					1,25	0,66	1,17	
V54	Y32Q						0,55*			0,54
V55		R59I, F64H					0,24*			0,66
V56		S61Q					0,23*			0,59
V57				R24A			0,84*			0,85
V58					A50K		0,28*			0,68
V59						Q89M	0,19*			0,60
V60	S28H	T58V	F110S		N56R	Q89G	3,26	3,35	3,63	
V61	T30S	S61N	Q99G		Q55V	F94L	5,08	3,63	5,22	
V62	T30G	S61A	D108G		N56R	Q89G	2,49	1,87	2,89	
V63	T30R		Q99S		N56R	S93R	3,76	4,91	3,71	
V64	T30Q		Q99G		Q55A	F94Y	5,41	4,88	5,48	
V65			Q99S				2,05	1,29	2,75	
V66	Y27T						0,25*			0,74
V67		I50M					0,80*			0,84
V68			Y103R				0,44*			0,43
V69				W32Y			0,41*			0,40
V70					S52G		0,79*			0,84
V71						F94E	0,37*			0,48
V72	A35G		Q99G		Q55V	F94Y	3,64	2,50	4,01	
V73	T30G	S63G	Q99G		L54R	F94Y	5,12	4,17	5,44	
V74	T30A	T58V	Q99G		N56L		3,94	2,54	4,01	
V75			Q99G		N56A	F94Y	4,64	3,74	4,52	
V76	T30G	S63E	F110S		N56K		4,57	4,34	4,93	
V77					L54R		1,43	0,83	1,38	
V78	S28R						0,86*			1,11
V79		R59N					0,70*			0,52
V80			T101N				0,59*			0,50

V81				W32L			0,17*			0,23
V82					A51G		0,30*			0,79
V83						D92V	0,20*			0,29
V84	S28G		F110S		A50G		1,44	1,45	1,62	
V85	T30R	I50T	Q99S		L54R		5,41	5,41	5,37	
V86	T30G, I34L	Q65E	Q99S		L54R		4,80	5,17	5,02	
V87	T30R	T58V, S63D	Q99S		N56W		3,84	4,86	3,93	
V88	T30G				S53R, N56R	F94S	4,92	5,57	5,30	
V89						F94H	1,33	0,94	1,46	
V90	Y32E			S31R			0,33*			0,36
V91		G54D					0,25*			0,61
V92			Y103H				0,22*			0,65
V93				S31G			0,35*			1,05
V94					S52A		0,31*			0,87

^aЗначения сигнала связывания, отмеченные *, получали при концентрации Ab 110 нМ, тогда как остальные значения в колонке получали при концентрации Ab 10 нМ.

Пример 9. Восстановление дефекта выживаемости макрофагов и клеток микроглии с помощью антитела–агониста к TREM2

[292] Вариант R47H TREM2 человека ассоциирован с повышенным риском позднего начала болезни Альцгеймера (Jonsson et al., New England Journal of Medicine, Vol. 368: 107–116, 2013). Для специфического нацеливания на ген Trem2 без нарушения дополнительных регуляторных элементов для получения мышей Trem2^{-/-} или Trem2^{R47H} использовали подход, основанный на редактировании генов. Штамм Trem2^{-/-} получали путем конструирования делеции 5bp или 11bp в экзоне 1 гена Trem2, и штамм Trem2^{R47H} получали путем конструирования точечной мутации в остатке 47 в гене Trem2 мыши, аналогично человеческому варианту. Подробный анализ qPCR гомогенатов мозга из Trem2^{-/-} и Trem2^{R47H} мышей подтвердил потерю гена в нокаутах и экспрессию Trem2, сравнимую с контрольной группой дикого типа, подобранной по возрасту, для мышей Trem^{R47H} (данные не показаны). Не наблюдали каких-либо существенных различий в других генах TREM в локусе (Trem1, TremL1 и TremL2) при базальных или LPS-стимулированных условиях у мышей дикого типа, Trem2^{-/-} или Trem2^{R47H} (данные не показаны).

[293] Чтобы понять эффект от изменений TREM2 в отношении миелоидных клеток, свойства макрофагов, происходящих из костного мозга (BMDM) TREM2^{-/-}, а

также микроглии взрослых и новорожденных сравнивали с макрофагами дикого типа и микроглией в ограничивающих условиях CSF-1. В соответствии с недавними исследованиями TREM2^{-/-} микроглии и макрофагов, которые характеризуются дефицитом выживаемости при низких уровнях CSF-1 (Wang et al., Cell, Vol. 160: 1061–1071, 2015; Wu et al., Journal of Experimental Medicine, Vol. 212: 681–697, 2015), также наблюдали снижение выживаемости BMDM и клеток микроглии, выделенных из мышей TREM2^{-/-}, с подтверждением тем самым того, что они демонстрируют TREM2-зависимое поведение, о котором сообщалось в других моделях TREM2^{-/-} (фигуры 8A–8C). С целью определить, влияет ли мутация R47H также на способность миелоидных клеток выживать в условиях стимуляция антигеном, аналогичные исследования проводили на BMDM TREM2^{R47H} и клетках микроглии. Интересно, что BMDM и клетки микроглии с TREM2^{R47H} также демонстрировали худшую выживаемость в сходных условиях культивирования, очень похожих как в случае BMDM и клеток микроглии с TREM2^{-/-} (фигуры 8D–8F). Однако дефекты выживаемости BMDM и клеток микроглии с TREM2^{R47H} были менее выраженными, чем дефекты выживаемости BMDM и клеток микроглии с TREM2^{-/-}. Также наблюдались дозозависимые эффекты гена в отношении выживаемости миелоидных клеток как с TREM2^{R47H}, так и с TREM2^{-/-}, причем эти эффекты были гораздо более выраженными в нокаутных клетках по сравнению с вариантами клеток (данные не показаны). Хотя макрофаги с фенотипом TREM2^{R47H} следуют той же тенденции, что и макрофаги с TREM2^{-/-}, фенотип нельзя объяснить просто снижением экспрессии R47H TREM2 на клеточной поверхности, поскольку BMDM дикого типа и TREM2^{R47H}, по-видимому, имеют сопоставимые уровни поверхностной экспрессии TREM2 (данные не показаны). В целом, результаты этих экспериментов подтверждают утрату функции для варианта R47H, который имитирует потерю белка TREM2, хотя и с фенотипом, который менее выражен по сравнению нокаутным геном.

[294] Затем активацию TREM2 оценивали в BMDM с TREM2^{R47H}. Коммерчески доступное антитело крысы/мыши к TREM2 человека (mAb17291; крысы IgG2b клон № 237920, R&D Systems) повышало уровни pSyk как в BMDM R47H, так и в BMDM дикого типа, при этом эффект был более выраженным у BMDM дикого типа (фигура 9A). Антитела не оказывали эффекта в отношении макрофагов TREM2^{-/-}, поддерживающих специфическую активацию TREM2 (фигура 9B). С целью определить, может ли активация TREM2/DAP12-опосредованной передачи сигналов Syk в макрофагах улучшить или ослабить более нижерасположенные биологические фенотипы, в том числе снижение выживаемости, BMDM с TREM2^{R47H} обрабатывали антителом-агонистом к TREM2 (антитело mAb17291) или изотипическим контролем и контролировали слияние клеток с применением Incucyte Xoom Imaging System. Поразительно, что восстановление выживаемости клеток BMDM с TREM2^{R47H} наблюдали, в случае если макрофаги обрабатывали антителом-агонистом к TREM2 с почти полным восстановлением до уровней дикого типа (фигуры 10A–10C). Значительное стимулирование выживаемости клеток наблюдалось как в режиме реального времени с периодическими визуализациями

(фигуры 10A и 10B), так и в анализах конечной жизнеспособности клеток (накопление АТФ) (фигура 10C). Эквивалентное восстановление выживаемости клеток не наблюдалось, в случае если BMDM обрабатывали антителами изотипического контроля (фигуры 10A–10C). Не наблюдалось повышения выживаемости гомозиготных нокаутированных по TREM2 макрофагов, что подтверждает специфический эффект активации TREM2 антителом (данные не представлены). Подобное восстановление выживаемости клеток наблюдалось для клеток микроглии взрослого TREM2^{R47H} при обработке тем же антителом–агонистом к TREM2, тогда как эквивалентное восстановление выживаемости клеток не наблюдалось, в случае если клетки микроглии обрабатывали изотипическим контрольным антителом (фигура 10D).

[295] Кроме того, антитело–агонист TREM2 (антитело 2), которое активировало передачу сигналов Syk, но не конкурировало с коммерческим антителом, стимулировало выживаемость макрофагов, собранных у пожилых (18–месячных) животных дикого типа и животных R47H (фигуры 10E и 10F), тогда как эквивалентного восстановления выживаемости клеток не наблюдали, в случае если клетки микроглии обрабатывали изотипическим контрольным антителом (фигуры 10E и 10F).

[296] С целью оценить эффект обработки антителом–агонистом к TREM2 в отношении миграции дикого типа, в анализе миграции оценивали TREM2–нокаутные и миелоидные клетки с TREM2^{R47H}, макрофаги, полученные из костного мозга, выделенные из мышей каждого из различных генотипов. В день 5 BMDM из мышей TREM2^{+/+}, TREM2^{R47H} и TREM2^{-/-} собирали и высевали в 96–луночные планшеты для анализа миграции Radius™ (Cell Biolabs) в полной среде RPMI, дополненной 50 нг/мл M-CSF. Клетки обрабатывали антителом–агонистом к TREM2 (антитело 1 или антитело 2), изотипическим контрольным антителом или носителем в течение 24 часов. Клетки промывали на следующий день, следуя протоколу производителя, для удаления слоя биосовместимого геля и выставления свободного от клеток участка для миграции. Среду заменяли свежей питательной средой, дополненной 50 нг/мл M-CSF и антителом–агонистом к TREM2, изотипическим контрольным антителом или контрольным носителем, как описано выше. Слияние клеток контролировали с применением Incucyte Zoom Imaging System и данные наносили на график как процент слияния. Интересно, что обработка антителом 1 приводила к небольшому, но статистически значимому снижению пролиферации/миграции макрофагов TREM2^{R47H} (фигура 11B) с минимальным воздействием на макрофаги дикого типа (TREM2^{+/+}) (фигура 11A) и не влияло на макрофаги у нокаутных мышей (TREM2^{-/-}) (фигура 11C). Обработка антителом 2 не оказала эффекта на миграцию ни в макрофагах дикого типа (TREM2^{+/+}), ни в макрофагах TREM2^{R47H} (фигуры 11D и 11E).

[297] На молекулярном уровне это уменьшение миграции макрофагов было отражено путем снижения клеточной поверхности FLT1 в макрофагах TREM2^{R47H} и макрофагах дикого типа при обработке антителом–агонистом к TREM2 (как при обработке липополисахаридом, так и без нее), тогда как не наблюдали существенных

различий в отношении других хемокинов/хемокиновых рецепторов (например, CCR5) в моменты времени, выбранные для исследования (данные не показаны). Последовательная корреляция между миграцией и FLT1 как в разных генотипах, так и в случае фармакологических манипуляций с антителом говорит о важной новой связи между TREM2 и FLT1, которая потребует дальнейшего изучения. Не менее интересным является наблюдение того, что антитело, которое активирует передачу сигналов TREM2/DAP12 в проксимальном направлении, может оказывать противоположный эффект в отношении выживаемости и миграции; разные антитела (в зависимости от того, где они связываются и как они взаимодействуют с эндогенными лигандами) вероятно будут иметь разные профили проксимальной и дистальной активности.

[298] Результаты этих экспериментов демонстрируют, что антитело, которое может активировать передачу сигналов TREM2/DAP12, может восстановить дефект жизнеспособности макрофагов и клеток микроглии в результате мутации с утратой функции в TREM2. Результаты показывают, что антитело–агонист, которое может активировать TREM2 и стимулировать активность макрофагов/клеток микроглии, может являться терапевтическим при заболевании Альцгеймера и других состояниях, связанных с утратой функции TREM2.

Пример 10. Генная регуляция с помощью антитела–агониста к TREM2 в макрофагах

[299] С целью понять основу фенотипических изменений макрофагов, полученных из мышей TREM2^{-/-} и TREM2^{R47H}, описанных в примере 9 на уровне транскриптома, были проведены анализы RNA–Seq на сравнение макрофагов дикого типа, TREM2^{-/-} и TREM2^{R47H} на день 7 в ограничивающих условиях CSF–1. В день 7 BMDM собирали и выделяли общую РНК с применением Rneasy Mini Kit (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя.

[300] 1–2 мкг общей РНК, очищенной из макрофагов *ex vivo*, полученных из костного мозга, применяли для получения библиотеки кДНК с применением модифицированного протокола, основанного на Illumina Truseq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, Сан–Диего, Калифорния, США) и опубликованных способах для специфического в отношении цепи RNA–Seq (Perkins, T. T. et al., PLoS genetics, Vol. 5: e1000569, 2009; Parkhomchuk, D. et al. Nucleic acids research, Vol. 37: e123, 2009). После отбора поли–А, фрагментации и праймирования осуществляли обратную транскрипцию для синтеза кДНК первой цепи в присутствии RNaseOut (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) и актиномина–D (MP Biomedicals, Санта–Ана, Калифорния). Синтезированную кДНК дополнительно очищали с использованием гранул AMPure RNAClean (Beckman Coulter, Пасадина, Калифорния, США) в соответствии с коммерческой инструкцией. Для синтеза второй цепи обеспечивали и применяли модифицированный способ путем включения dUTP вместо dTTP (Perkins et al., PLoS genetics, Vol. 5, e1000569, 2009; Parkhomchuk et al., Nucleic Acids Research, Vol. 37, e123, 2009). После очистки с помощью гранул AMPure XP (Beckman Coulter) в соответствии со

стандартным протоколом, рекомендованным Illumina, последовательно выполняли восстановление концов, присоединение А-хвоста и лигирование посредством пронумерованных адаптеров для создания библиотек кДНК. После отбора по размеру библиотек с использованием Pippin Prep (SAGE Biosciences, Беверли, Массачусетс, США), цепи кДНК, содержащие dUTP, разрушали посредством расщепления ферментами USER (New England Biolabs, Ипсуич, Массачусетс, США) с последующей стадией обогащения с помощью ПЦР для введения специфичности цепи. После очистки обогащенные библиотеки кДНК анализировали в Agilent Bioanalyser и количественно определяли с помощью анализов Quant-iTTM Pico-Green (Life Technologies) перед секвенированием на платформе Illumina HiSeq. Каждая библиотека давала по крайней мере 35 миллионов ридов со спаренными концами из 75 п. о. для последующего анализа.

[301] Показания секвенирования RNA-seq были выровнены с использованием выравнивателя OSA (Hu et al., Bioinformatics, Vol. 28: 1933–1934, 2012) встроенного в конвейер Omicsoft ArrayStudio (Omicsoft Inc., США). При выравнивании и количественном определении использовали версию генома GRCm38 мыши и аннотацию гена UCSC. Количественное определение выполняли до уровня гена и транскрипта на основе RSEM (Li et al., BMC Bioinformatics, Vol. 12: 323, 2011). Нормализованный уровень экспрессии гена рассчитывали по фрагментам на тысячу пар оснований на миллион ридов (FPKM), затем квантиль нормализовали при 70 процентиле к 10 (FPKQ). В следующем статистическом анализе использовали только гены с по меньшей мере одним образцом, экспрессированные при $FPKQ \geq 1$. Число необработанных ридов для выбранных генов сравнивали с использованием пакета R Bioconductor DESeq2 после отрицательного биномиального распределения (Love et al., Genome Biology, Vol. 15: 550, 2014). Гены с BH-скорректированным значением $p < 0,05$ и кратным изменением $\geq 1,5$ или $\leq 2/3$ выбрали как существенно дифференциально экспрессируемые гены. Анализ пути выполняли с использованием Ingenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN Redwood City, США).

[302] В соответствии с градацией выраженности фенотипов, наблюдаемых у макрофагов TREM2^{-/-}, TREM2^{R47H} и макрофагов дикого типа, аналогичные тенденции наблюдали в дифференциально регулируемых транскриптах, причем наибольшая величина эффекта наблюдалась в макрофагах TREM2^{-/-} и макрофагах TREM2^{R47H}, попадающих между макрофагами дикого типа и макрофагами TREM2^{-/-}. Такую дифференциальную регуляцию подтвердили для подмножества генов в независимом эксперименте с помощью qPCR (фигуры 12A–12D). Анализы пути указывают на роль TREM2 в клеточном цикле, выживаемости клеток, пролиферации и миграции клеток с предполагаемым перекрестным взаимодействием между путем комплемента, липидным гомеостазом и хемокинами/рецепторами и факторами миграции (данные не показаны).

[303] Различия в регуляции транскрипта с течением времени подтверждали с помощью qPCR для нескольких генов, включая некоторые известные генетические факторы, связанные с болезнью Альцгеймера, такие как ApoE (фигуры 13A и 13B),

провоспалительные цитокины, такие как $\text{IL-1}\alpha$ (фигуры 13C и 13D), и множество хемокинов/хемокиновых рецепторов, в том числе Cx3cr1 (фигуры 13E и 13F), Ccl5 (фигуры 13K и 13L), Ccl22 (фигуры 13M и 13N), Ccr5 , Ccr2 и Ccl3 , а также комплементарные гены, в том числе C1qa (фигуры 13I и 13J) и C3 (фигуры 13O и 13P). В каждом случае эффект был значительно более выражен в макрофагах $\text{TREM2}^{-/-}$ по сравнению с макрофагами $\text{TREM2}^{\text{R47H}}$. Впервые была отмечена связь между TREM2 и проангиогенным рецептором Vegfr1 (Flt1) с уменьшением Flt1 в макрофагах $\text{TREM2}^{-/-}$ и $\text{TREM2}^{\text{R47H}}$ (фигуры 13G и 13H). Кроме того, наблюдали увеличение VEGF-a как в макрофагах $\text{TREM2}^{-/-}$, так и в $\text{TREM2}^{\text{R47H}}$, что согласуется с отсутствием рецептора, доступного для связывания (данные не показаны). Уменьшение множества факторов миграции приводит к снижению миграции/подвижности макрофагов $\text{TREM2}^{-/-}$ и $\text{TREM2}^{\text{R47H}}$ (фигуры 14A и 14B). В недавних исследованиях сообщается о снижении количества/миграции клеток микроглии в областях, окружающих бляшки и апоптотические клетки при нокаутах TREM2 (Mazaheri et al., EMBO reports, e201743922, 2017; Wang et al., Cell, Vol. 160: 1061–1071, 2015).

[304] В соответствии с данными посл. РНК, также наблюдали снижение уровня хемокина MCP-1/CCL2 , секретируемого макрофагами $\text{TREM2}^{-/-}$ и $\text{TREM2}^{\text{R47H}}$ (фигура 15A). Снижение секреции MCP-1/CCL2 макрофагами $\text{TREM2}^{\text{R47H}}$ в условиях стимуляции антигеном может быть восстановлено путем обработки антителом–агонистом к TREM2 (антитело mAb17291) (фигура 15B). Заслуживает внимания способность антитела–агониста к TREM2 стимулировать MCP-1/CCL2 наряду с улучшением выживаемости миелоидных клеток (пример 9), что указывает на общее улучшение различных аспектов функционирования миелоидных клеток при лечении с помощью антител–агонистов. Кроме того, в случае если макрофаги $\text{TREM2}^{\text{R47H}}$ обрабатывали абета–олигомерами, – наблюдалось увеличение MCP-1/CCL2 , которое дополнительно усиливалось после обработки антителом–агонистом к TREM2 (данные не показаны).

[305] Обработка антителами–агонистами к TREM2 макрофагов $\text{TREM2}^{\text{R47H}}$ также модулировала экспрессию генов в направлении, противоположном действию генотипа, и включала гены, участвующие в регуляции миграции, пролиферации, клеточного цикла и выживаемости миелоидных клеток (фигуры 16A и 16B). Анализы пути дифференциально регулируемых генов обнаруживают предполагаемую роль TREM2 в модулировании различных аспектов биологии миелоидных клеток в условиях стимуляции антигеном, включая репликацию ДНК, регуляцию клеточного цикла, пролиферацию, гибель клеток и модуляцию хемокинов/цитокинов. В контексте этиологии болезни Альцгеймера эти данные в отношении трансгенов подтверждают гипотезу о том, что дефицит TREM2 , либо в форме варианта потери функции, либо в виде пониженной экспрессии на поверхности клетки способствует фундаментальному дефициту пролиферации/выживаемости, что приводит к последующей неспособности эффективно функционировать в отношении фагоцитоза бляшек/апоптотических клеток, модуляции цитокинов или потенциально новой барьерной функции. Кроме того, прямое воздействие на снижение секреции

мигрирующих хемокинов, таких как CCL2 и CCR2, также вероятно снижает способность макрофагов/клеток микроглии эффективно мигрировать в апоптотические клетки и бляшки и может также способствовать увеличению бляшек на ранних стадиях заболевания. Способность антитела, которое стимулирует проксимальную передачу сигналов, также восстанавливать дефект жизнеспособности и восстанавливать уровни хемокинов, изящно демонстрирует корреляцию между проксимальным функционированием и более дистальной биологией и полностью поддерживает стратегию терапевтических антител, с помощью которой можно существенно стимулировать активность макрофагов/клеток микроглии и оказывать благоприятный эффект в ходе заболевания.

Пример 11. Эффективность антитела–агониста к TREM2 в EAE–модели рассеянного склероза

[306] Эффективность антител–агонистов к TREM2, описанных в данном документе, для ослабления симптомов и/или прогрессирования заболевания рассеянным склерозом оценивают на модели рассеянного склероза при экспериментальном аутоиммунном энцефалите (EAE). EAE индуцируется у животных посредством миелинового олигодендроцитарного гликопротеина (MOG) и токсина коклюша, как описано ранее в Feinstein et al., Ann. Neurol., Vol. 51: 694–702, 2002. Вкратце, группам самок с TREM2 дикого типа в возрасте 7–9 недель (штамм C57BL/6), мышам с TREM2^{−/−} и TREM2^{R47H} подкожно вводили 100 мкг пептида MOG 35–55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (SEQ ID NO: 283)), эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда, содержащем 4 мг/мл H37RA *Mycobacterium tuberculosis*. Токсин коклюша вводили внутрибрюшинно в дозе 200 нг/мышь в 200 мкл физиологического раствора в день 0 и день 2. Антитела к TREM2 (30 мг/кг и 100 мг/кг) дозировали в дни 0, 7 и 14 для определения эффекта лечения с помощью антител в разные моменты времени в отношении прогрессирования заболевания. Множественные конечные точки оценки цитокинов и воспаления, в том числе уровни растворимых TREM2, MCP-1/2, MIP1a и b, CCL2, CCR2 и дополнительных хемокинов/цитокинов, измеряли на периферии, CNS и CSF для оценки эффекта антител в отношении TREM2. Кроме того, у животных оценивали неврологические нарушения по клинической шкале следующим образом: 0 – отсутствие клинических признаков EAE; 1 – мягкий хвост; 2 – вялый хвост и неправильная походка (атаксия и/или парез задних конечностей); 3 – тяжелый парез задних конечностей; 4 – полный паралич задних конечностей и 5 – агональное состояние или смерть.

Пример 12. Эффективность антитела–агониста к TREM2 в животных моделях перитонита и сепсиса

[307] Эффект антител–агонистов к TREM2, описанных в данном документе, при модулировании острого воспалительного ответа оценивали на животных моделях перитонита и сепсиса. Зимозан, компонент полисахаридной клеточной стенки, полученный из *Saccharomyces cerevisiae*, может быть введен в брюшную полость

животных для выработки воспалительного ответа, связанного с перитонитом (см. Cash et al., *Methods in Enzymology*, Vol. 461: 379–396, 2009). Зимозан (1 мг/кг) вводили внутрибрюшинно одновременно или через 24 часа после введения антител к TREM2 (20 мг/кг), изотипического контрольного антитела или носителя. Плазму, CSF, CNS и жидкость для перитонеального лаважа и макрофаги собирали через 4 и 24 часа после обработки. Множественные конечные точки уровней цитокинов и воспаления, включая количественную оценку различных типов миелоидных клеток, а также уровни растворимых TREM2, MCP-1/2, MIP1a и b, CCL2, CCR2 и дополнительных хемокинов/цитокинов измеряли на периферии, в CNS и CSF для оценки эффекта антител к TREM2 в отношении воспалительного ответа.

[308] В отдельной серии экспериментов эффект антител–агонистов к TREM2 оценивали на модели сепсиса, вызванного грамотрицательными бактериями, с липополисахаридом (LPS). Вводили внутрибрюшинно LPS (1 мг/кг) через 24 часа после введения антител к TREM2 (20 мг/кг), изотипического контрольного антитела или носителя. Образцы плазмы, CSF и CNS собирали через 4 и 24 часа после обработки. Множественные конечные точки уровней цитокинов и воспаления, включая количественную оценку различных типов миелоидных клеток, а также уровни растворимых TREM2, MCP-1/2, MIP1a и b, CCL2, CCR2 и дополнительных хемокинов/цитокинов измеряли на периферии, в CNS и CSF для оценки эффекта антител к TREM2 в отношении воспалительного ответа.

Пример 13. Эпитопное картирование антител к TREM2

Способ иммуноблоттинга для эпитопного картирования антител к TREM2

[309] Разработали пептиды PepSpot (JPT Peptide Technologies) к растворимому Trem2 человека для охвата всего внеклеточного домена (начиная с гистидина 21), с получением 74 × 10–мерных линейных пептидов, включая 6 дополнительных контрольных пептидов, в общей сложности 80 PepSpot на целлюлозную мембрану. Пептидные 10–мерные последовательности отбирали с помощью "прогулки" по белку по 2 аминокислотам, что приводило к перекрытию 8 аминокислот. Мембраны промывали 40 мл 100% метанола при комнатной температуре в течение 10 минут при осторожном встряхивании, а затем сразу 3 раза по 40 мл TBST (TBS+0,05% Tween 20) в течение 10 минут каждая. Мембраны блокировали неразбавленным блокирующим буфером LICOR (Odyssey® Blocking Buffer 927–40000) в течение ночи при комнатной температуре при осторожном встряхивании и инкубировали с 1 мкг/мл 24G6 (PL–52705, дата лота 2.24.2017, [hu anti– <huTrem2> 21–191_24G6 VK4 (1–242) VL]::huKLC–CL + [hu anti– <huTrem2> 21–191_24G6 VH3 (1–471) VH]::huIgG1zSEFL2–2 (моноклональное антитело), iPS:536553, SS–28346) в течение ночи при 4°C при осторожном встряхивании в блокирующем буфере Licor, содержащем 1% Tween 20. На следующий день блоты промывали 4X буфером TBST (Трис–буферный солевой раствор+0,05% Tween 20) в течение 15 минут каждый и зондировали вторичным антителом (Licor кат. № 925–32232 IRDye® 800CW, антитело козы к Ig человека, лот № C70419–05) при разбавлении 1:20000

в блокирующем буфере Licor с 1% Tween 20 и 0,1% SDS. Блоты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при осторожном встряхивании, защищали от светового излучения, затем еще 4 раза промывали с помощью TBST и высушивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Вестерн-блот сканировали на 800 канале с применением инфракрасного флуоресцентного томографа Licor Odyssey.

Способ MSD для этитонного картирования антител к TREM2

[310] Пептиды (последовательности сконструированные, как описано ранее) были синтезированы с биотином на N-конце (Sigma) с растворимым Trem2 человека и нормализованы до 20 мг/мл в 100% DMSO. Многолуночные планшеты MSD GOLD с 96-лунками небольшого размера со стрептавидином (MSD GOLD 96-Well Small Spot Streptavidin SECTOR) (MSD № L45SA) покрывали биотинилированными пептидами в концентрации 5 мкг/мл в 2X PBS (–ca/–mg), pH 7,8–7,9, в общем объеме 50 мкл на лунку и обеспечивали инкубацию при комнатной температуре в течение 2 часов при осторожном встряхивании. Планшеты промывали 3X буфером TBST (Трис-буферный солевой раствор+0,05% Tween–20, pH 7,2), 150 мкл на лунку, с применением автоматического устройства для мойки планшетов. Моноклональное антитело 24G6.1 (PL–51585, лот № 12/9/2016, hu anti–<huTrem2> IgG2) метили с помощью метки MSD sulfo–tag согласно SOP производителя для использования в качестве реагента для выявления и добавляли при 1 мкг/мл в MSD Diluent 100 (№ R50AA–3) в общем объеме 25 мкл на лунку. Планшеты оставляли для инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре с осторожным встряхиванием, затем промывали 3X буфером TBST (Трис-буферный солевой раствор+0,05% Tween–20, pH 7,2), 150 мкл на лунку с применением автоматического устройства для мойки планшетов, переворачивали и промывали еще 3 раза. Исходный раствор MSD Read Buffer T+поверхностно–активное вещество 4x (№ R92TC–3) получали путем разбавления до 1X H₂O и добавлением до 150 мкл общего объема на лунку. Планшеты считывали сразу с помощью ридера MSD Sector 6000.

Результаты

[311] Было обнаружено, что антитело 24G6 связывалось со следующими пептидами (HRDAGDLWFP (SEQ ID NO: 360), AGDLWFPGGE (SEQ ID NO: 361) и GDLWFPGGESE (SEQ ID NO: 362)). Было обнаружено, что антитело 24G6 связывалось со следующим пептидом (HRDAGDLWFP (SEQ ID NO: 363)) в TREM2. Аланиновое сканирование немного более длинного пептида PLDHRDAGDLWFPGGESE (SEQ ID NO: 364) также осуществляли для идентификации ключевых сайтов контакта. Было обнаружено, что 24G6 практически не связывался с двумя пептидами при аланиновом сканировании (PLDHRDAGDAWPFGESE (SEQ ID NO: 365); PLDHRDAGDLWAPGESE (SEQ ID NO: 366) (подчеркнутые аминокислоты)), что указывает на то, что эти контакты были ключевыми для распознавания этого пептида. Выполнение данной задачи помогло определить минимальный пептид для распознавания TREM2 человека этим антителом как GDLWFP (SEQ ID NO: 367). Это антитело также продемонстрировало более низкую аффинность к TREM2 макака–крабоведа. Аналогичные данные наблюдали для пептидов,

содержащих соответствующую последовательность TREM2 макака–крабоеда. Для других антител к TREM2 (6E7, 5E3 и 13E7) не было идентифицировано каких-либо специфических пептидов, которые были бы полезны при определении пептидного эпитопа с применением описанного способа.

Пример 14. Периферическая модуляция антител–агонистов к TREM2 на клетках микроглии

[312] Чтобы понять эффект фармакологического лечения на полный транскриптом, были проведены исследования sc RNA–Seq на резидентных клетках Cd11b+CNS, выделенных из мышей с TREM2 WT и R47H, которым дозировали не обладающую эффекторной функцией версию одного из исследуемых антител–агонистов к TREM2. Самцов мышей B6 с TREM2^{+/+}, TREM2^{-/-} и TREM2^{R47H} (в возрасте 60–67 дней) использовали для исследований RNA–seq одной клетки. Обработку антителом с помощью либо стабильно не проявляющего эффекторной функции антитела к TREM2 мыши (SEFL), либо изотипического контрольного антитела к Her человека осуществляли внутривенно в дозе 30 мг/кг при 5 мл/кг. В модели острого воспаления обработанным антителами животным внутрибрюшинно вводили LPS (<источник>) через 16 часов после обработки антителом в дозе 5 мг/кг при 5 мл/кг и стимулировали с помощью LPS в течение 4 часов. Подобранным по генотипу, возрасту, полу однопаметным животным одновременно дозировали изотипическим контрольным антителом.

[313] Образцы мозга собирали у обработанных мышей после асфиксии посредством CO₂, и ткани диссоциировали с применением набора для диссоциации мозга Miltenyi для взрослых мышей и крыс (Miltenyi Biotec 130–107–677) в соответствии со стандартными протоколами производителя. Клетки CD11b⁺ положительно обогащали с применением микрогранул (Miltenyi Biotec 130–049–601), дважды промывали в свежеполученном охлажденном до температуры льда PBS+0,04% BSA и ресуспендировали в свежеполученном PBS+0,04% BSA при 500–1000 клеток/мкл при жизнеспособности > 70%. Образцы мозга собирали и клетки микроглии выделяли с применением ранее описанного набора для выделения Cd11b от Miltenyi. Библиотеки NGS получали, как описано в соответствии с рекомендациями 10x Chromium от производителей. Обратную транскрипцию, общую амплификацию кДНК и конструирование библиотеки проводили в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование РНК одиночной клетки проводили с применением Chromium Single Cell 3' Kit с V2 Chemistry (10x Genomics). Обогащенные CD11b⁺ клетки загружали и инкапсулировали в Chipium Single Cell Chip A (10x Genomics) для достижения восстановления клеток 5000 клеток на образец. Была достигнута глубина считывания секвенирования > 2х по исследованию Keren–Shaul et al., с приблизительно 2095 генами, идентифицированными на клетку, и xUMIs на клетку. Применяли способ нелинейного снижения размерности и визуализации многомерных переменных (t–SNE) для визуализации профилей экспрессии гена в одной клетке, и клетки группировали по типам клеток с применением кластеризации dbscan.

[314] Всего было идентифицировано одиннадцать различных популяций. Наиболее доминантный кластер клеток, как и ожидалось, представлял собой микроглию, что определяли с помощью генной сигнатуры *Trem2*⁺, *Tmem119*⁺, *P2ry12*⁺, *Hexb*⁺, *Lyz2*[–], причем микроглиальные клетки составляли 60% от общего числа проанализированных клеток во всех группах лечения и генотипах. Также были идентифицированы незначительные остаточные популяции эндотелиальных клеток, астроцитов, NK–клеток и олигодендроцитов, которые сохранялись после магнитного обогащения. Доминирующие кластеры микроглии четко разделены на две группы на основе лечения LPS – более гомеостатический кластер микроглии и активированный кластер микроглии. В активированном LPS состоянии наблюдались более тонкие эффекты различий генотипа (WT по сравнению с R47H) и эффекта лечения посредством антител в группах WT и R47H. Эти закономерности сохранялись даже при рассмотрении только микроглиальных кластеров. Также были отмечены дополнительные более мелкие кластеры миелоидных клеток, которые характеризовались признаками гена микроглии, а также классические маркеры инфильтрата.

[315] Тщательный анализ обработки посредством антител на микроглиальных кластерах показал, что обработка с помощью антител имела несколько различных биологических эффектов. Во–первых, обработка с помощью антител повышала уровень гомеостатических генов, в том числе *Cx3cr1*, *Tmem119*, *Ctsd* и *P2ry12*, как в микроглии WT, так и в R47H, только в микроглии WT и только в микроглии R47H (фигуры 17 A, B и C). Во–вторых, обработка с помощью антител снижала уровни транскриптов провоспалительных хемокинов и цитокинов, в том числе *Il1a*, *Il1b*, *Il27*, *Il12b*, *Ccr7*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4* и *Ccl5* (фигуры 17 D, E и F). В–третьих, путем обработки с помощью антител модулировали несколько генов, участвующих в передаче сигналов Syk, в том числе нескольких DUSP (фосфатаз, которые регулируют Src–киназы) и генов в пути передачи сигналов MAPK. Наблюдали совсем не много различий между клетками микроглии WT и R47H, выделенными от нормальных, не подвергнутых провокации мышей 7–недельного возраста.

[316] Изучая различия между клетками микроглии WT и R47H в состоянии покоя, а также определяя эффекты обработки с помощью антител, авторы настоящего изобретения отметили, что у животных, обработанных с помощью LPS/антител, приблизительно 15% клеток, которые были подвергнуты кластеризации с более традиционными группами клеток микроглии, давали отличающуюся генную сигнатуру с более частым представлением генотипа R47H. Тщательный анализ показал, что эти клетки сначала подвергались кластеризации с большей группой клеток микроглии, поскольку они были *Trem2*⁺, *Tmem119*⁺, *Cx3cr1*⁺ и *Hexb*⁺, классическими маркерами, используемыми для определения гомеостатической микроглии. Тем не менее, эти клетки были также обогащены такими генами, как *S100a8*, *Lcn2*, *S100a9*, *Camp*, *Hp*, *Cxcr2* и *Il1r2* в популяциях WT и R47H по сравнению с более крупным, более классическим кластером клеток микроглии. В случае если авторы изобретения проводили анализы пути топовых

генов, которые были преимущественно экспрессированы в данном кластере, обнаружилось, что эти хиты были связаны с функцией моноцитов и нейтрофилов (фигуры 18 А и В). Эта группа клеток инфильтрата/микроглии также отвечала на лечение с помощью антител путем подавления провоспалительных хемокинов и цитокинов как у мышей WT, так и у R47H KI, только у WT и только у R47H Ki (фигуры 18 С, D и E).

[317] Данные показывают, что однократная доза антитела–агониста по настоящему изобретению в модели провокации LPS является адекватной для положительного регулирования функции микроглии так же, как избыточная экспрессия конститутивного гена при хроническом показании, таком как AD. Кроме того, специфическая активация TREM2 антителом–агонистом по настоящему изобретению воздействует на множество гомеостатических генов в режиме лечения LPS и восстанавливает более гомеостатическое состояние в целом.

[318] Все публикации, патенты и патентные заявки, обсуждаемые и цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в полном их объеме. Необходимо понимать, что раскрытое изобретение не ограничивается конкретной описанной методологией, протоколами и материалами, поскольку они могут варьироваться. Кроме того, необходимо понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не предназначена для ограничения объема прилагаемой формулы изобретения.

[319] Специалистам в данной области техники будет понятно, или они способны определить с использованием только обычного экспериментирования, наличие многих эквивалентов конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанного в данном документе. Подразумевается, что такие эквиваленты охвачены приведенной ниже формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист, который специфически связывается с TREM2 человека, где антигенсвязывающий белок–агонист повышает TREM2–опосредованные уровни pSyk с EC50 меньше чем 500 пМ в отсутствие перекрестносшивающего средства, как измерено с помощью клеточного анализа pSyk.

2. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 1, где антигенсвязывающий белок–агонист повышает TREM2–опосредованные уровни pSyk с EC50 меньше чем 300 пМ в отсутствие перекрестносшивающего средства, как измерено с помощью клеточного анализа pSyk.

3. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 1, где антигенсвязывающий белок–агонист повышает TREM2–опосредованные уровни pSyk с EC50 от приблизительно 150 пМ до приблизительно 500 пМ в отсутствие перекрестносшивающего средства, как измерено с помощью клеточного анализа pSyk.

4. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по любому из пп. 1–3, где антигенсвязывающий белок–агонист специфически связывается с TREM2 человека с K_D меньше чем 50 нМ.

5. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по любому из пп. 1–3, где антигенсвязывающий белок–агонист специфически связывается с TREM2 человека с K_D меньше чем 10 нМ.

6. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по любому из пп. 1–5, где антигенсвязывающий белок–агонист не связывается специфически с TREM1 человека.

7. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по любому из пп. 1–6, где антигенсвязывающий белок–агонист конкурирует с эталонным антителом за связывание с TREM2 человека, где эталонное антитело содержит:

(a) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 61, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 124;

(b) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 62, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 125;

(c) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 52, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 115; или

(d) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 56, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 119.

8. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист, который специфически связывается с TREM2 человека, где антигенсвязывающий белок–агонист содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую

определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRL1 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5–18, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; CDRL2 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19–30, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; CDRL3 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31–45, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; CDRH1 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 77–86, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; CDRH2 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 87–94, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; и CDRH3 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 95–109, или ее вариант, содержащий одну, две, три или четыре аминокислотные замены.

9. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 8, где CDRL1 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5–18; CDRL2 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19–30; CDRL3 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31–45; CDRH1 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 77–86; CDRH2 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 87–94; и CDRH3 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 95–109.

10. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 8 или п. 9, где переменная область легкой цепи содержит (i) последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 46–63, (ii) последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 46–63, или (iii) последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 46–63.

11. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 10, где переменная область легкой цепи содержит последовательность под SEQ ID NO: 54 или последовательность под SEQ ID NO: 54 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 64, 79, 80, 85, 94 и/или 100.

12. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 11, где мутация представляет собой V64G, V64A, Q79E, Q79D, S80P, S80A, F85V, F85L, F85A, F85D, F85I, F85L, F85M, F85T, W94F, W94Y, W94S, W94T, W94A, W94H, W94I, W94Q, P100R, P100Q, P100G или их комбинации.

13. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 10, где переменная область легкой цепи содержит последовательность под SEQ ID NO: 55 или последовательность под SEQ ID NO: 55 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 64, 79, 80, 94 и/или 100.

14. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 13, где мутация представляет собой V64G, V64A, Q79E, Q79D, S80P, S80A, W94F, W94Y, W94S, W94T, W94A, W94H, W94I, W94Q, P100R, P100Q, P100G или их комбинации.

15. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 14, где мутация представляет собой V64G, V64A, Q79E, S80P, S80A, W94Y, W94S, P100R, P100Q или их комбинации.

16. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 10, где вариабельная область легкой цепи содержит последовательность под SEQ ID NO: 60 или последовательность под SEQ ID NO: 60 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 60, 92 и/или 93.

17. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 16, где мутация представляет собой L60S, L60P, L60D, L60A, D92E, D92Q, D92T, D92N, S93A, S93N, S93Q, S93V или их комбинации.

18. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 10, где вариабельная область легкой цепи содержит последовательность под SEQ ID NO: 61 или последовательность под SEQ ID NO: 61 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 56, 57, 92 и/или 93.

19. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 18, где мутация представляет собой N56S, N56T, N56Q, N56E, G57A, G57V, D92E, D92Q, D92T, D92N, S93A, S93N, S93Q, S93V или их комбинации.

20. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 19, где мутация представляет собой N56S, N56Q, G57A, D92E, D92Q, S93A или их комбинации.

21. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 10, где вариабельная область легкой цепи содержит последовательность под SEQ ID NO: 62 или последовательность под SEQ ID NO: 62 с мутацией в аминокислотном положении 36, 46, 61 и/или 100.

22. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 21, где мутация представляет собой F36Y, S46L, S46R, S46V, S46F, K61R, P100Q, P100G, P100R или их комбинации.

23. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 22, где мутация представляет собой F36Y, K61R, P100Q или их комбинации.

24. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 10, где вариабельная область легкой цепи содержит последовательность под SEQ ID NO: 52 или последовательность под SEQ ID NO: 52 с мутацией в аминокислотном положении 91.

25. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 24, где мутация представляет собой F91V, F91I, F91T, F91L или F91D.

26. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 25, где мутация представляет собой F91V.

27. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по любому из пп. 8–26, где вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 110–126, (ii) последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 110–126, или (iii) последовательность, выбранную из SEQ ID

NO: 110–126.

28. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 27, где вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность под SEQ ID NO: 117 или последовательность под SEQ ID NO: 117 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 19, 55, 56, 57, 58 и/или 104.

29. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 28, где мутация представляет собой M19K, M19R, M19T, M19E, M19N, M19Q, D55E, D55Q, D55N, D55T, S56A, S56Q, S56V, D57S, D57E, D57Q, T58A, T58V, W104F, W104Y, W104T, W104S, W104A, W104H, W104I, W104Q или их комбинации.

30. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 27, где вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность под SEQ ID NO: 118 или последовательность под SEQ ID NO: 118 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 19, 55, 56, 57, 58 и/или 104.

31. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 30, где мутация представляет собой M19K, M19R, M19T, M19E, M19N, M19Q, D55E, D55Q, D55N, D55T, S56A, S56Q, S56V, D57S, D57E, D57Q, T58A, T58V, W104F, W104Y, W104T, W104S, W104A, W104H, W104I, W104Q или их комбинации.

32. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 31, где мутация представляет собой M19K, D55E, S56A, D57E, T58A, W104Y, W104T или их комбинации.

33. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 27, где вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность под SEQ ID NO: 123 или последовательность под SEQ ID NO: 123 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 27, 55, 56, 57, 58, 105 и/или 106.

34. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 33, где мутация представляет собой H27Y, H27D, H27F, H27N, D55E, D55Q, D55N, D55T, S56A, S56Q, S56V, D57S, D57E, D57Q, T58A, T58V, D105E, D105Q, D105T, D105N, D105G, S106A, S106Q, S106V, S106T или их комбинации.

35. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 27, где вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность под SEQ ID NO: 124 или последовательность под SEQ ID NO: 124 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 55, 56, 57, 58, 105 и/или 106.

36. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 35, где мутация представляет собой D55E, D55Q, D55N, D55T, S56A, S56Q, S56V, D57S, D57E, D57Q, T58A, T58V, D105E, D105Q, D105T, D105N, D105G, S106A, S106Q, S106V, S106T или их комбинации.

37. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 36, где мутация представляет собой D55E, D55Q, S56A, D57E, T58A, D105E, D105N, S106A или их комбинации.

38. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 27, где вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность под SEQ ID NO: 125 или

последовательность под SEQ ID NO: 125 с мутацией в одном или более из аминокислотных положений 43, 76, 85, 99, 100 и/или 116.

39. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 38, где мутация представляет собой L43Q, L43K, L43H, I76T, R85S, R85G, R85N, R85D, D99E, D99Q, D99S, D99T, G100A, G100Y, G100V, T116L, T116M, T116P, T116R или их комбинации.

40. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 39, где мутация представляет собой L43Q, I76T, R85S, D99E, G100A, G100Y, T116L или их комбинации.

41. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 27, где вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность под SEQ ID NO: 115 или последовательность под SEQ ID NO: 115 с мутацией в аминокислотном положении 62 и/или 63.

42. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 41, где мутация представляет собой D62E, D62Q, D62T, D62N, S63A, S63Q, S63V или их комбинации.

43. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 42, где мутация представляет собой D62E, D62Q, S63A или их комбинации.

44. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист, который специфически связывается с TREM2 человека, где антигенсвязывающий белок–агонист содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRL1 содержит последовательность под SEQ ID NO: 16, CDRL2 содержит последовательность под SEQ ID NO: 139, CDRL3 содержит последовательность под SEQ ID NO: 140, CDRH1 содержит последовательность под SEQ ID NO: 85, CDRH2 содержит последовательность под SEQ ID NO: 141, и CDRH3 содержит последовательность под SEQ ID NO: 142.

45. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 44, где CDRL1 содержит последовательность под SEQ ID NO: 16, CDRL2 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 26 и 143–147; CDRL3 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 43 и 148–152; CDRH1 содержит последовательность под SEQ ID NO: 85, CDRH2 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 91 и 170–175; и CDRH3 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 176–179.

46. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 44 или п. 45, где вариабельная область легкой цепи содержит (i) последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 153–162, (ii) последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 153–162, или (iii) последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 153–162.

47. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по любому из пп. 44–46, где вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 180–190, (ii) последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности,

выбранной из SEQ ID NO: 180–190, или (iii) последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 180–190.

48. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист, который специфически связывается с TREM2 человека, где антигенсвязывающий белок–агонист содержит переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRL1 содержит последовательность под SEQ ID NO: 284, CDRL2 содержит последовательность под SEQ ID NO: 285, CDRL3 содержит последовательность под SEQ ID NO: 286, CDRH1 содержит последовательность под SEQ ID NO: 287, CDRH2 содержит последовательность под SEQ ID NO: 288, и CDRH3 содержит последовательность под SEQ ID NO: 289.

49. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 48, где CDRL1 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16, 290 и 291, CDRL2 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28, 292 и 293, CDRL3 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 43, 294 и 271; CDRH1 содержит последовательность под SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 302, CDRH2 содержит последовательность под SEQ ID NO: 91 или SEQ ID NO: 303; и CDRH3 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 107 и 304–306.

50. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 48 или п. 49, где переменная область легкой цепи содержит (i) последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 61 и 295–300, (ii) последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 61 и 295–300, или (iii) последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 61 и 295–300.

51. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по любому из пп. 48–50, где переменная область тяжелой цепи содержит (i) последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 124 и 307–312, (ii) последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 124 и 307–312, или (iii) последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 124 и 307–312.

52. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по любому из пп. 1–51, где антигенсвязывающий белок–агонист представляет собой моноклональное антитело или его связывающий фрагмент.

53. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 52, где моноклональное антитело или его связывающий фрагмент представляет собой химерное антитело или его связывающий фрагмент, гуманизированное антитело или его связывающий фрагмент или полностью человеческое антитело или его связывающий фрагмент.

54. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 52 или п. 53, где моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

55. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 54, где моноклональное антитело представляет собой антитело IgG2 человека.

56. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 55, где моноклональное антитело содержит в своей тяжелой цепи мутацию C131S согласно нумерации EU.

57. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 55, где моноклональное антитело содержит в своей легкой цепи мутацию C214S согласно нумерации EU и в своей тяжелой цепи мутацию C220S согласно нумерации EU.

58. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 54, где моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1 человека.

59. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 58, где моноклональное антитело представляет собой агликозилированное антитело IgG1 человека.

60. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 59, где моноклональное антитело содержит в своей тяжелой цепи мутацию в аминокислотном положении N297 согласно нумерации EU.

61. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 60, где мутация представляет собой N297G.

62. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 60 или п. 61, где моноклональное антитело дополнительно содержит в своей тяжелой цепи мутации R292C и V302C согласно нумерации EU.

63. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 52, где моноклональное антитело содержит Fc–область из антитела IgG1 человека и область CH1 и шарнирную область из антитела IgG2 человека.

64. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 63, где моноклональное антитело содержит в своей тяжелой цепи мутацию в аминокислотном положении N297 согласно нумерации EU.

65. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 64, где мутация представляет собой N297G.

66. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 64 или п. 65, где моноклональное антитело дополнительно содержит в своей тяжелой цепи мутации R292C и V302C согласно нумерации EU.

67. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по любому из пп. 63–66, где моноклональное антитело содержит в своей тяжелой цепи мутацию C131S согласно нумерации EU.

68. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по любому из пп. 63–66, где моноклональное антитело содержит в своей легкой цепи мутацию C214S согласно нумерации EU и в своей тяжелой цепи мутацию C220S согласно нумерации EU.

69. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист, который специфически связывается с TREM2 человека, где антигенсвязывающий белок–агонист содержит легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи, и тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, где:

(а) переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 326, и переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 327;

(б) переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 328, и переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 329;

(с) переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 330, и переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 331; или

(д) переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 332, и переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 333.

70. Выделенный антигенсвязывающий белок–агонист по п. 69, где:

(а) легкая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 334, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 335;

(б) легкая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 334, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 336;

(с) легкая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 337, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 338;

(д) легкая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 339, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 340; или

(е) легкая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 341, и тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 342.

71. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок–агонист по любому из пп. 1–70 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

72. Выделенный полинуклеотид, который кодирует антигенсвязывающий белок–агонист по любому из пп. 1–70.

73. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п. 72.

74. Клетка–хозяин, содержащая вектор экспрессии по п. 73.

75. Способ получения антигенсвязывающего белка–агониста, который специфически связывается с TREM2 человека, предусматривающий культивирование клетки–хозяина по п. 74 в условиях, которые обеспечивают экспрессию антигенсвязывающего белка; и выделение антигенсвязывающего белка из культуральной среды или клетки–хозяина.

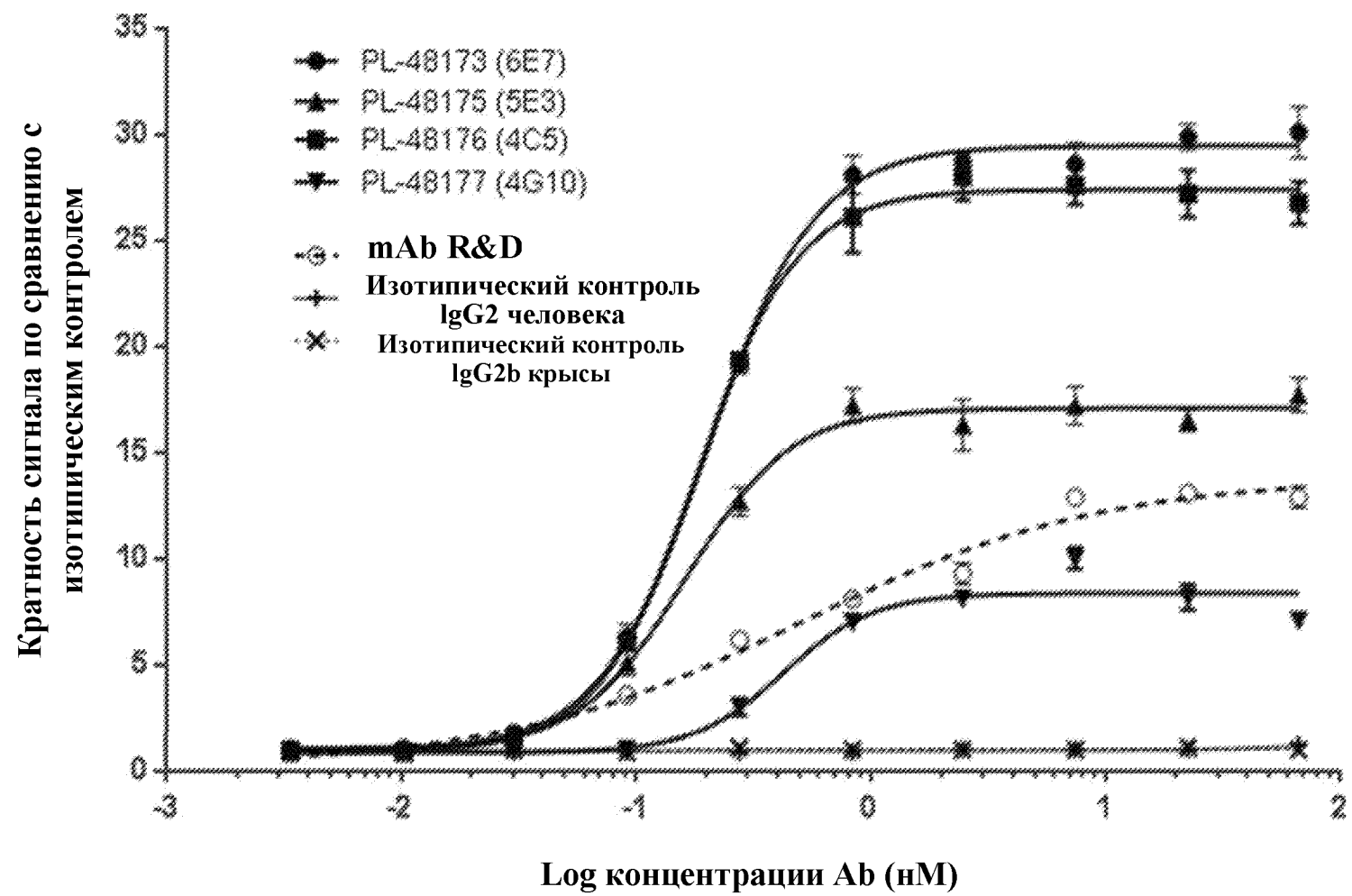
76. Способ повышения выживаемости или пролиферации макрофагов или клеток микроглии у пациента, нуждающегося в этом, предусматривающий введение пациенту эффективного количества антигенсвязывающего белка–агониста по любому из пп. 1–70.

77. Способ лечения или предупреждения состояния, связанного с утратой функции TREM2 человека у пациента, нуждающегося в этом, предусматривающий введение

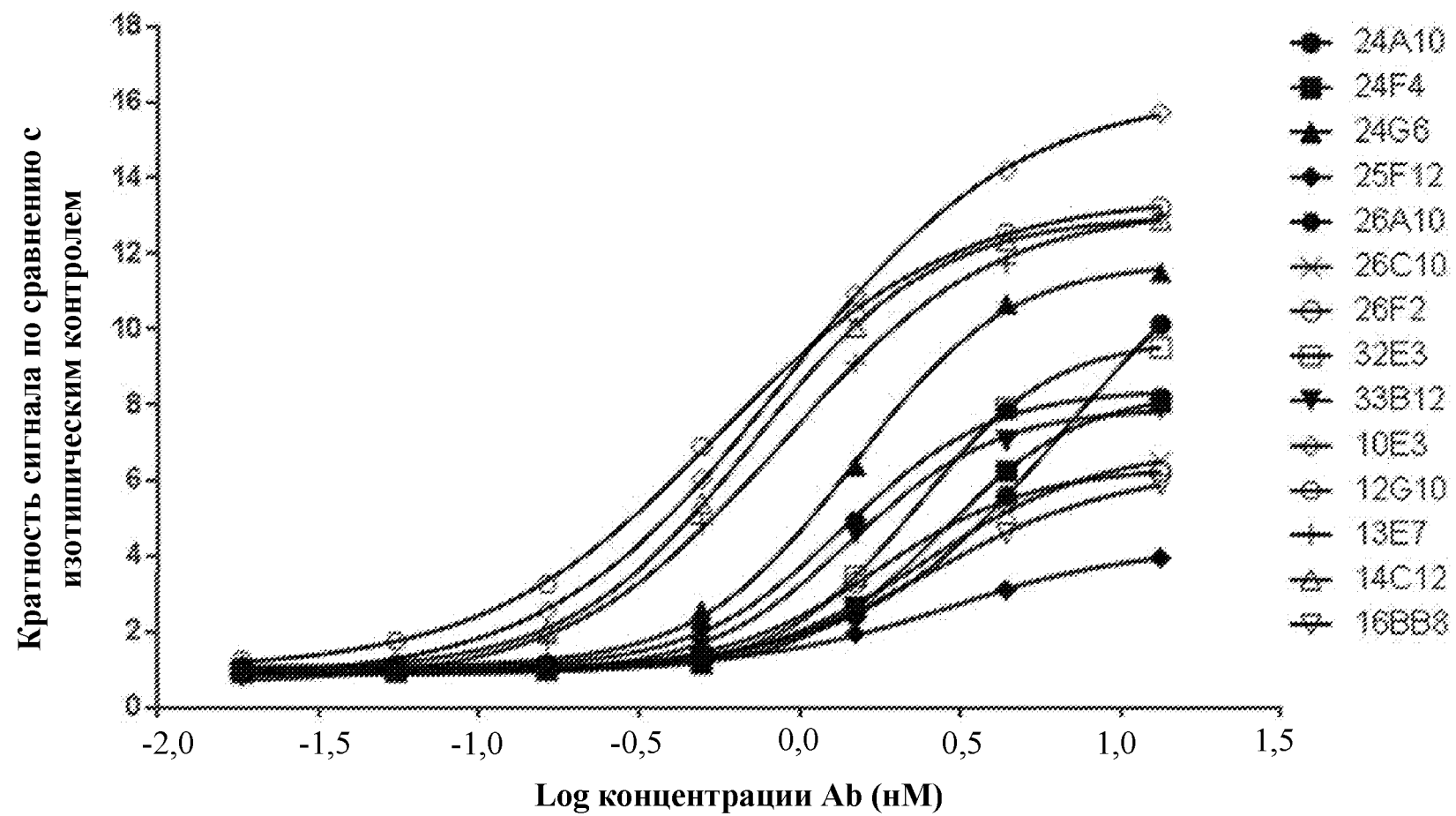
пациенту эффективного количества антигенсвязывающего белка–агониста по любому из пп. 1–70.

78. Способ по п. 77, где состояние представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Насу–Хакола, лобно–височную деменцию, рассеянный склероз, прионную болезнь или инсульт.

По доверенности



ФИГ. 1А



ФИГ. 1В

ID. Ab	Зародышевый тип	SEQ ID NO:	K_FR1	K_CDR1	K_FR2	K_CDR2
	VK4 B3/JK5	64	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSS---QSVLYSSNNKNYLA	WYQQKPGQPPKLLIY	W-----ASTRES
24C12	VK4 B3/JK5	51	G.....	R.....	V...	
	VK4 B3/JK4	65	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSS---QSVLYSSNNKNYLA	WYQQKPGQPPKLLIY	W-----ASTRES
24G6	VK4 B3/JK4	52		HF..		
	VK4 B3/JK2	66	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSS---QSVLYSSNNKNYLA	WYQQKPGQPPKLLIY	W-----ASTRES
24A10	VK4 B3/JK2	53	T.	HN.....		
	VK3 L2/JK3	67	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	RAS---QSVS-----SNLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G-----ASTRAT
10E3	VK3 L2/JK3	54			.F.....	
13E7 14C12	VK3 L2/JK3	55			.F.....	
	VK3 L2/JK1	68	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	RAS---QSVS-----SNLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G-----ASTRAT
25F12	VK3 L2/JK1	56	.K.....	N.....N...		
	VK3 A27/JK5	69	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAS---QSVSS-----SYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G-----ASSRAT
32E3	VK3 A27/JK5	57	.F.....	II.....N...		S.....
	VK3 A27/JK3	70	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAS---QSVSS-----SYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G-----ASSRAT
24F4	VK3 A27/JK3	58				
	VK1 L5/JK5	71	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTC	RAS---QGIS-----SWLA	WYQQKPGKAPKLLIY	A-----ASSLQS
16B8	VK1 L5/JK5	59	V..	D.N.....		T
	VK1 L5/JK2	72	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTC	RAS---QGIS-----SWLA	WYQQKPGKAPKLLIY	A-----ASSLQS
4C5	VK1 L5/JK2	60		N...		V
6E7	VK1 L5/JK2	61				N
	VK1 L1/JK3	73	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RAS---QGIS-----NYLA	WFQQKPGKAPKSLIY	A-----ASSLQS
5E3	VK1 L1/JK3	62				
	VK1 A30/JK1	74	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RAS---QGIR-----NDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	A-----ASSLQS
4G10	VK1 A30/JK1	63			N.....	P.

ФИГ. 2А

ID. Ab	Зародышевый тип	SEQ ID NO:	K_FR3	K_CDR3	K_FR4
	VK4 B3/JK5	64	GVPDFRFGSGSG--TDFTLTISSLQAEDVAVYYC	QQYYS-----TPIT	FGQGTRLEIK
24C12	VK4 B3/JK5	51	N.	I.....	
	VK4 B3/JK4	65	GVPDFRFGSGSG--TDFTLTISSLQAEDVAVYYC	QQYYS-----TPLT	FGGGTKVEIK
24G6	VK4 B3/JK4	52	F...		
	VK4 B3/JK2	66	GVPDFRFGSGSG--TDFTLTISSLQAEDVAVYYC	QQYYS-----TPYT	FGQGTKLEIK
24A10	VK4 B3/JK2	53		H.....CS	
	VK3 L2/JK3	67	GIPARFSGSGSG--TEFTLTISSLQSEDFAVYYC	QQYNN-----WPFT	FGPGTKVDIK
10E3	VK3 L2/JK3	54	V.....F...	L.D.....P.	
13E7 14C12	VK3 L2/JK3	55	V.....	L.D.....P.	
	VK3 L2/JK1	68	GIPARFSGSGSG--TEFTLTISSLQSEDFAVYYC	QQYNN-----WPWT	FGQGTKVEIK
25F12	VK3 L2/JK1	56		R.	
	VK3 A27/JK5	69	GIPDRFSGSGSG--TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGS-----SPIT	FGQGTRLEIK
32E3	VK3 A27/JK5	57		..FD.....	..R....D..
	VK3 A27/JK3	70	GIPDRFSGSGSG--TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGS-----SPFT	FGPGTKVDIK
24F4	VK3 A27/JK3	58	L...	...DT.....	
	VK1 L5/JK5	71	GVPSRFSGSGSG--TDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQANS-----FPIT	FGQGTRLEIK
16B8	VK1 L5/JK5	59	S.	..S.....	
	VK1 L5/JK2	72	GVPSRFSGSGSG--TDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQANS-----FPYT	FGQGTKLEIK
4C5	VK1 L5/JK2	60	...L.....	...D.....RN	
6E7	VK1 L5/JK2	61	F.	...D.....R.	
	VK1 L1/JK3	73	GVPSRFSGSGSG--TDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQYNS-----YPFT	FGPGTKVDIK
5E3	VK1 L1/JK3	62	K.....	...ST.....	
	VK1 A30/JK1	74	GVPSRFSGSGSG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNS-----YPWT	FGQGTKVEIK
4G10	VK1 A30/JK1	63	P.....		T

ФИГ. 2В

ID. Ab	Зародышевый тип	SEQ ID NO:	L_FR1	L_CDR1	L_FR2	L_CDR2
	VL5 5c/JL2	75	QAVLTQP-ASLSASPGASASLTC	TLRS-GINVGT-----YRIY	WYQQKPGSPPQYLLR	YKS-----DSDKQQGS
12G10	VL5 5c/JL2	46	...P....S.....VL.....			
	VL3 3r/JL2	76	SYELTQP-PSVSVSPGQTASITC	SGD---KLGD-----KYAC	WYQQKPGQSPVLVIY	Q-----DSKRPS
26A10	VL3 3r/JL2	47		V.		
26C10	VL3 3r/JL2	48	.F.....	V.	M....	T....
26F2	VL3 3r/JL2	49		V.	F	
33B12	VL3 3r/JL2	50		V.		

ФИГ. 3А

ID. Ab	Зародышевый тип	SEQ ID NO:	L_FR3	L_CDR3	L_FR4
	VL5 5c/JL2	75	GVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYC	MIWHS-----SASVV	FGGGTKLTVL
12G10	VL5 5c/JL2	46		...Y.....-SA..	
	VL3 3r/JL2	76	GIPERFSGSNSG--NTATLTISGTQAMDEADYYC	QAWDS-----STAVV	FGGGTKLTVL
26A10	VL3 3r/JL2	47		-NT..	
26C10	VL3 3r/JL2	48		-ST..	
26F2	VL3 3r/JL2	49		-ST..	
33B12	VL3 3r/JL2	50		-ST..	

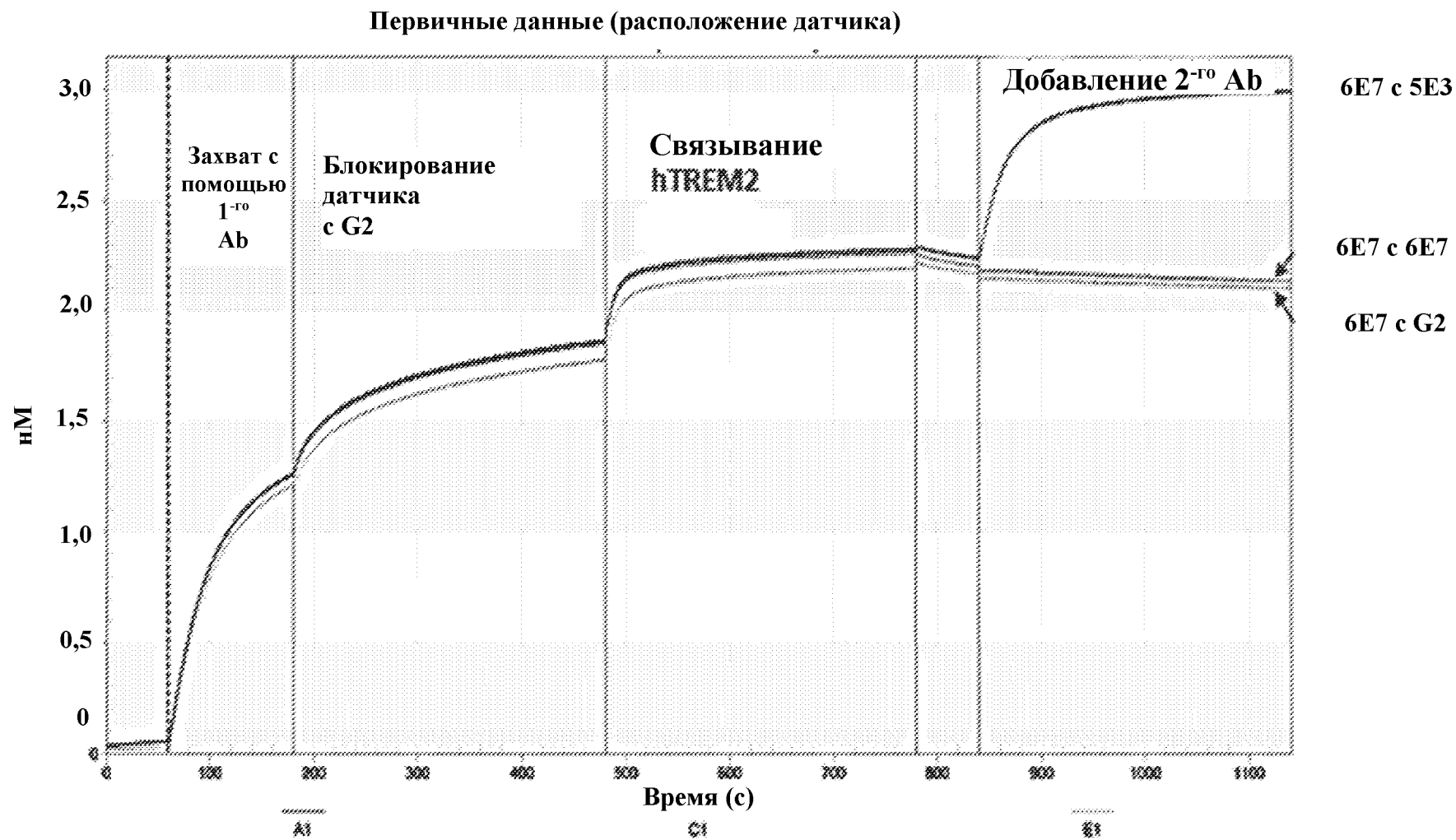
ФИГ. 3В

ID. Ab	Зародышевый тип	SEQ ID NO:	H_FR1	H_CDR1	H_FR2	H_CDR2
	VH3 3-23/D3 3-16 RF2/JH4	127	EVQLLES-GGGLVQPGGSLRLSCAASG-FTFS	S-----YAMS	WVRQAPGKGLEWVS	AISGS---GGSTYYADSVKG
12G10	VH3 3-23/D3 3-16 RF2/JH4	110				..G.G...V...C.....
24C12	VH3 3-23/D3 3-16 RF2/JH4	110				..G.G...V...C.....
	VH3 3-48/D7 7-27 RF1/JH6	128	EVQLVES-GGGLVQPGGSLRLSCAASG-FTFS	S-----YSMN	WVRQAPGKGLEWVS	YISSS---SSTIYYADSVKG
26A10	VH3 3-48/D7 7-27 RF1/JH6	111	A...R.....R.....	FG.S		F.....
26C10	VH3 3-48/D7 7-27 RF1/JH6	112	A.....	FG.S		F.....
26F2	VH3 3-48/D7 7-27 RF1/JH6	113	A.....	FG.S	I.	F.....
33B12	VH3 3-48/D7 7-27 RF1/JH6	114	A.....	FG.S		...K....F.....
	VH3 3-23/D2 2-21 RF2/JH4	129	EVQLLES-GGGLVQPGGSLRLSCAASG-FTFS	S-----YAMS	WVRQAPGKGLEWVS	AISGS---GGSTYYADSVKG
24G6	VH3 3-23/D2 2-21 RF2/JH4	115				
	VH3 3-23/D1 1-1 RF1/JH1	130	EVQLLES-GGGLVQPGGSLRLSCAASG-FTFS	S-----YAMS	WVRQAPGKGLEWVS	AISGS---GGSTYYADSVKG
24A10	VH3 3-23/D1 1-1 RF1/JH1	116	...V.....	N.....		
	VH5 5-51/D1 1-1 RF1/JH4	131	EVQLVQS-GAEVKKPGESLKISCKGSG-YSFT	S-----YWG	WVRQMPGKGLEWMG	IIYPG---DSDTRYSPSFQG
10E3	VH5 5-51/D1 1-1 RF1/JH4	117	M.....	N.....		
13E7	VH5 5-51/D1 1-1 RF1/JH4	118	M.....			
14C12						
	VH4 4-34/D1 1-1 RF3/JH3	132	QVQLQQW-GAGLLKPSETLSLTCAVYG-GSFS	G-----YYWS	WIRQPPGKGLEWIG	EINH----SGSTNYNPSLKS
25F12	VH4 4-34/D1 1-1 RF3/JH3	119		S.....		N.....
	VH5 5-51/D5 5-12 RF1/JH3	133	EVQLVQS-GAEVKKPGESLKISCKGSG-YSFT	S-----YWG	WVRQMPGKGLEWMG	IIYPG---DSDTRYSPSFQG
32E3	VH5 5-51/D5 5-12 RF1/JH3	120				
	VH5 5-51/D5 5-12 RF1/JH5	134	EVQLVQS-GAEVKKPGESLKISCKGSG-YSFT	S-----YWG	WVRQMPGKGLEWMG	IIYPG---DSDTRYSPSFQG
24F4	VH5 5-51/D5 5-12 RF1/JH5	121	T..			
	VH1 1-18/D1 1-26 RF3/JH4	135	QVQLVQS-GAEVKKPGASVKVSKASG-YTFT	S-----YGIS	WVRQAPGQGLEWMG	WISAY---NGNTNYAQKLQG
16B8	VH1 1-18/D1 1-26 RF3/JH4	122		N.....		
	VH5 5-51/D1 1-26 RF3/JH4	136	EVQLVQS-GAEVKKPGESLKISCKGSG-YSFT	S-----YWG	WVRQMPGKGLEWMG	IIYPG---DSDTRYSPSFQG
4C5	VH5 5-51/D1 1-26 RF3/JH4	123	H...	N.....A		
6E7	VH5 5-51/D1 1-26 RF3/JH4	124		A		
	VH1 1-02/D4 4-17 RF2/JH6	137	QVQLVQS-GAEVKKPGASVKVSKASG-YTFT	G-----YYMH	WVRQAPGQGLEWMG	WINPN---SGGTNYAQKFQG
5E3	VH1 1-02/D4 4-17 RF2/JH6	125		I.	L.....	...Y.....TS.....
	VH5 5-51/D5 5-12 RF1/JH6	138	EVQLVQS-GAEVKKPGESLKISCKGSG-YSFT	S-----YWG	WVRQMPGKGLEWMG	IIYPG---DSDTRYSPSFQG
4G10	VH5 5-51/D5 5-12 RF1/JH6	126	P	A		

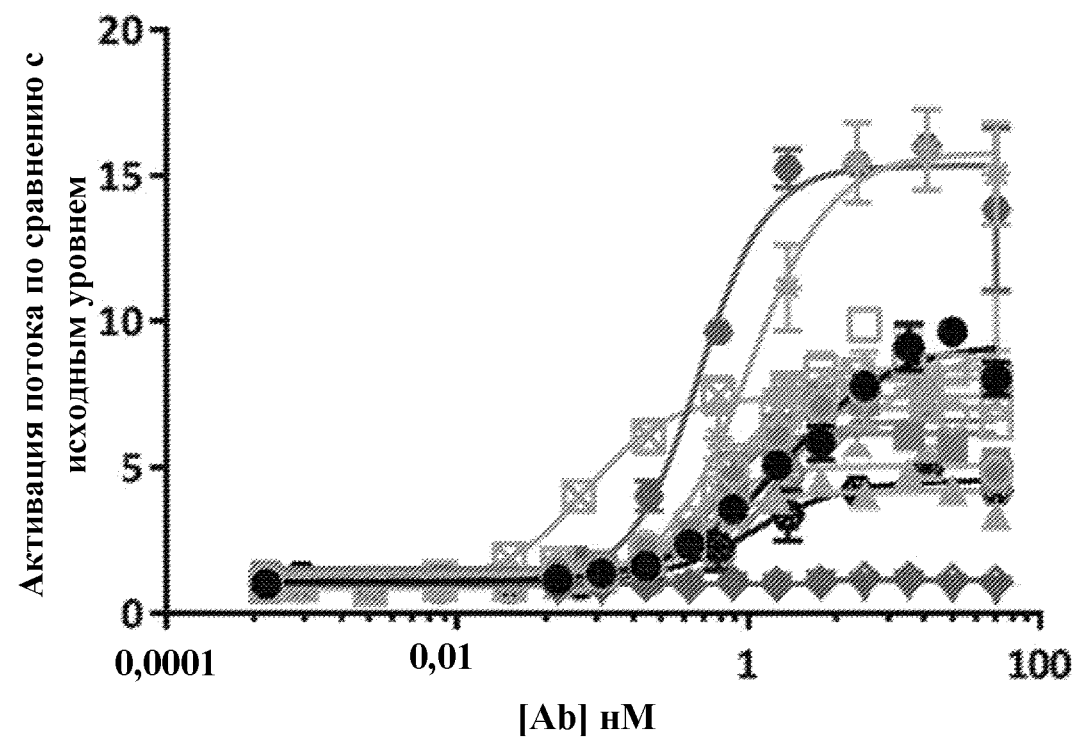
ФИГ. 4А

ID. Ab	Зародышевый тип	SEQ ID NO:	H_FR3	H_CDR3	H_FR4
	VH3 3-23/D3 3-16 RF2/JH4	127	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	YYDYVWGS-----YRYTYFDY	WGQGTLLVTVSS
12G10	VH3 3-23/D3 3-16 RF2/JH4	110		F.IA.A--.....--GSH...	
24C12	VH3 3-23/D3 3-16 RF2/JH4	110		F.IA.A--.....--GSH...	
	VH3 3-48/D7 7-27 RF1/JH6	128	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDVAVYYCAR	LTGYYY-----YYGMDV	WGQGTLLVTVSS
26A10	VH3 3-48/D7 7-27 RF1/JH6	111	F.....	EG.LTMVRG.....VSS..L..	
26C10	VH3 3-48/D7 7-27 RF1/JH6	112	F.....F.V.	EG.ITMVRG.....VSS.....	
26F2	VH3 3-48/D7 7-27 RF1/JH6	113	F.....F...	EG.ITMVRG.....VSS.....	
33B12	VH3 3-48/D7 7-27 RF1/JH6	114	F.....	EG.LTMVRG.....VSS..L..	
	VH3 3-23/D2 2-21 RF2/JH4	129	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	AYCGGDC-----YSYFDY	WGQGTLLVTVSS
24G6	VH3 3-23/D2 2-21 RF2/JH4	115		.TPM--.....-AF...	
	VH3 3-23/D1 1-1 RF1/JH1	130	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	GTTSTA-----EYFQH	WGQGTLLVTVSS
24A10	VH3 3-23/D1 1-1 RF1/JH1	116		.GWE--.....--LFY	
	VH5 5-51/D1 1-1 RF1/JH4	131	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	GTTGT-----YFDY	WGQGTLLVTVSS
10E3	VH5 5-51/D1 1-1 RF1/JH4	117	F...	RRQ.IW.....GDAL.I	
13E7	VH5 5-51/D1 1-1 RF1/JH4	118	F...	RRQ.IW.....GDAL.F	
14C12					
	VH4 4-34/D1 1-1 RF3/JH3	132	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	YNWND-----DAFDI	WGQGTMTVTVSS
25F12	VH4 4-34/D1 1-1 RF3/JH3	119		EGYY.ILT.....GYH.....	.D.....F.
	VH5 5-51/D5 5-12 RF1/JH3	133	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	VDIVAT-----IDAFDI	WGQGTMTVTVSS
32E3	VH5 5-51/D5 5-12 RF1/JH3	120	T.....I.....	H..IPAA.....PG....	
	VH5 5-51/D5 5-12 RF1/JH5	134	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	VDIVAT-----INWFDP	WGQGTLLVTVSS
24F4	VH5 5-51/D5 5-12 RF1/JH5	121	V...S.....I...T.	QA.AV.G.....LGG...	
	VH1 1-18/D1 1-26 RF3/JH4	135	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	YSGSY-----YYFDY	WGQGTLLVTVSS
16B8	VH1 1-18/D1 1-26 RF3/JH4	122	V.....	RGY.....GS...	
	VH5 5-51/D1 1-26 RF3/JH4	136	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	YSGSY-----YYFDY	WGQGTLLVTVSS
4C5	VH5 5-51/D1 1-26 RF3/JH4	123	V.F...	QRTF.YD.....SSG....	
6E7	VH5 5-51/D1 1-26 RF3/JH4	124	F...	QRTF.YD.....SSD....	
	VH1 1-02/D4 4-17 RF2/JH6	137	RVTMTTRDTSISTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	DYGDYYY-----YYYGMDV	WGQGTLLVTVSS
5E3	VH1 1-02/D4 4-17 RF2/JH6	125	S.....	.G.YLA.....-L..T..	
	VH5 5-51/D5 5-12 RF1/JH6	138	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	VDIVATLY-----YYYYGMDV	WGQGTLLVTVSS
4G10	VH5 5-51/D5 5-12 RF1/JH6	126	F.K.....F...	QG.EV.G-.....--TG.L..	

ФИГ. 4В



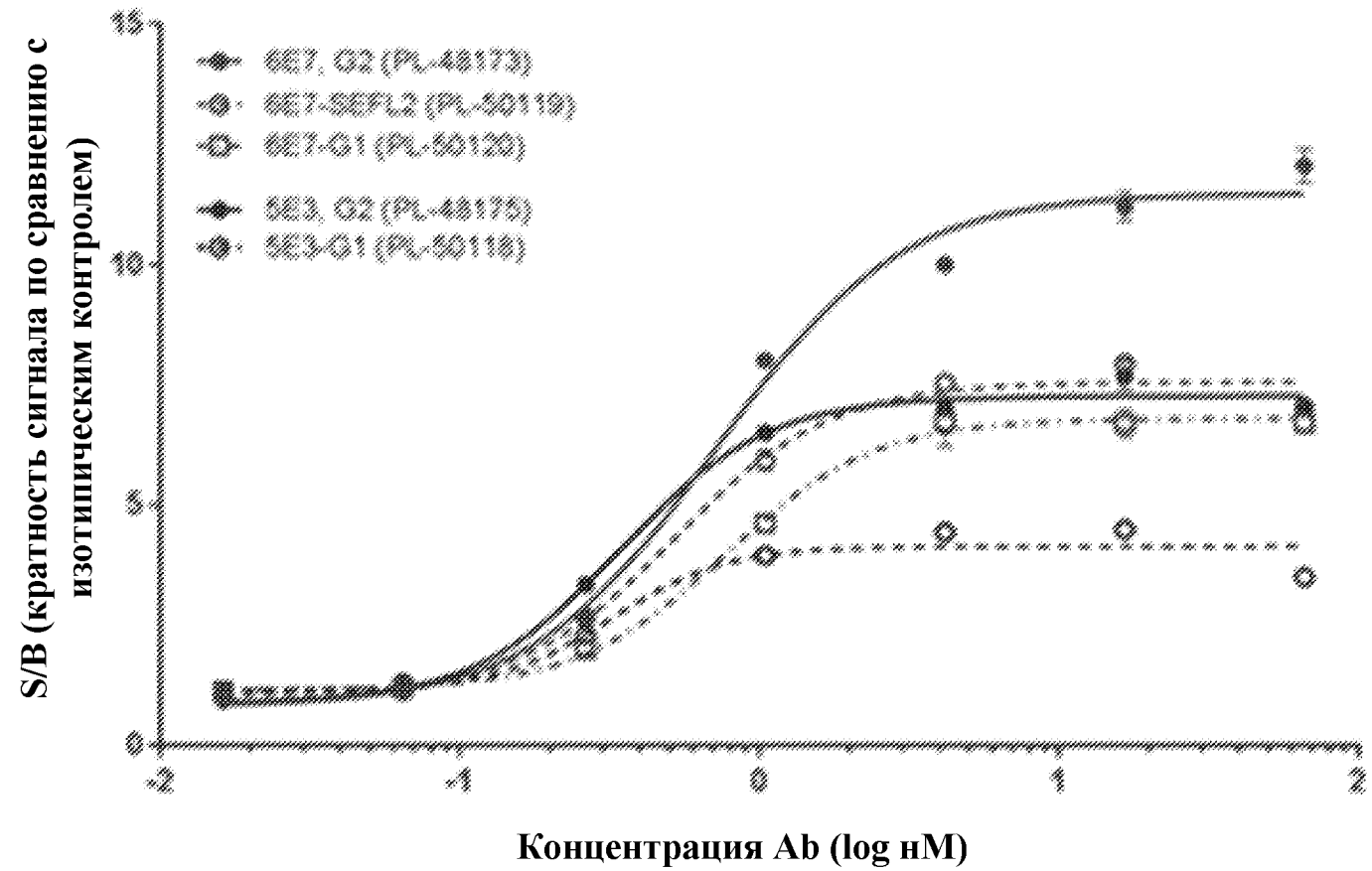
ФИГ. 5



4C5.1 4G10.1 5E3.1 6E.7 HuIgG RnD RtlgG 10E3 13E7
 24G6 16B8 25F12 26F2 32E3 33B12

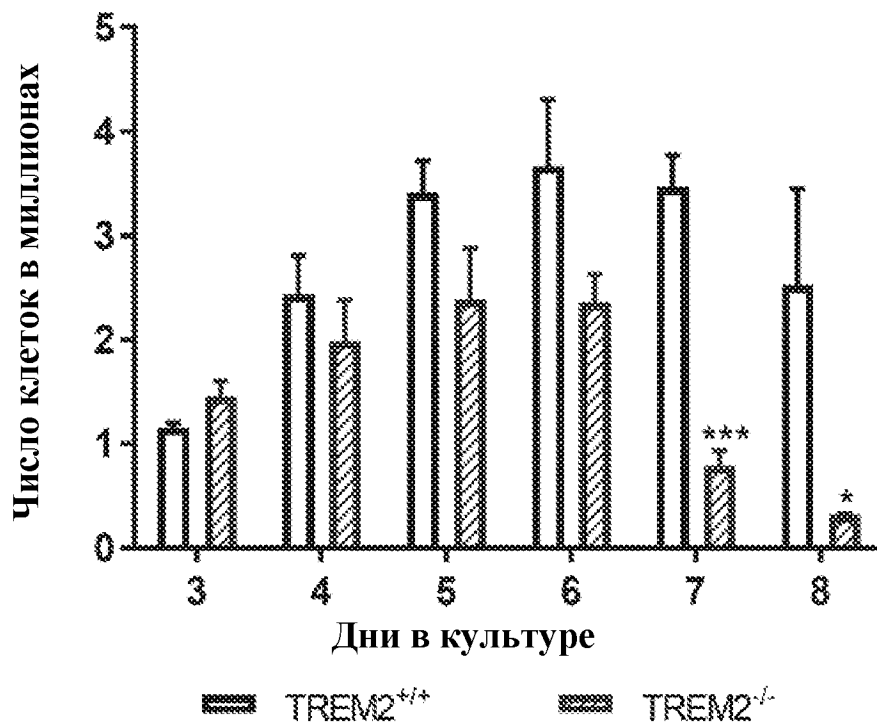
ФИГ.6

Сигнал pSyk в клетках TREM2/DAP 12-G13, стимулированных очищенным Ab hulgG1, связывающим TREM2

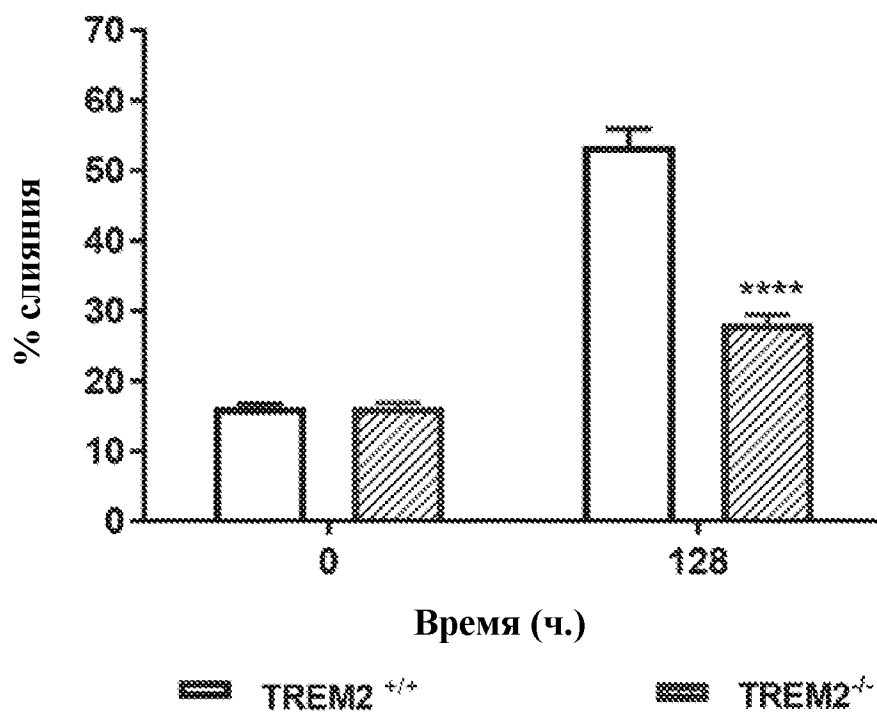


ФИГ. 7

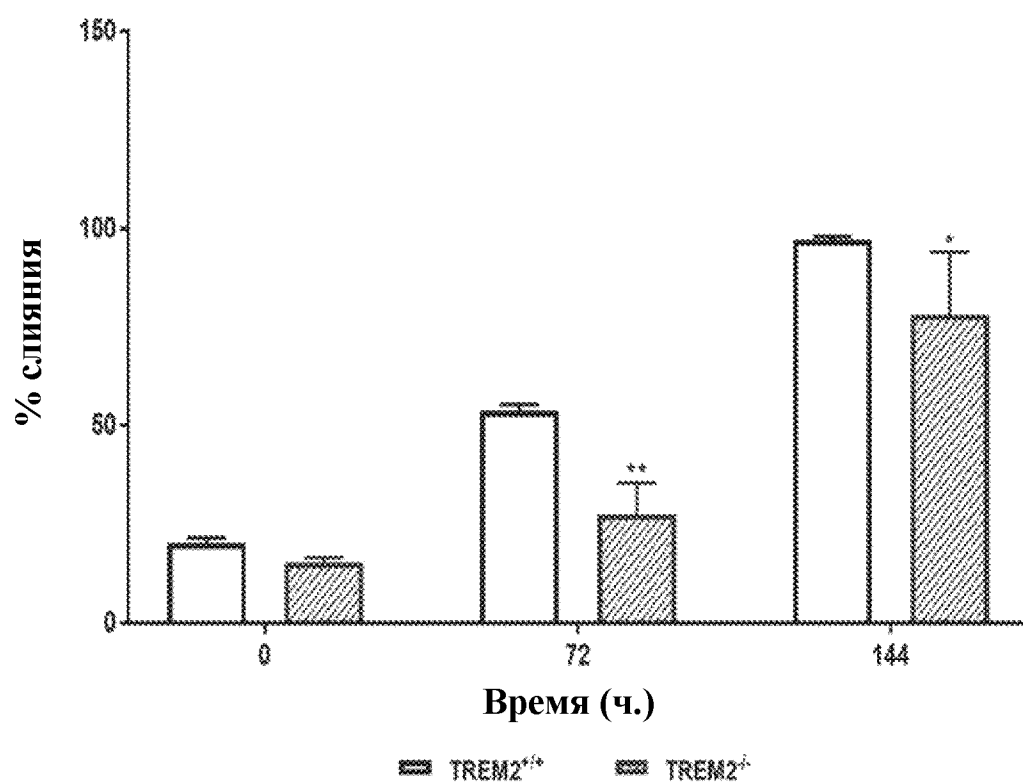
12/51



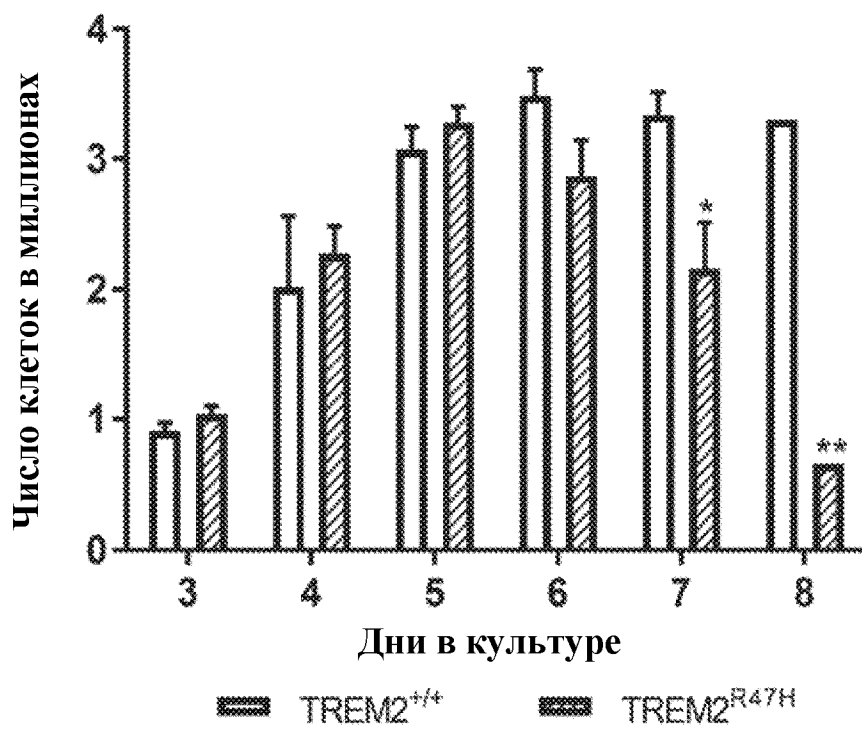
ФИГ. 8А



ФИГ. 8В

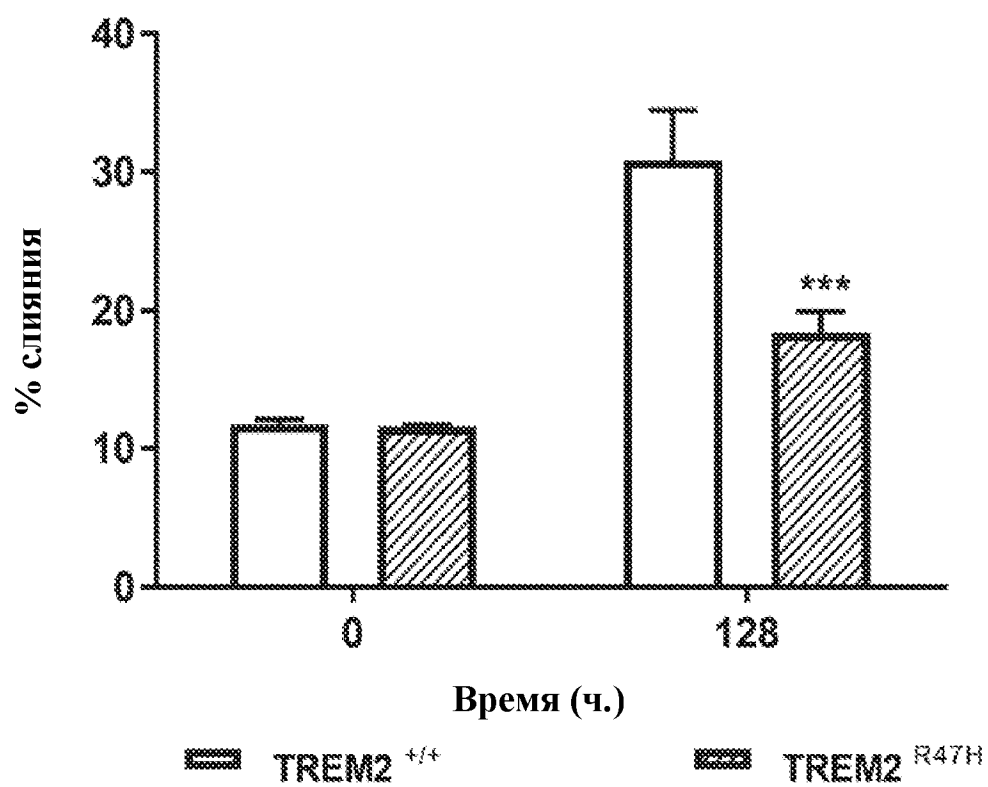


ФИГ. 8С

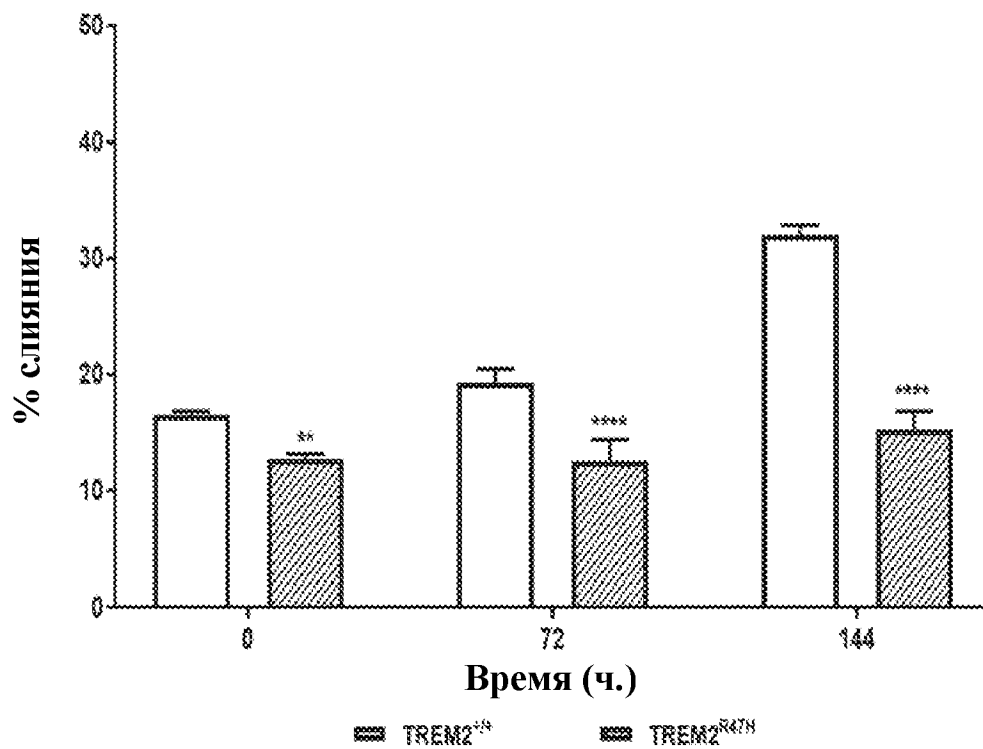


ФИГ. 8D

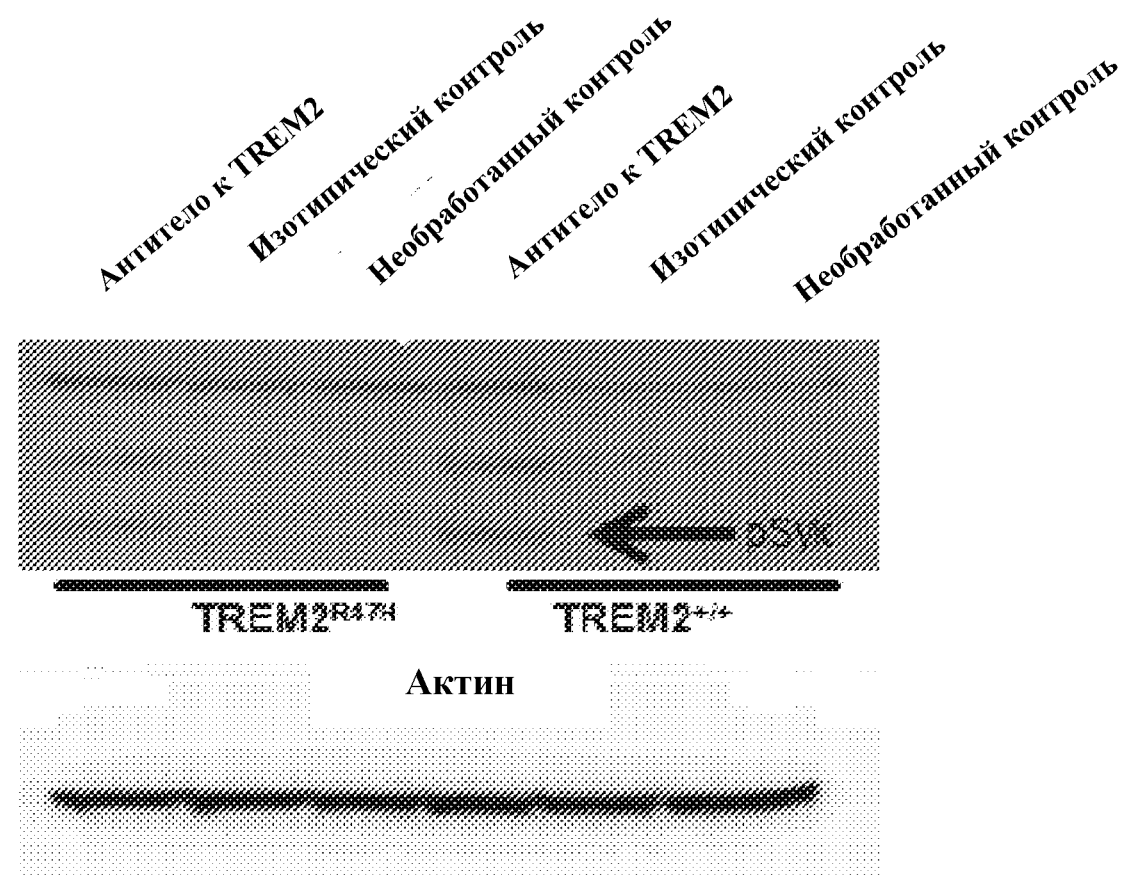
14/51



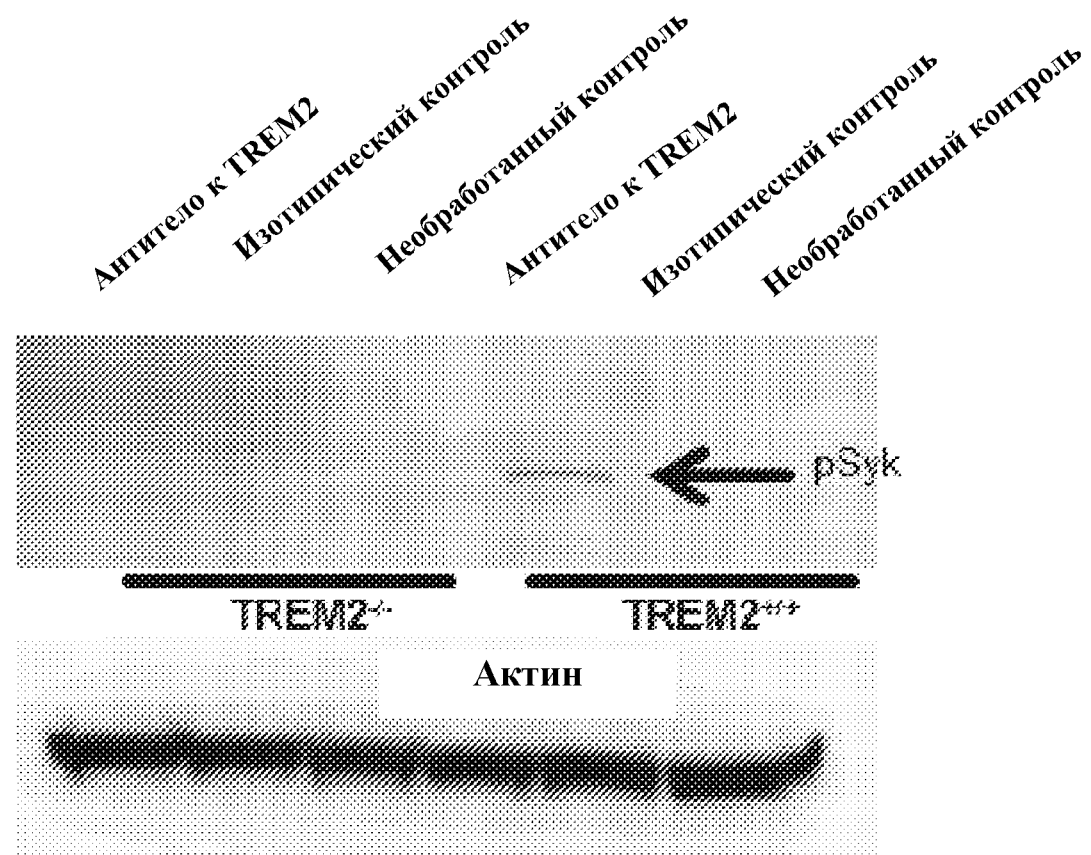
ФИГ. 8Е



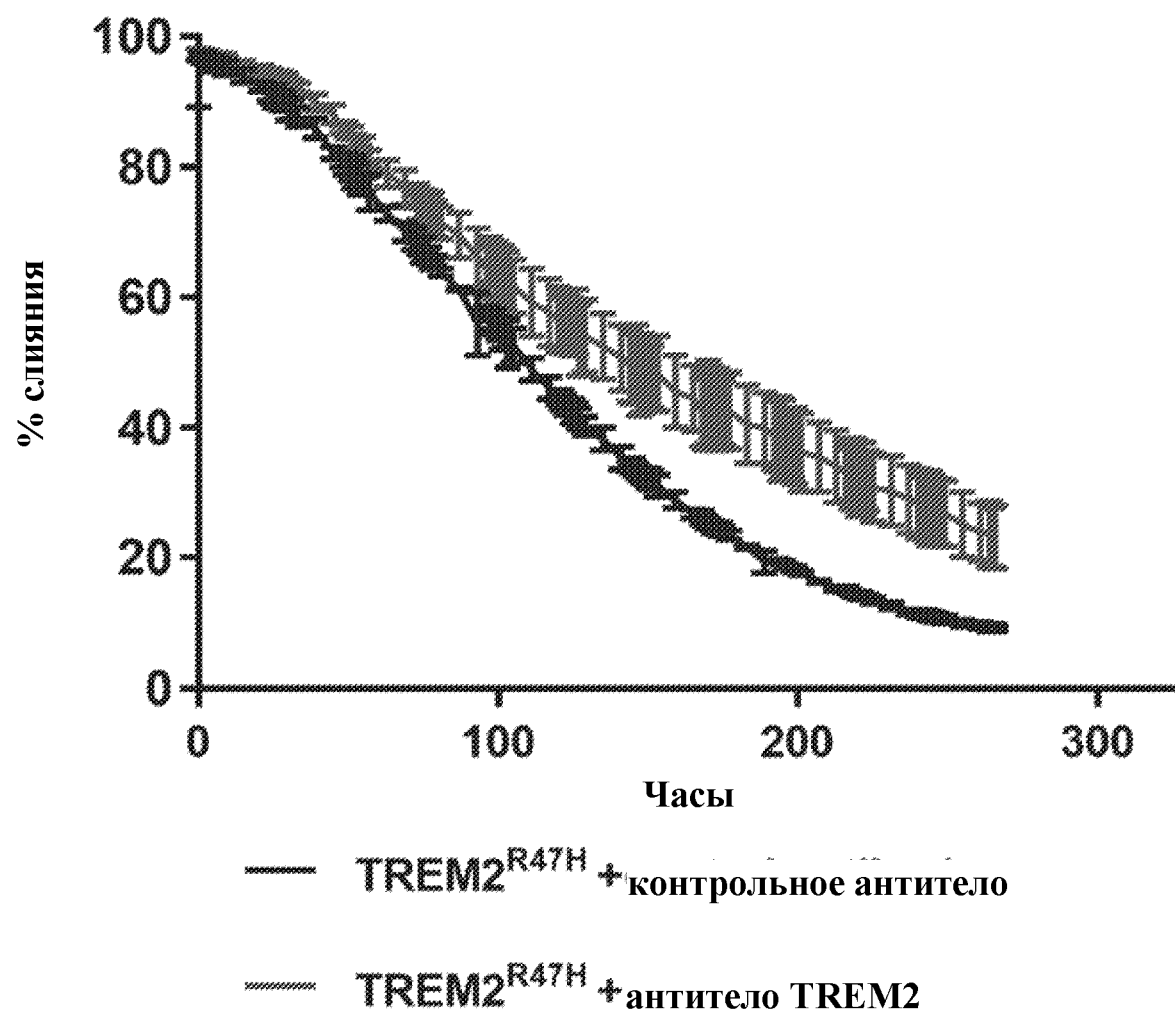
ФИГ. 8F



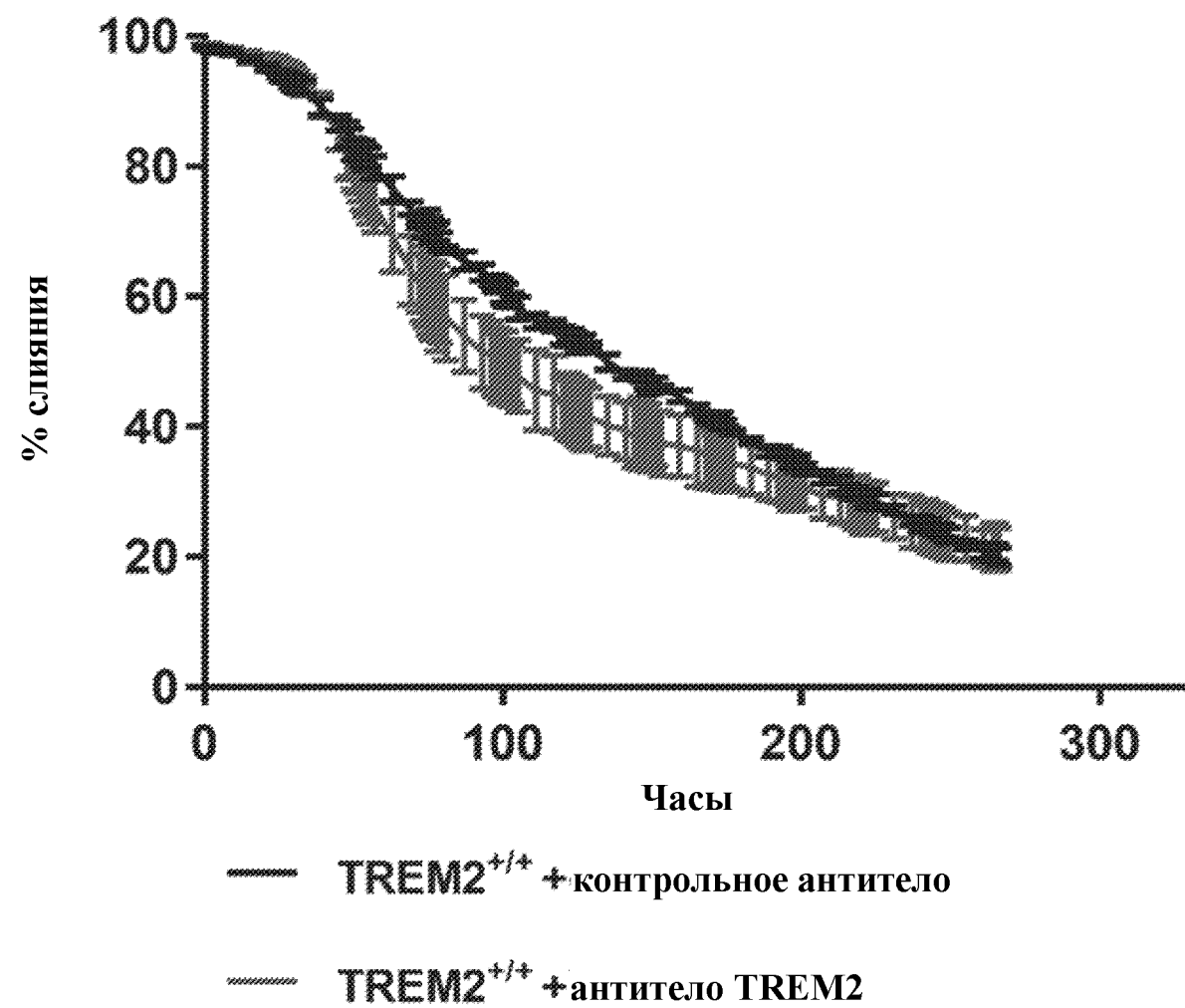
ФИГ. 9А



ФИГ. 9В

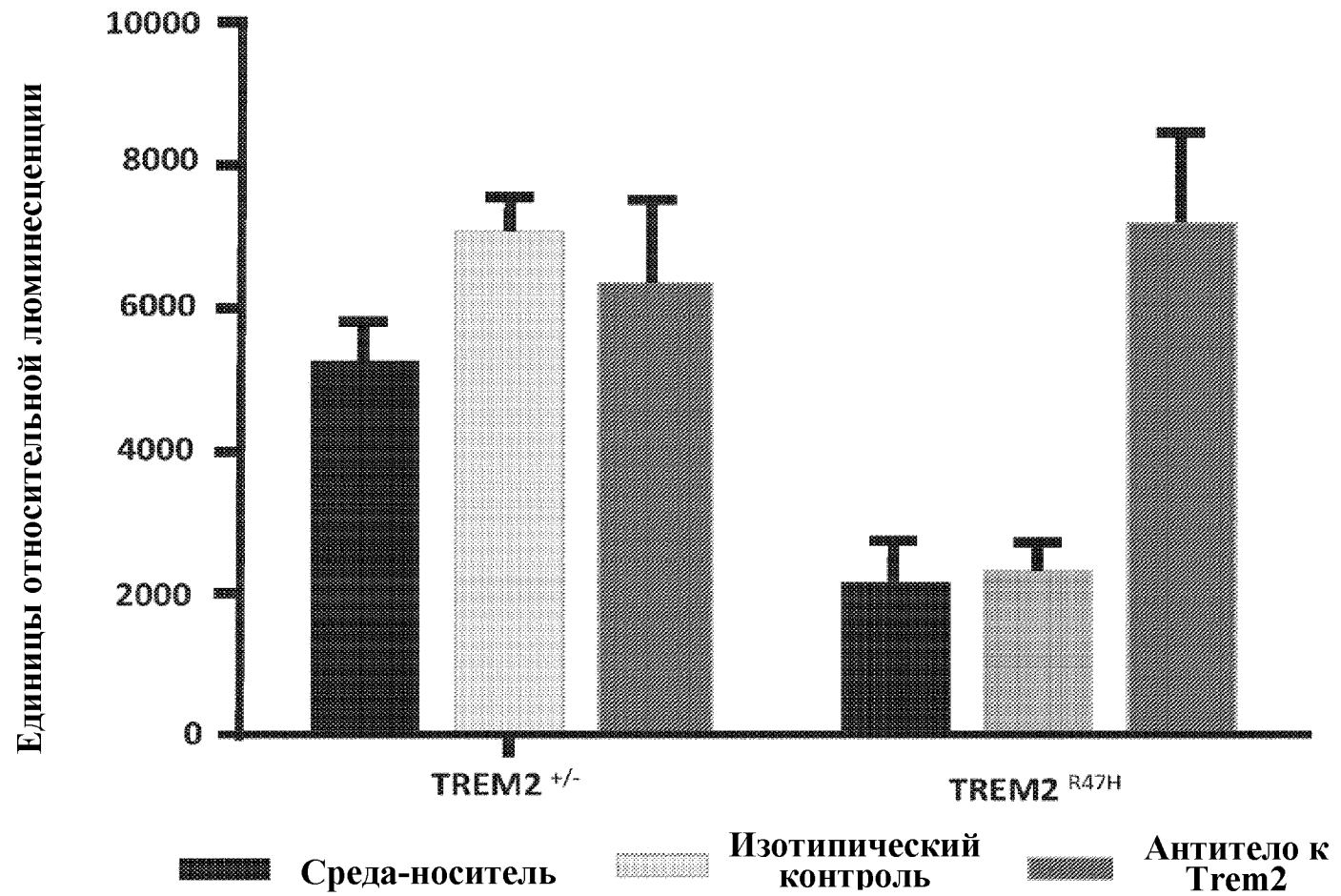


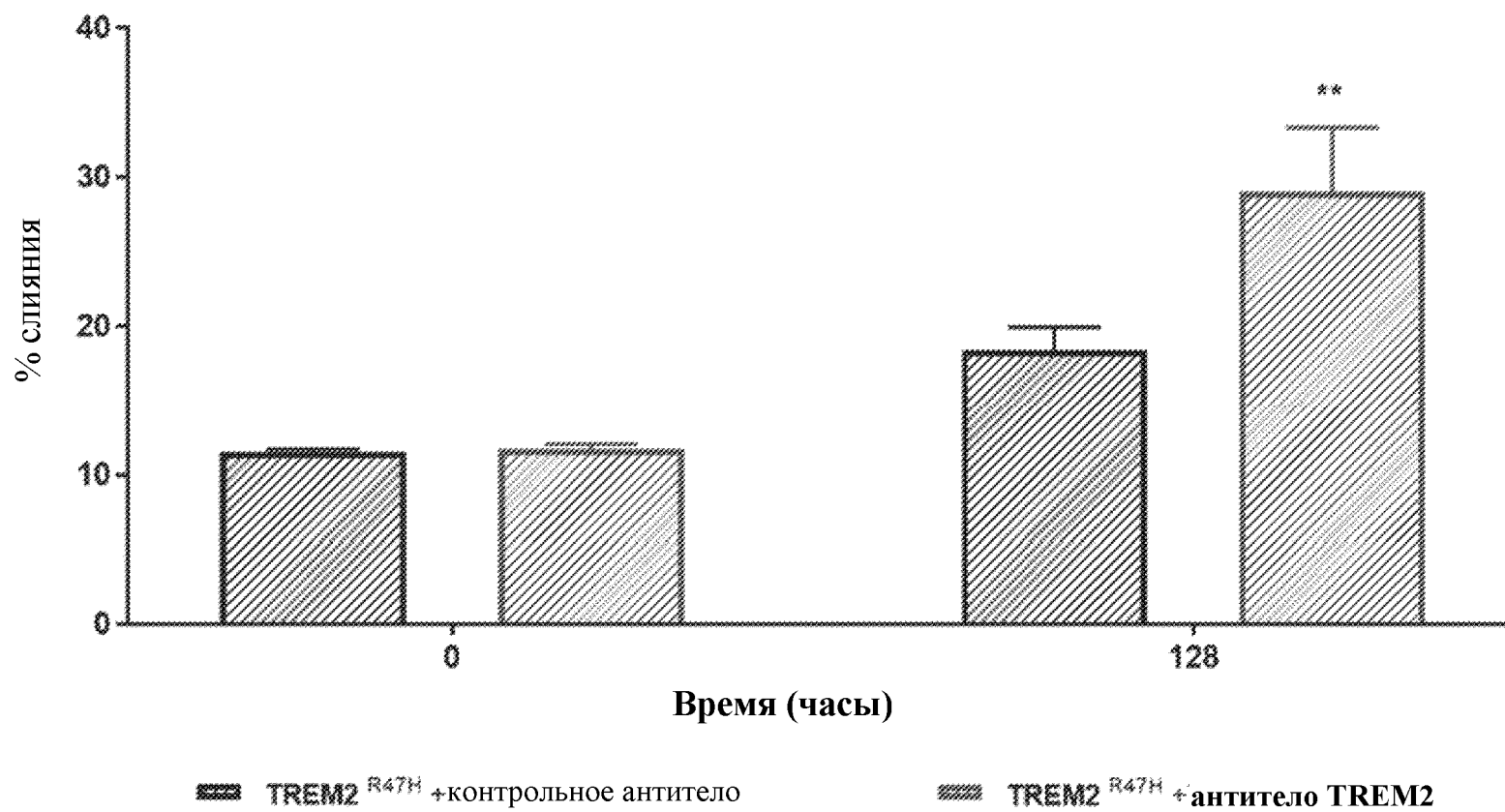
ФИГ. 10А



ФИГ. 10В

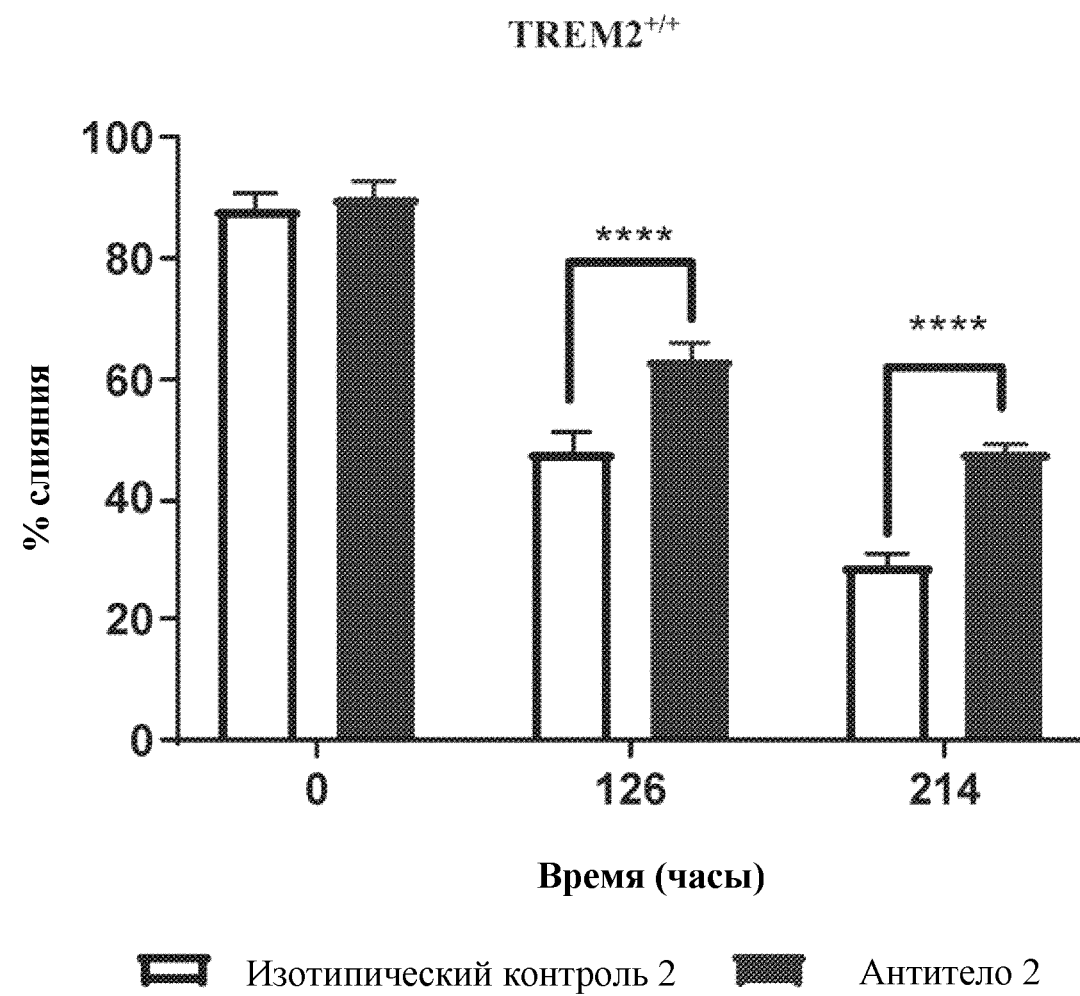
ФИГ. 10С





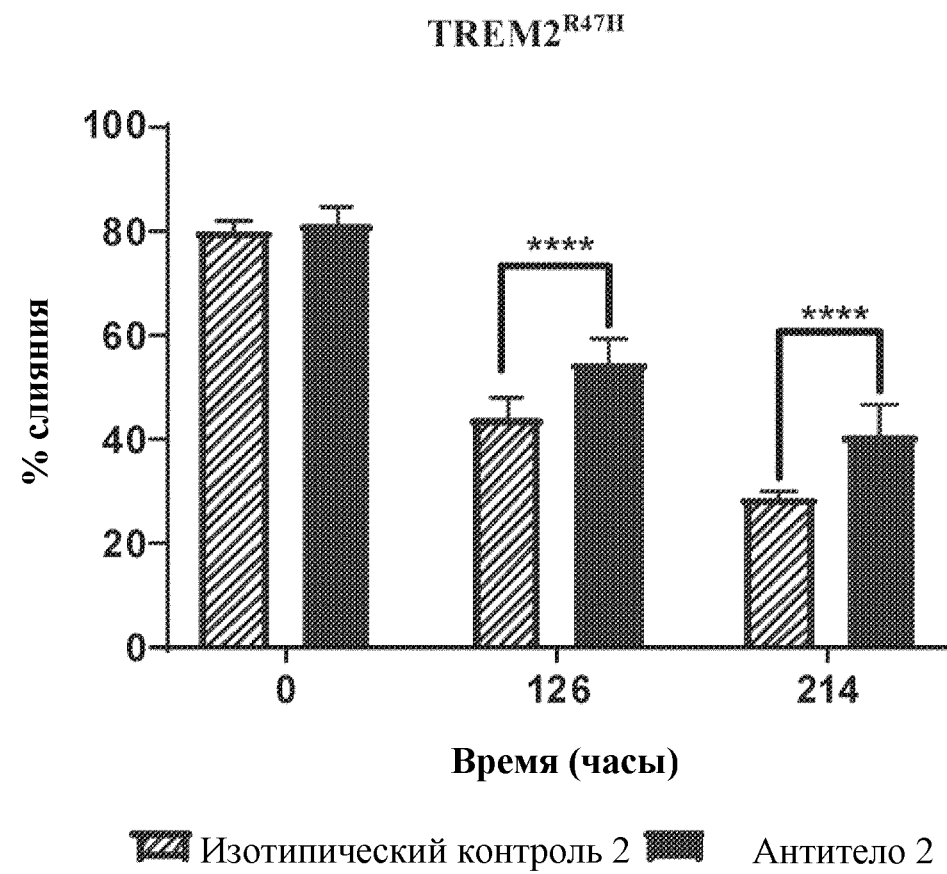
20/51

ФИГ. 10D

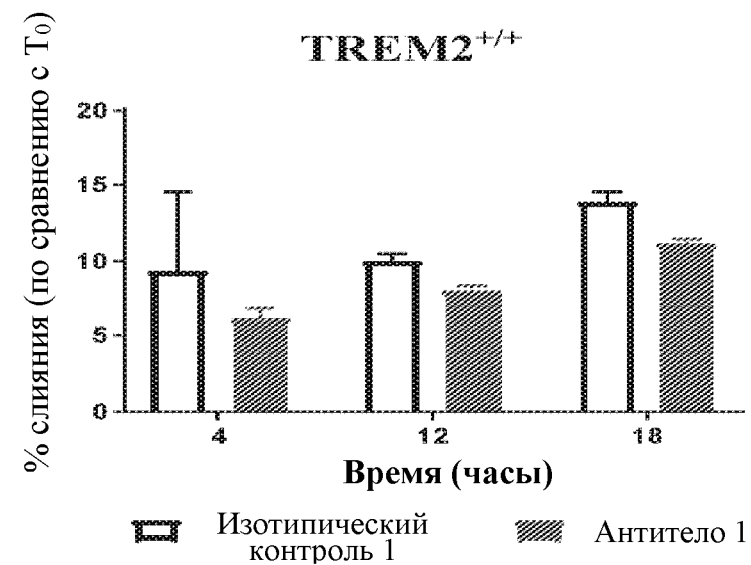


21/51

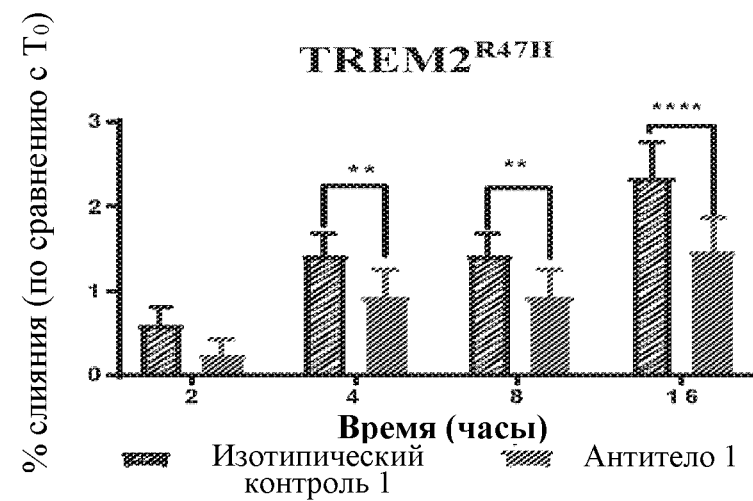
ФИГ. 10Е



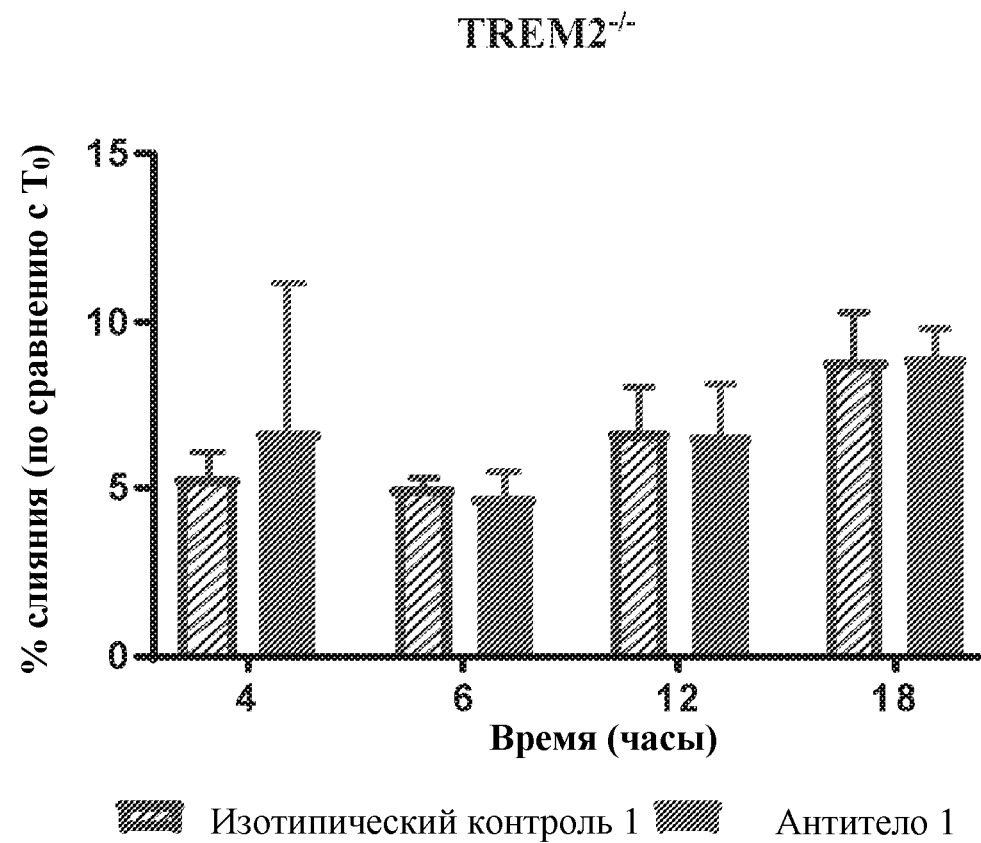
ФИГ. 10F



ФИГ. 11А

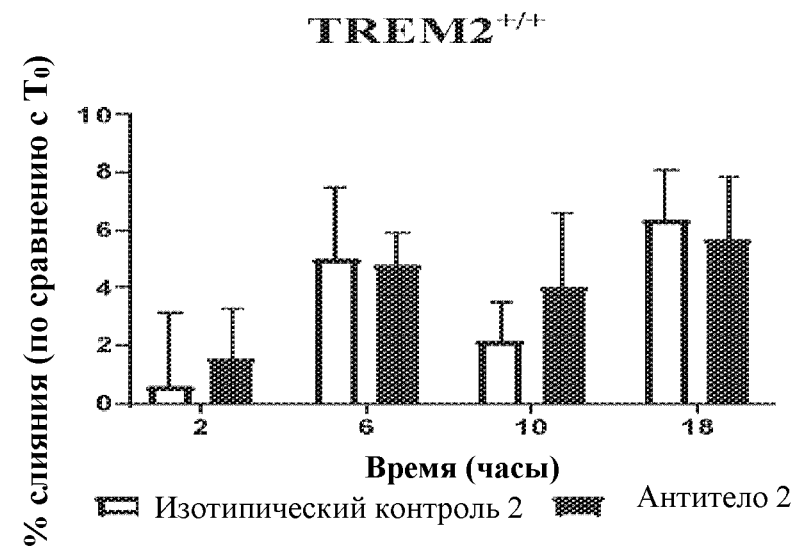


ФИГ. 11В

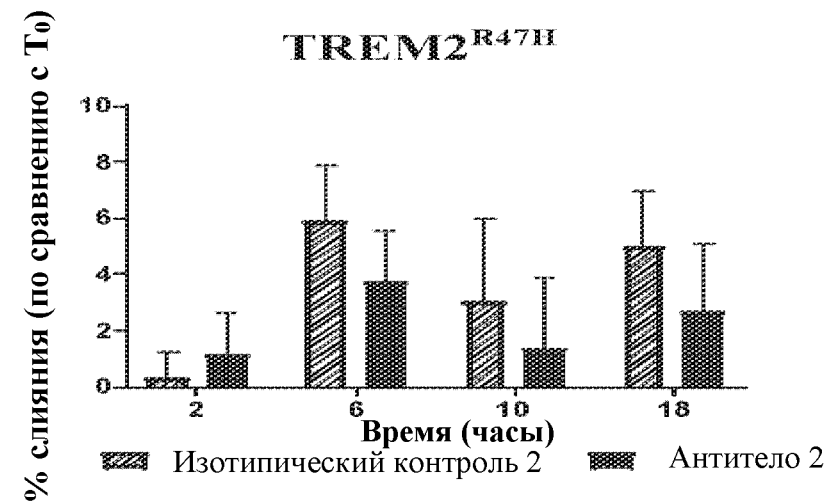


24/51

ФИГ. 11С

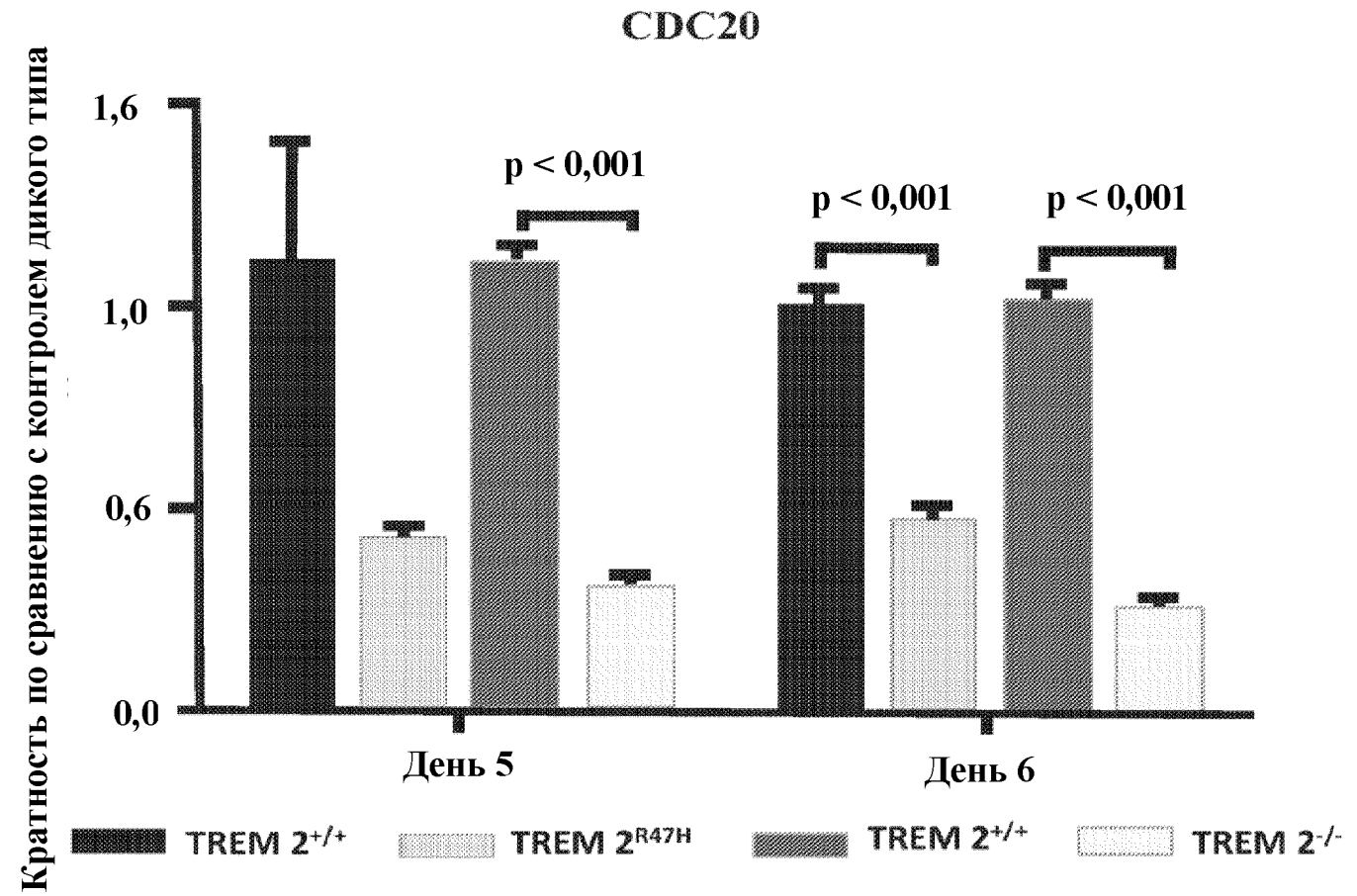


ФИГ. 11D

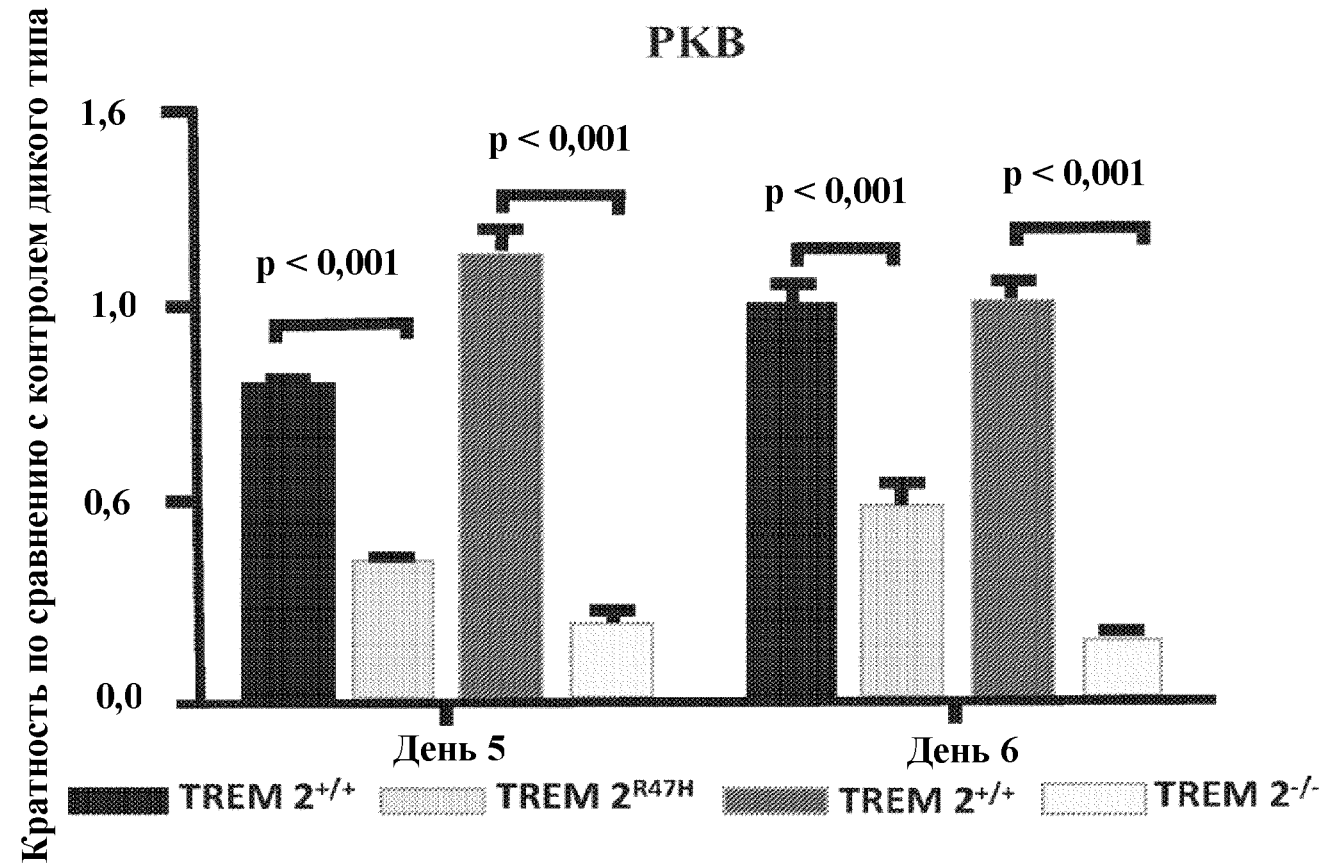


ФИГ. 11E

ФИГ. 12А

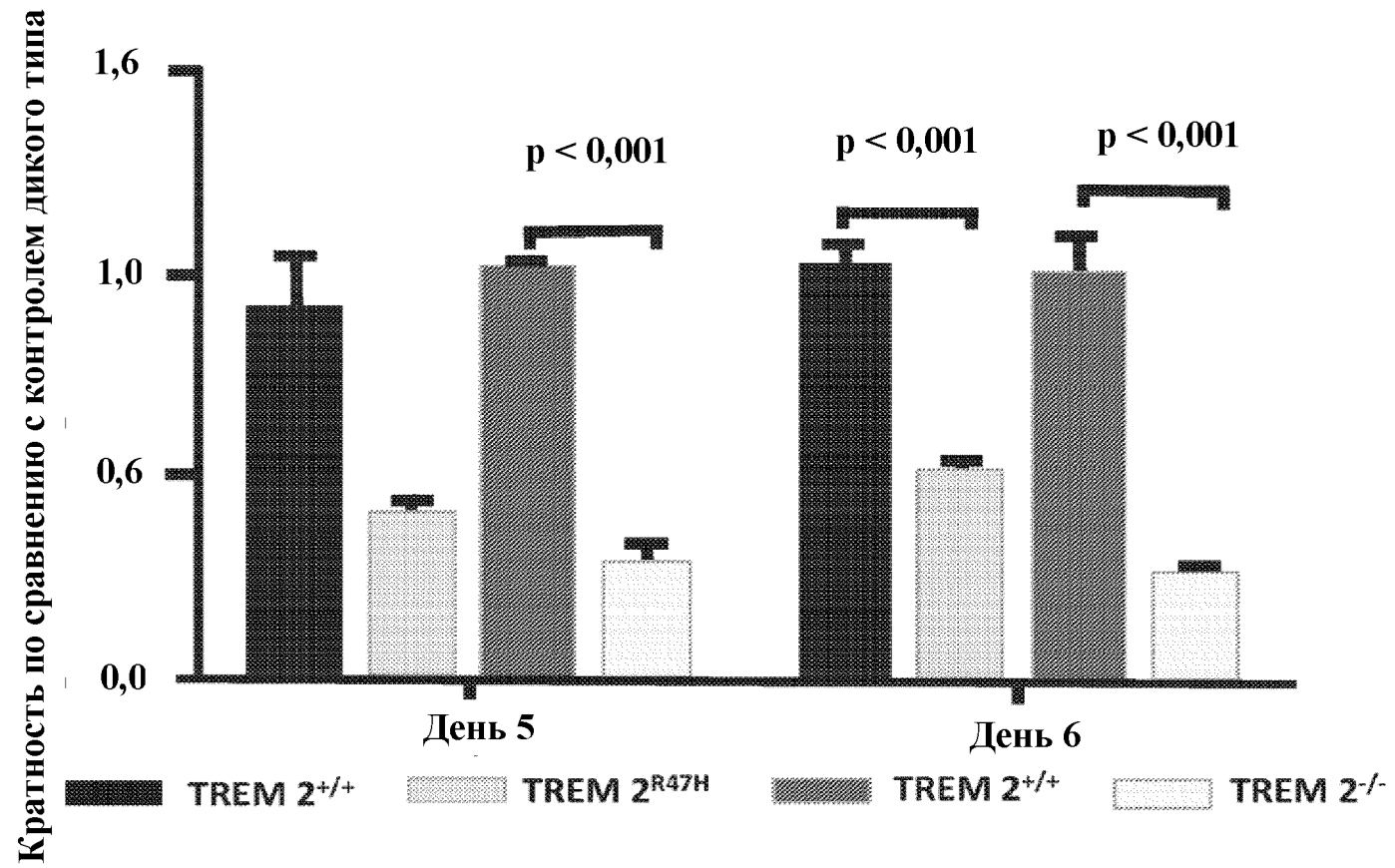


ФИГ. 12В

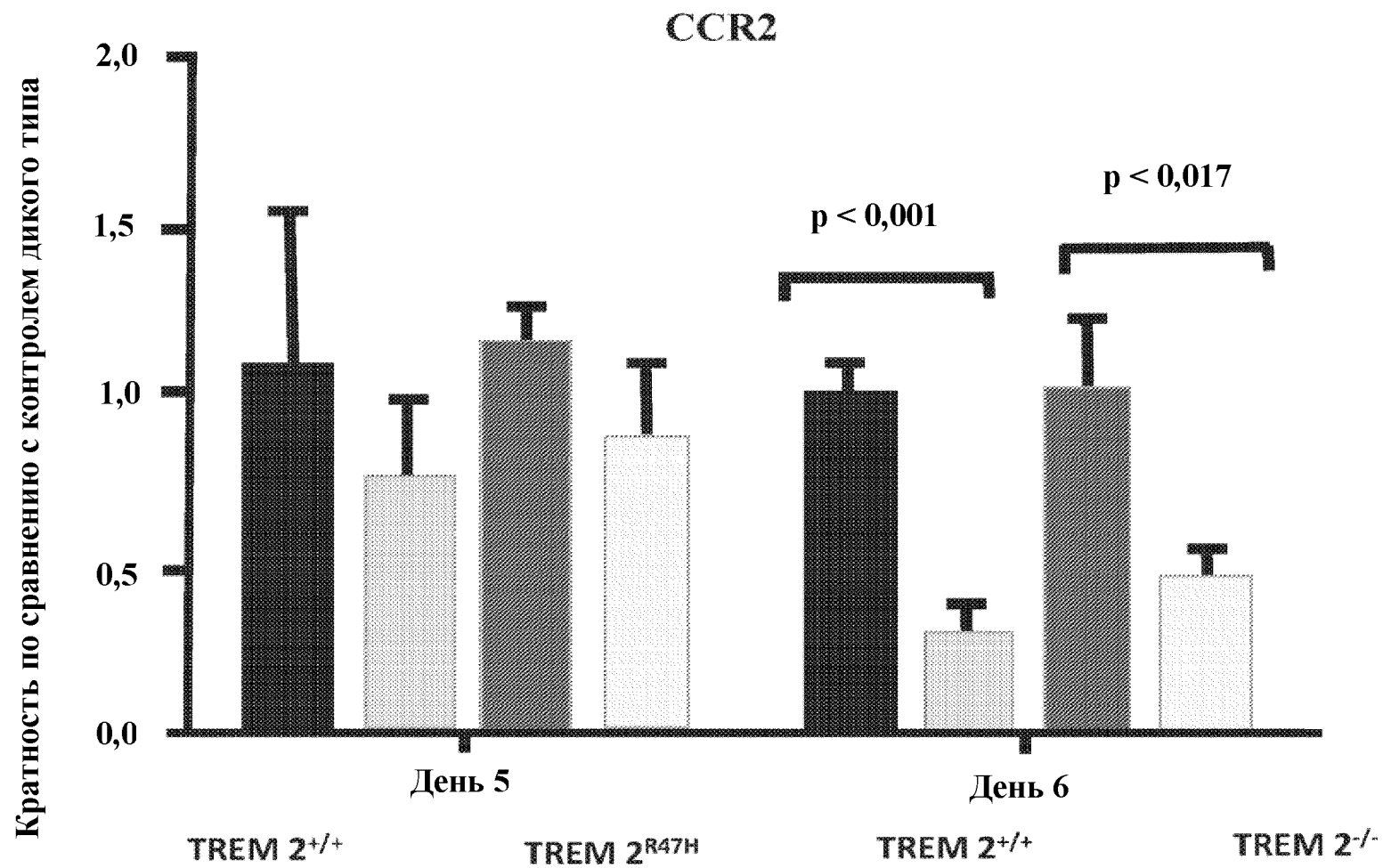


ФИГ. 12С

NDC80

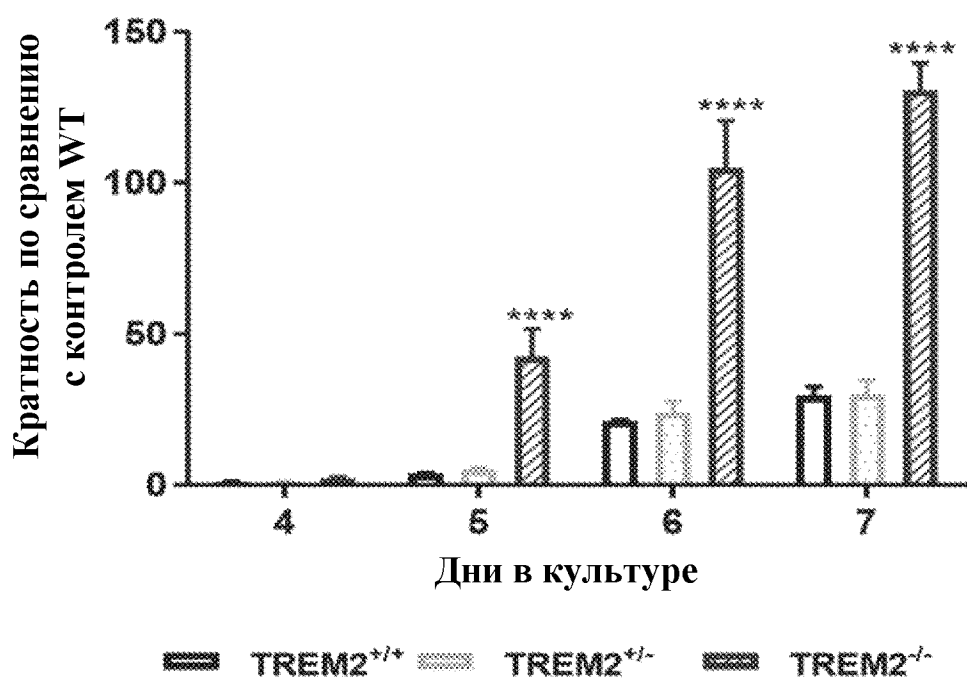


ФИГ. 12D



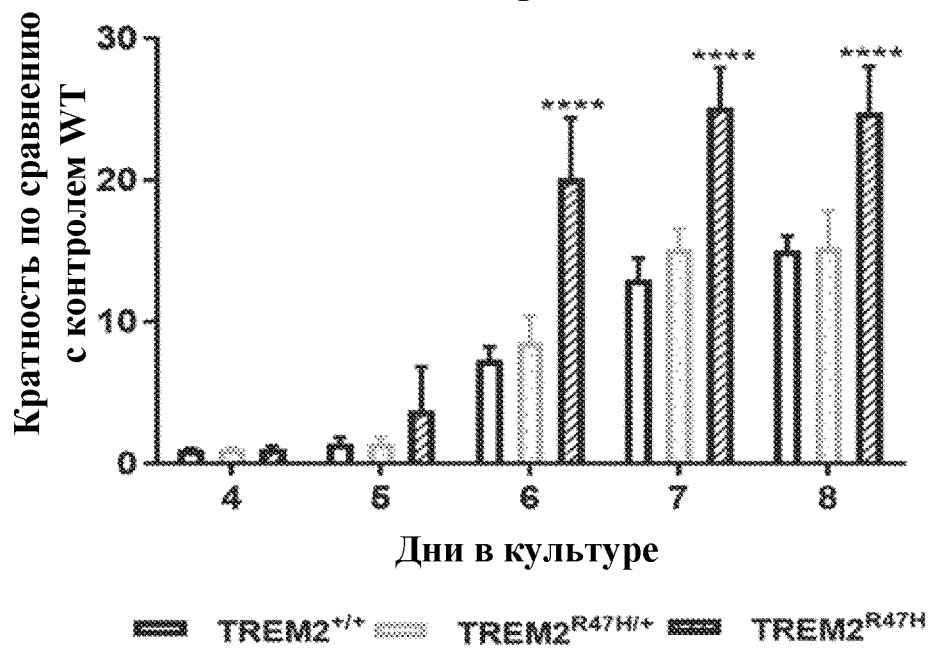
30/51

АроЕ

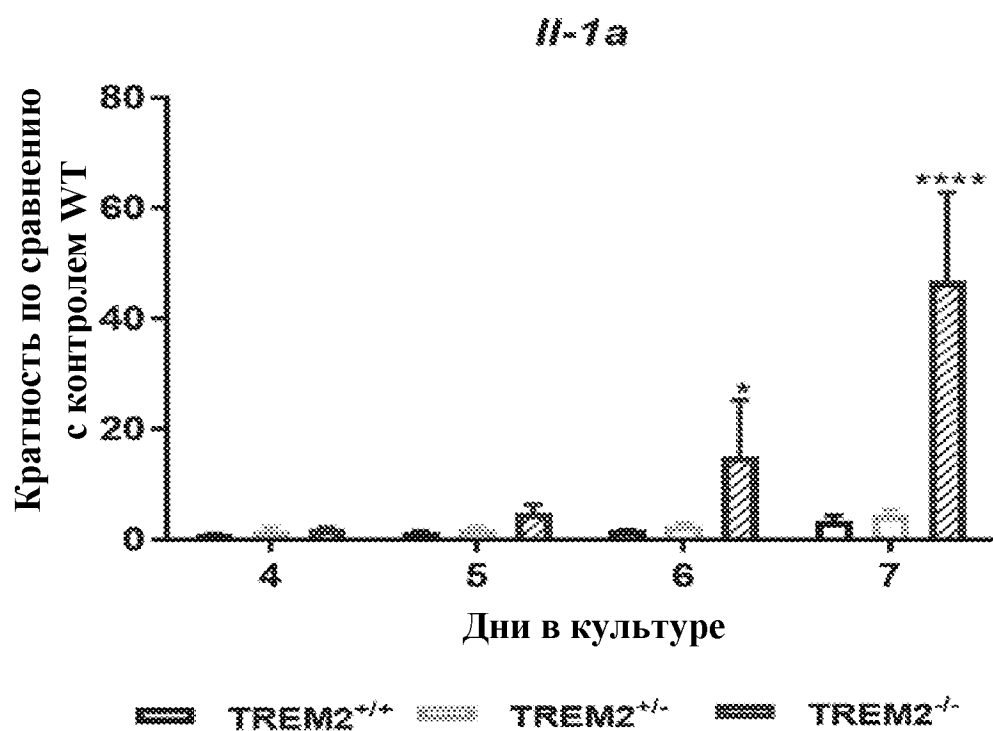


ФИГ. 13А

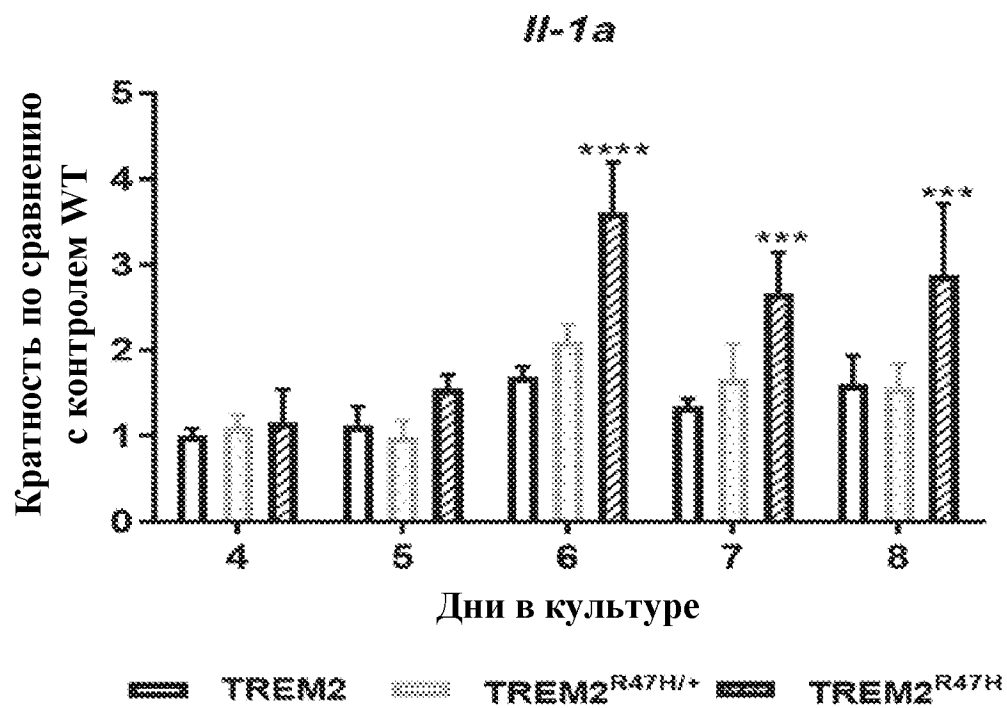
АроЕ



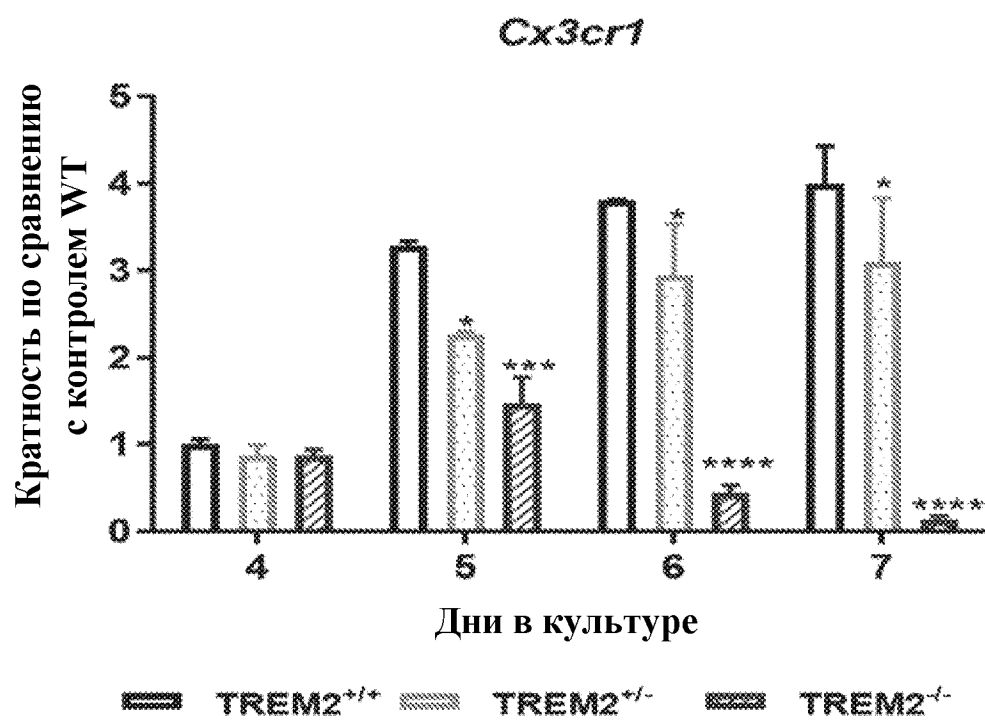
ФИГ. 13В



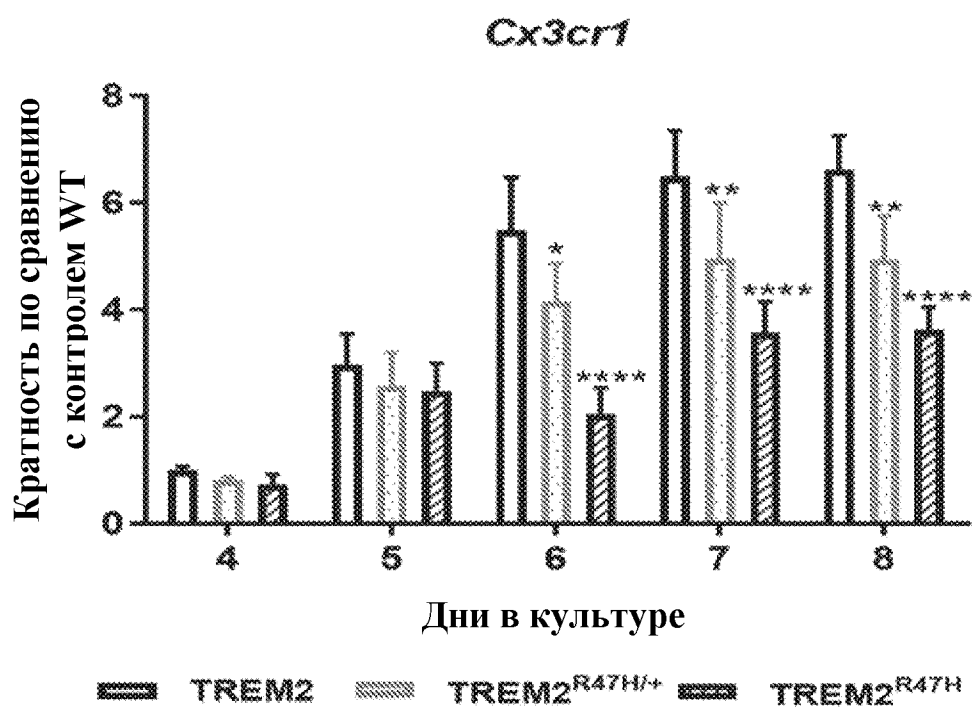
ФИГ. 13С



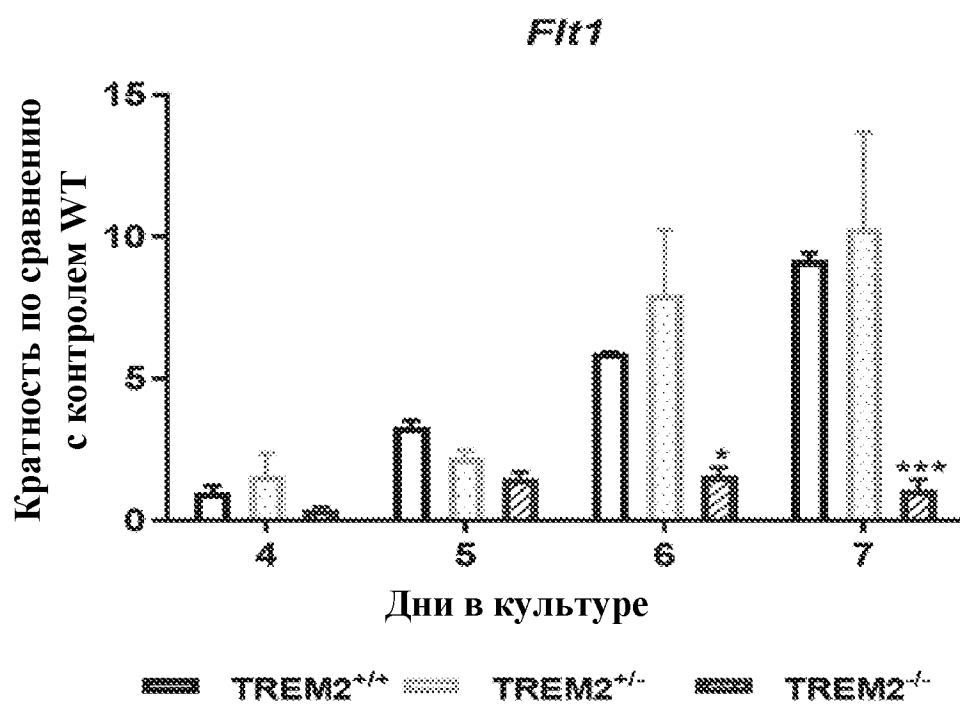
ФИГ. 13D



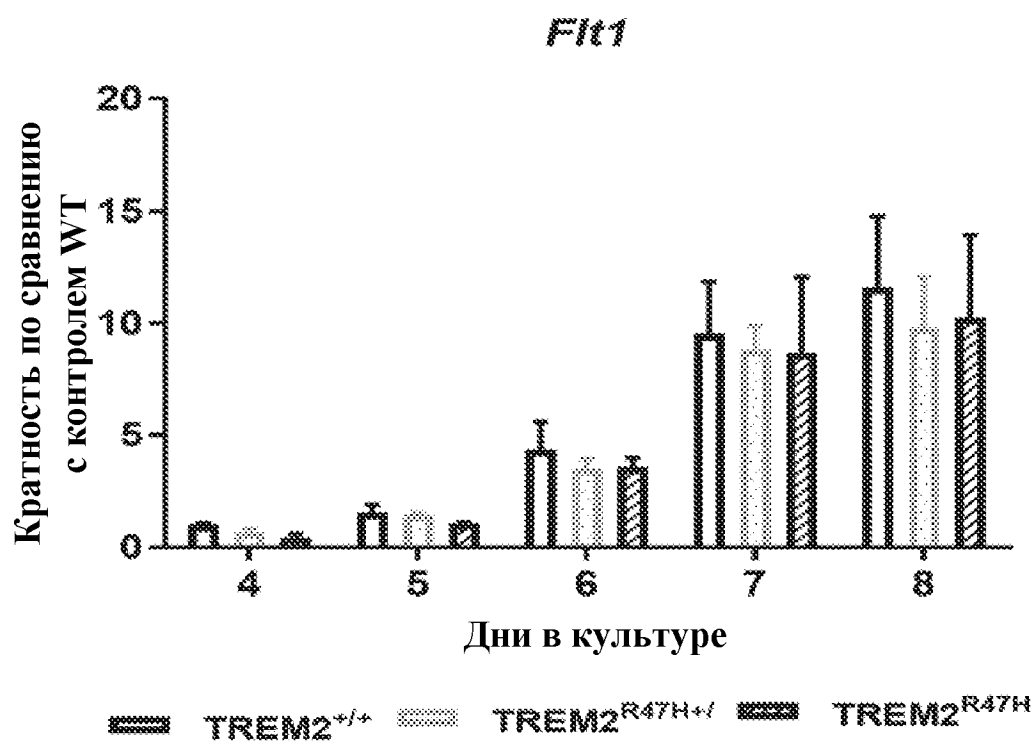
ФИГ. 13Е



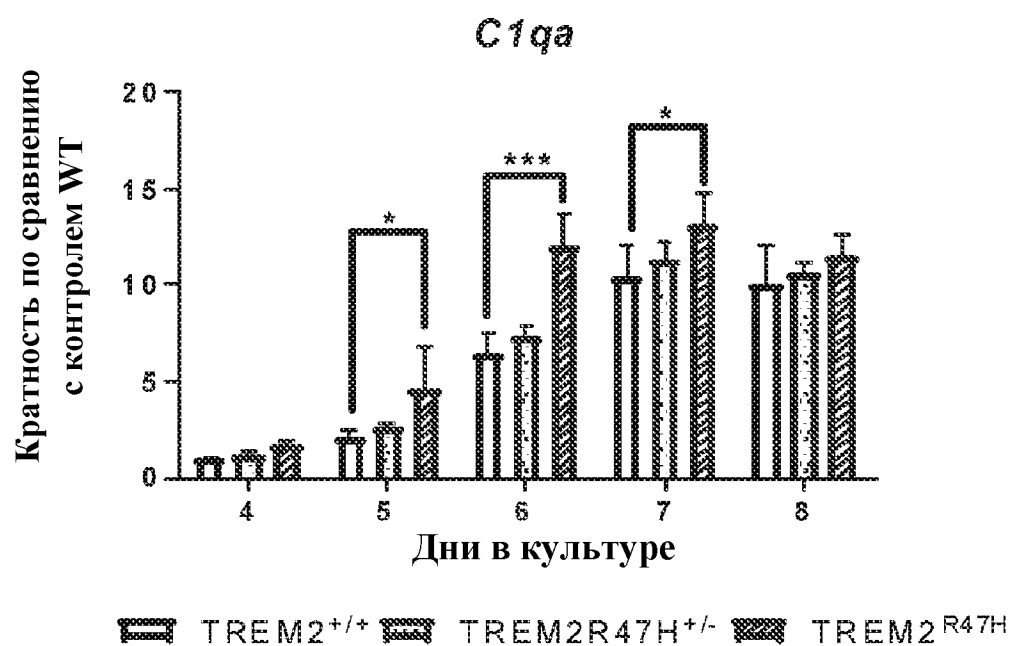
ФИГ. 13F



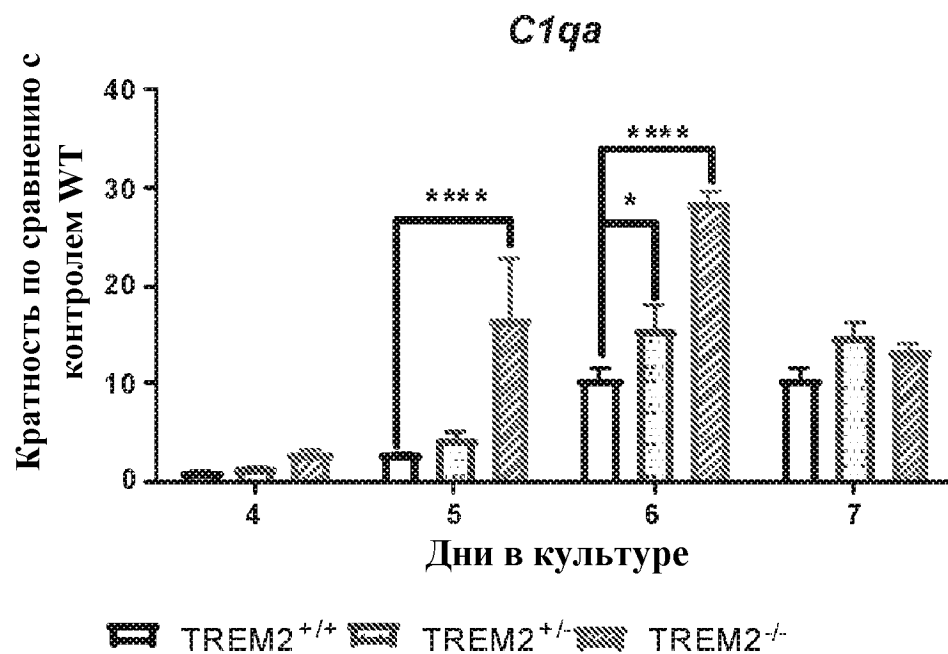
ФИГ. 13G



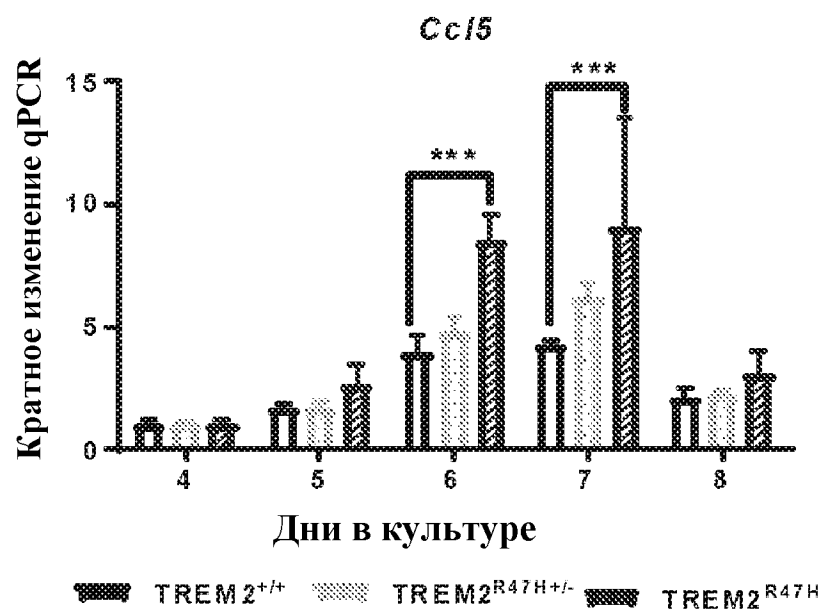
ФИГ. 13H



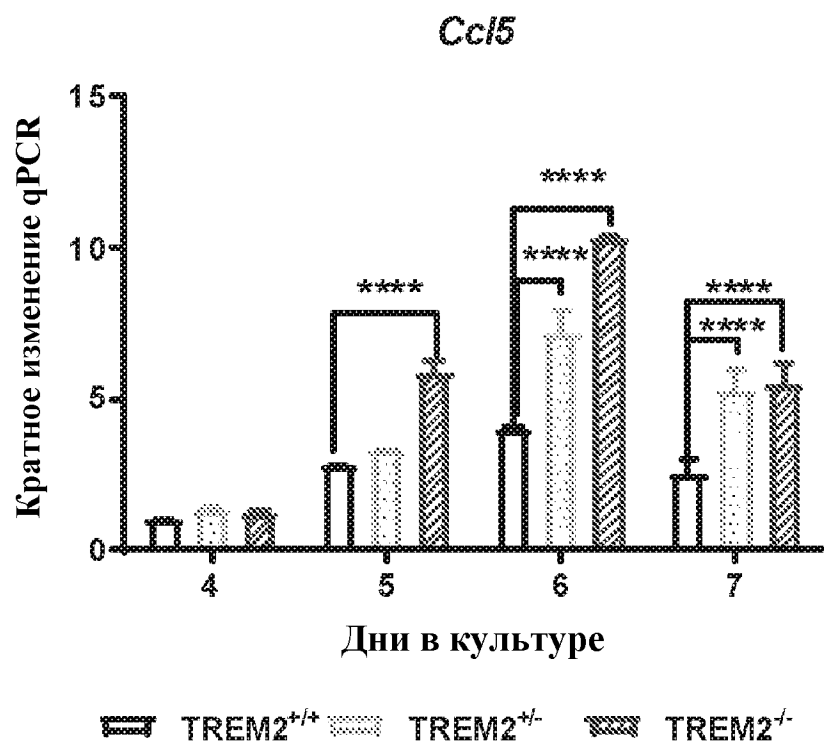
ФИГ. 13I



ФИГ. 13J

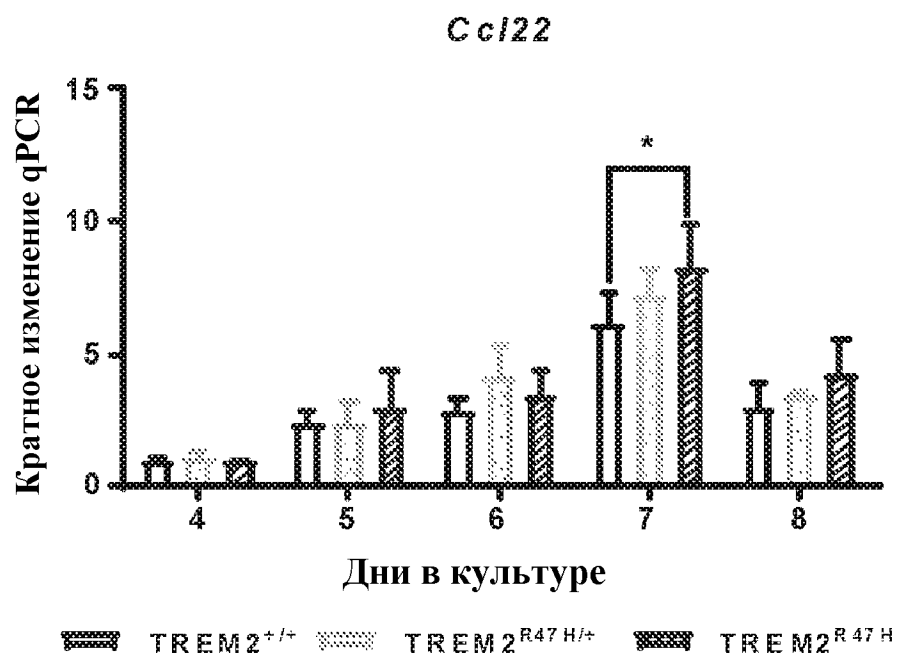


ФИГ. 13К

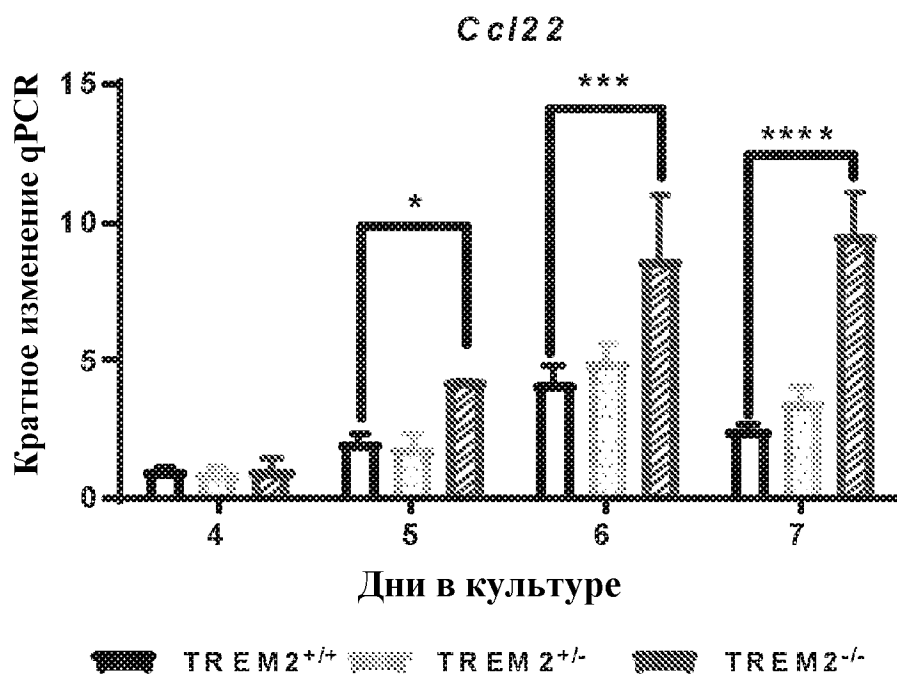


ФИГ. 13L

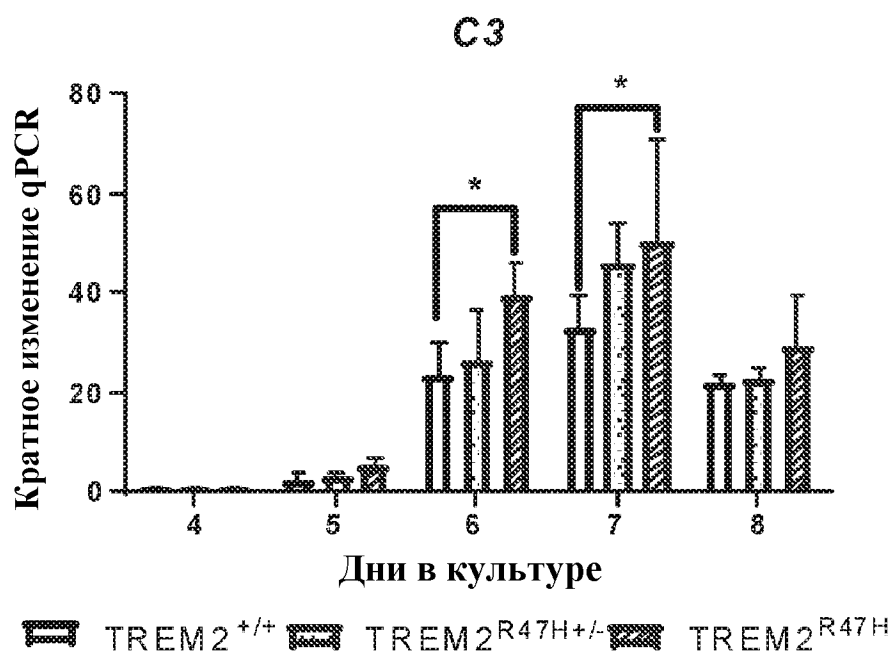
36/51



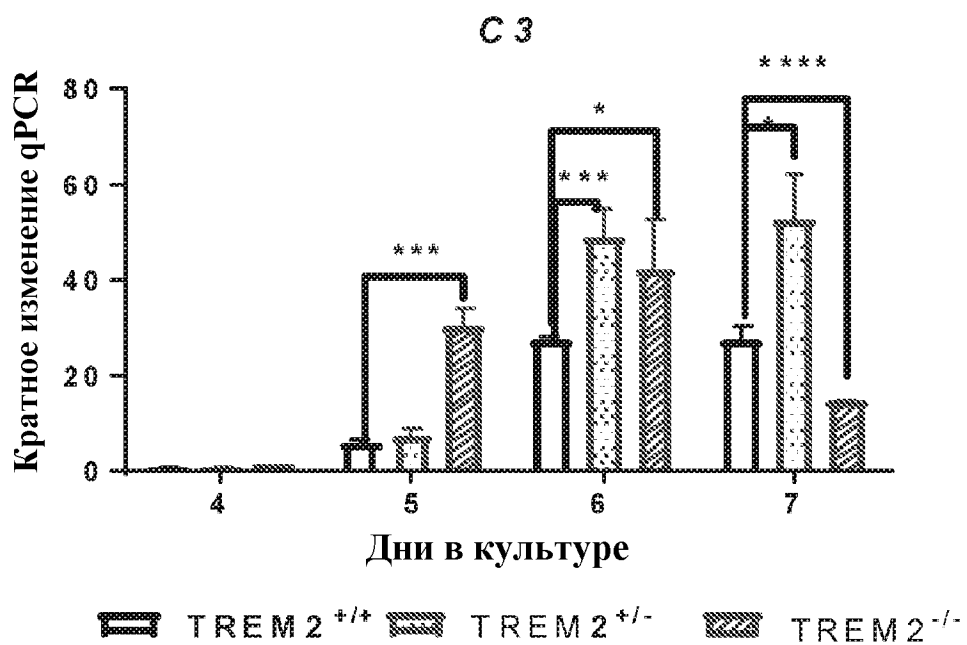
ФИГ. 13М



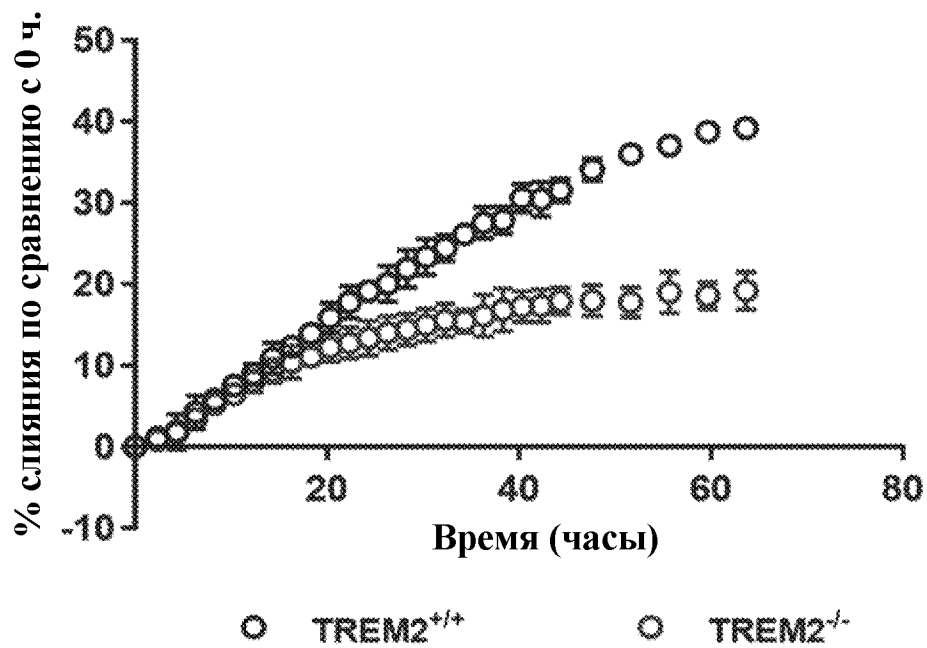
ФИГ. 13N



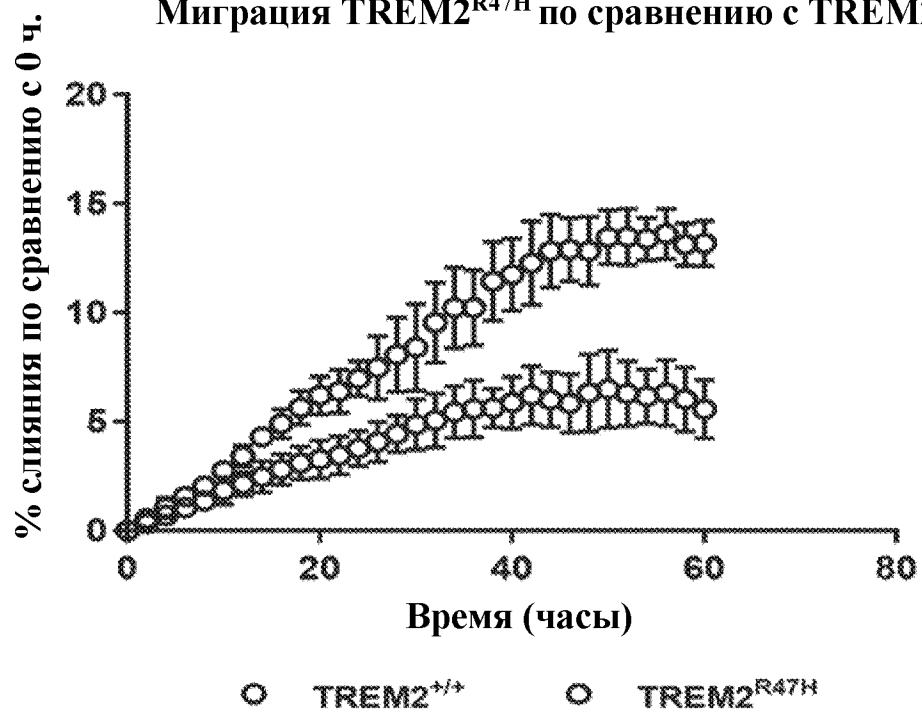
ФИГ. 13О



ФИГ. 13Р

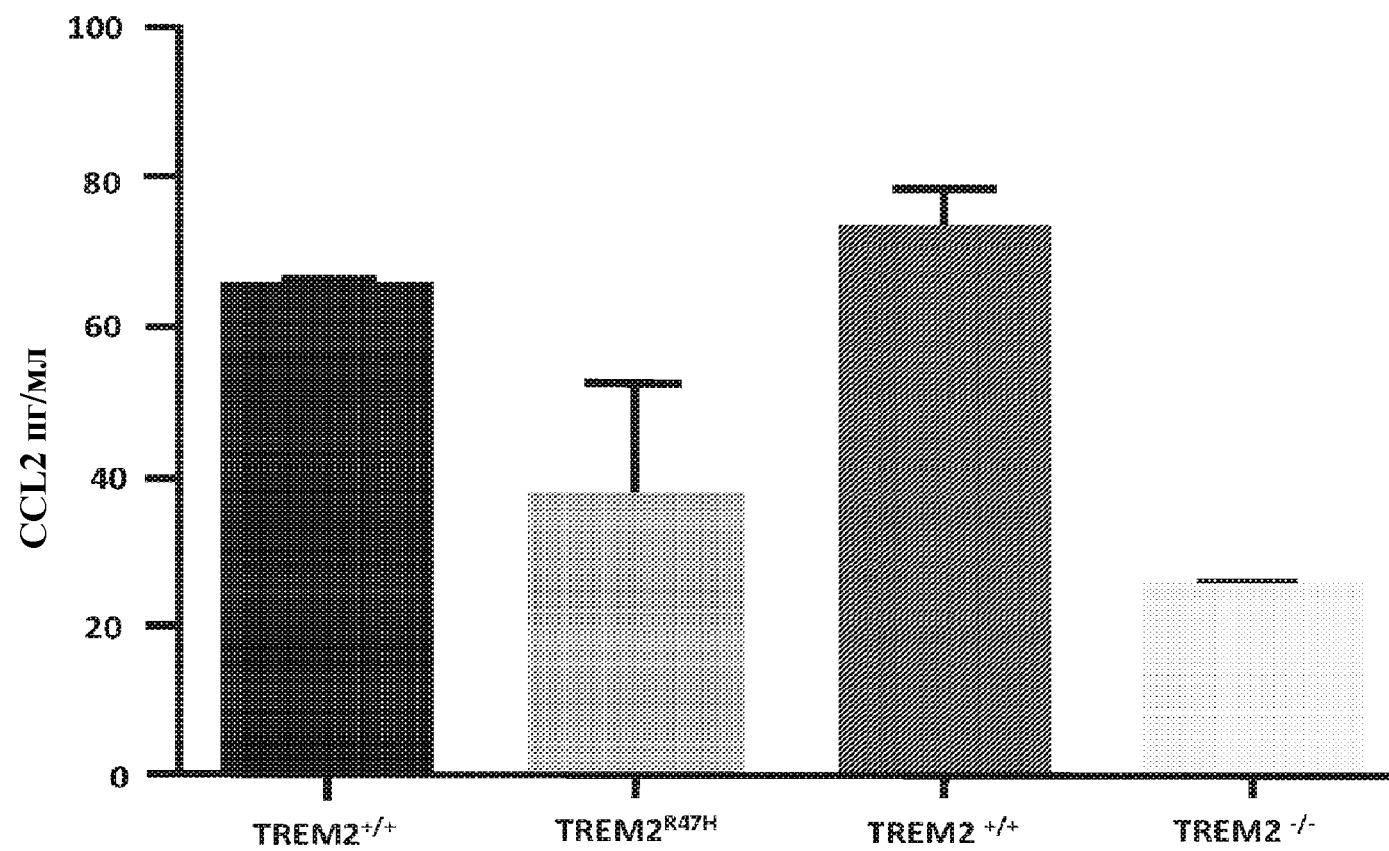
Миграция TREM2^{-/-} по сравнению с TREM2^{+/+}

ФИГ. 14А

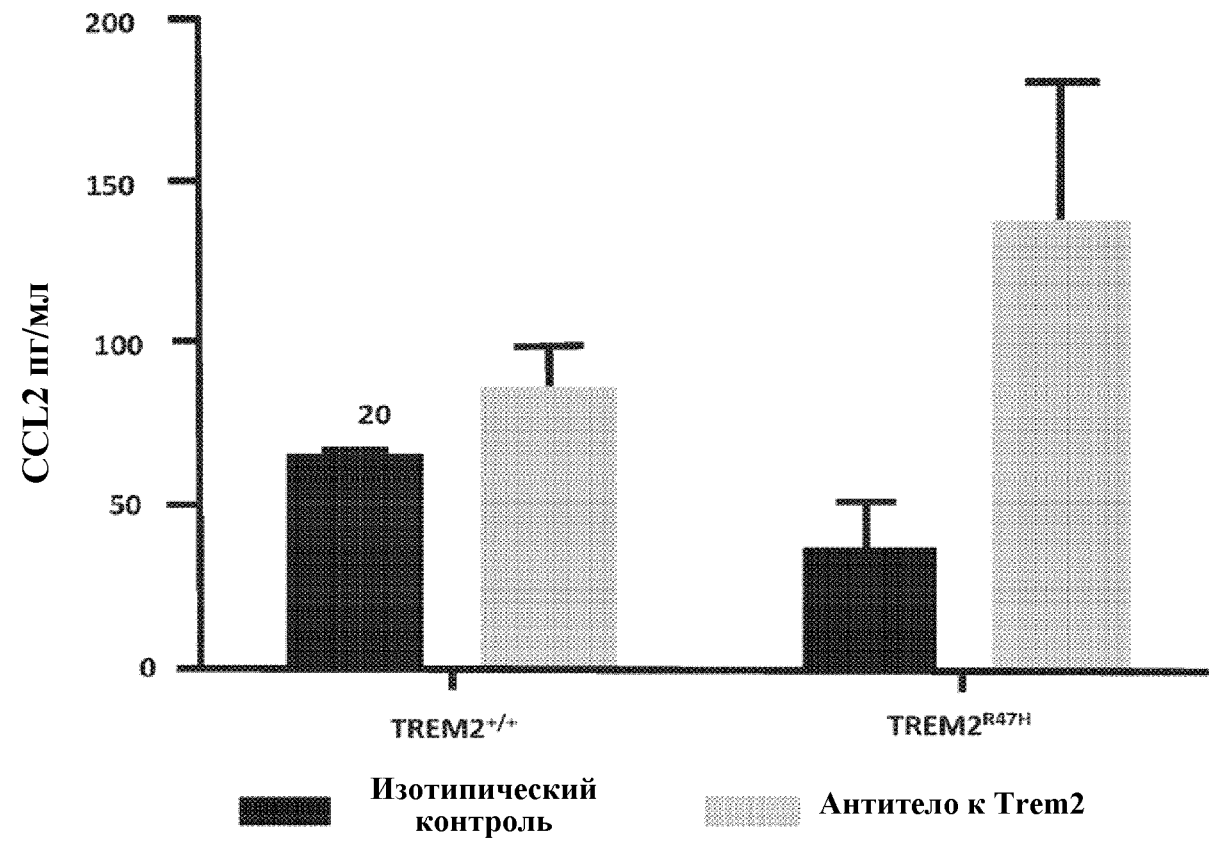
Миграция TREM2^{R47H} по сравнению с TREM2^{+/+}

ФИГ. 14В

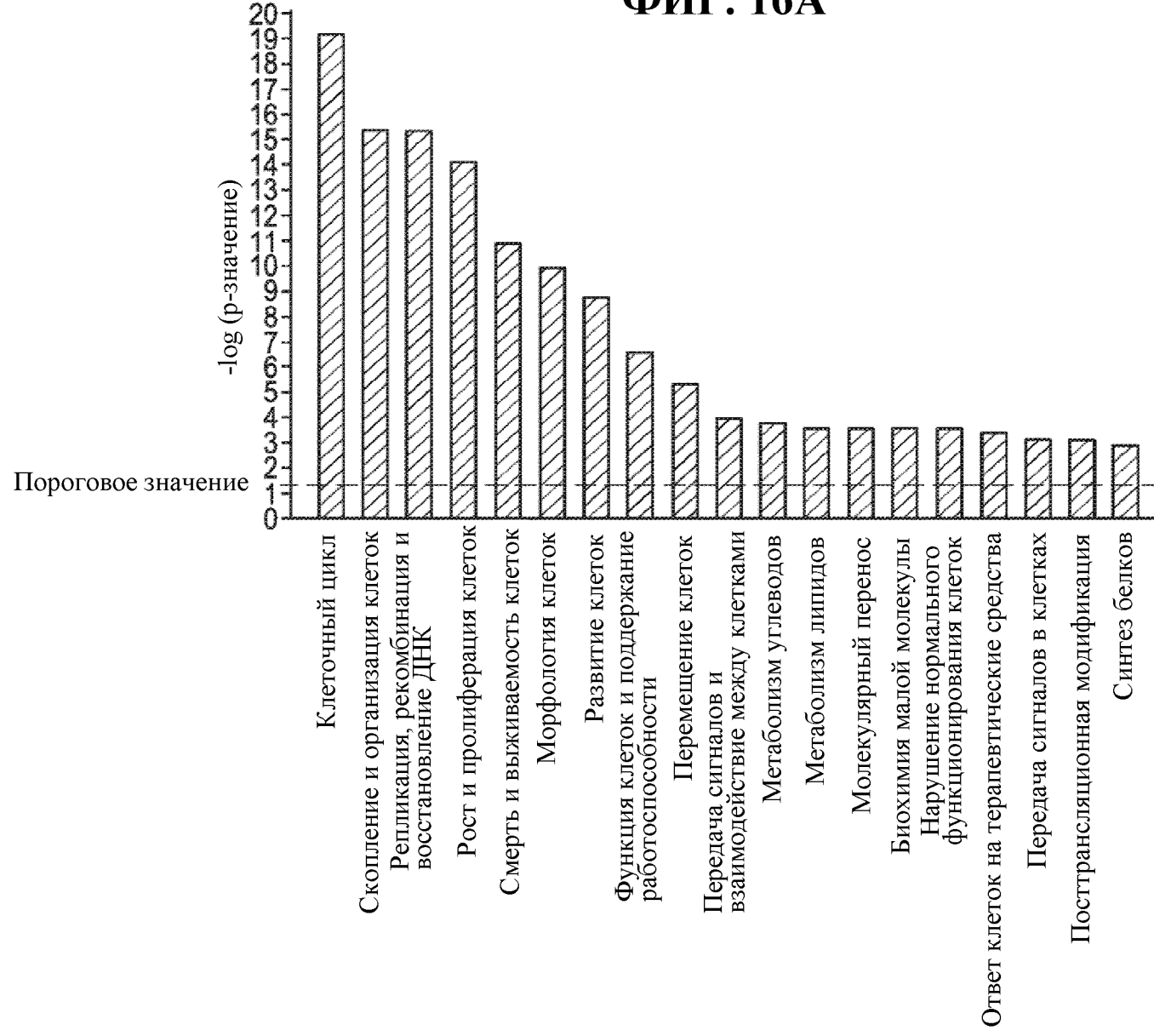
ФИГ. 15А



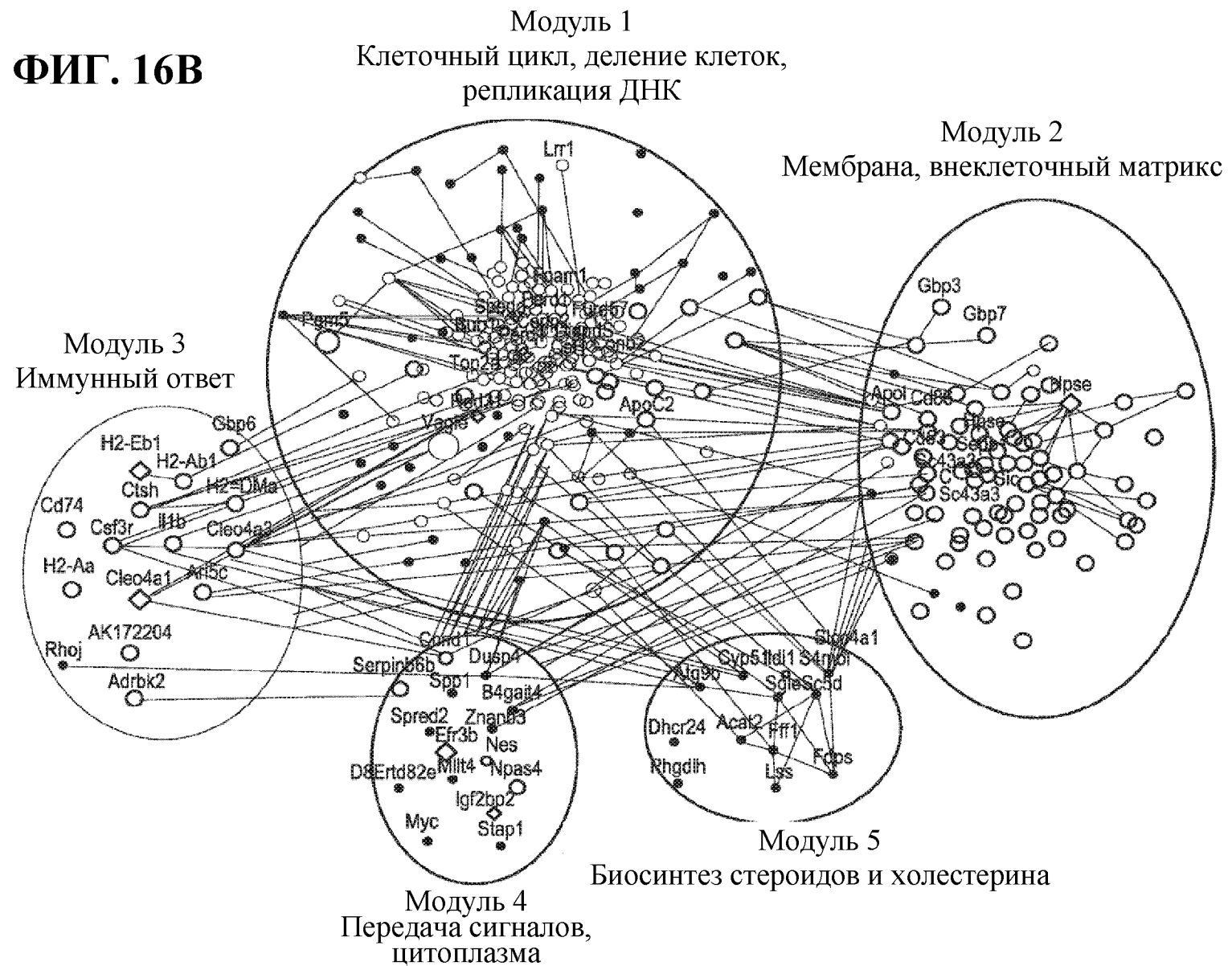
ФИГ. 15В



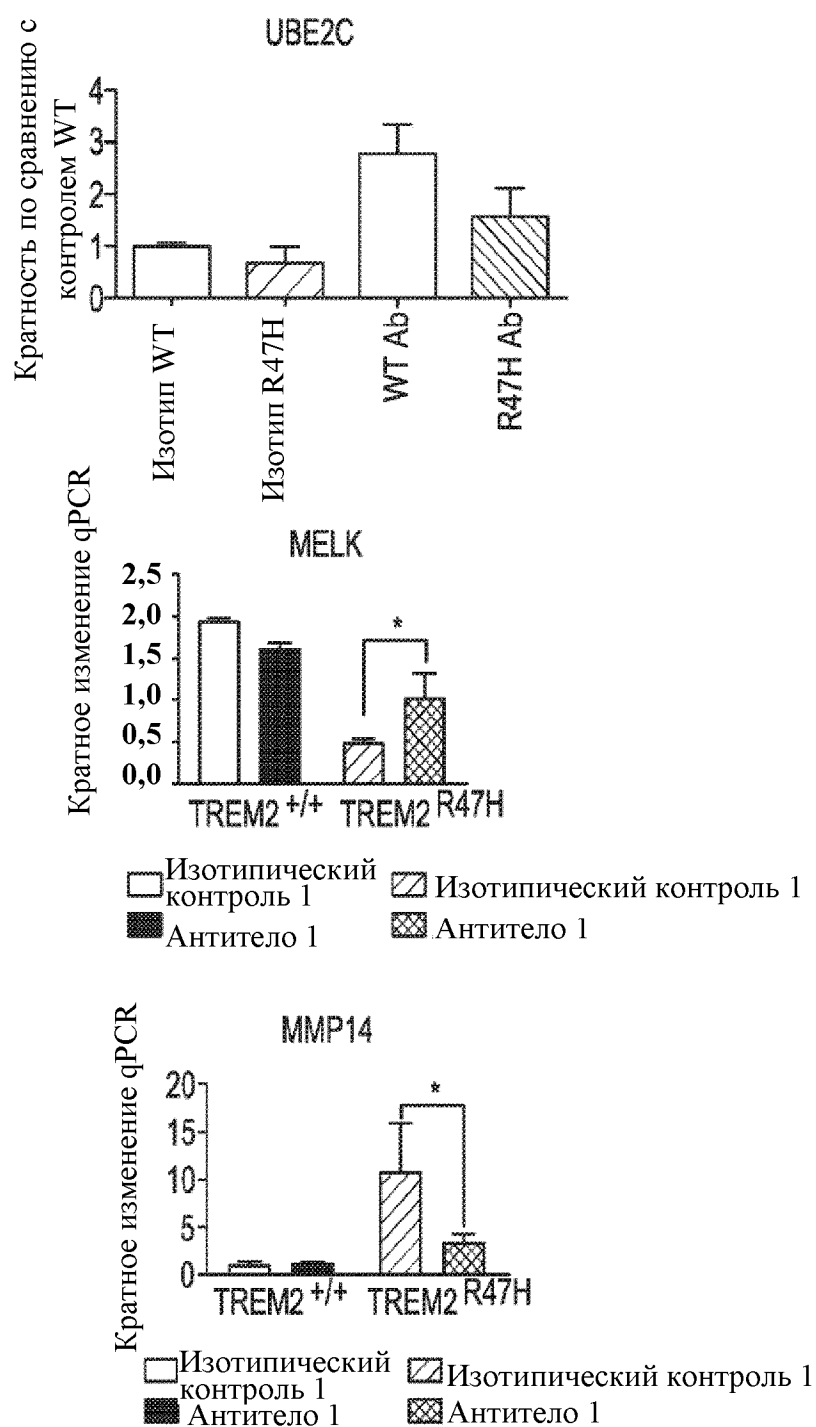
ФИГ. 16А



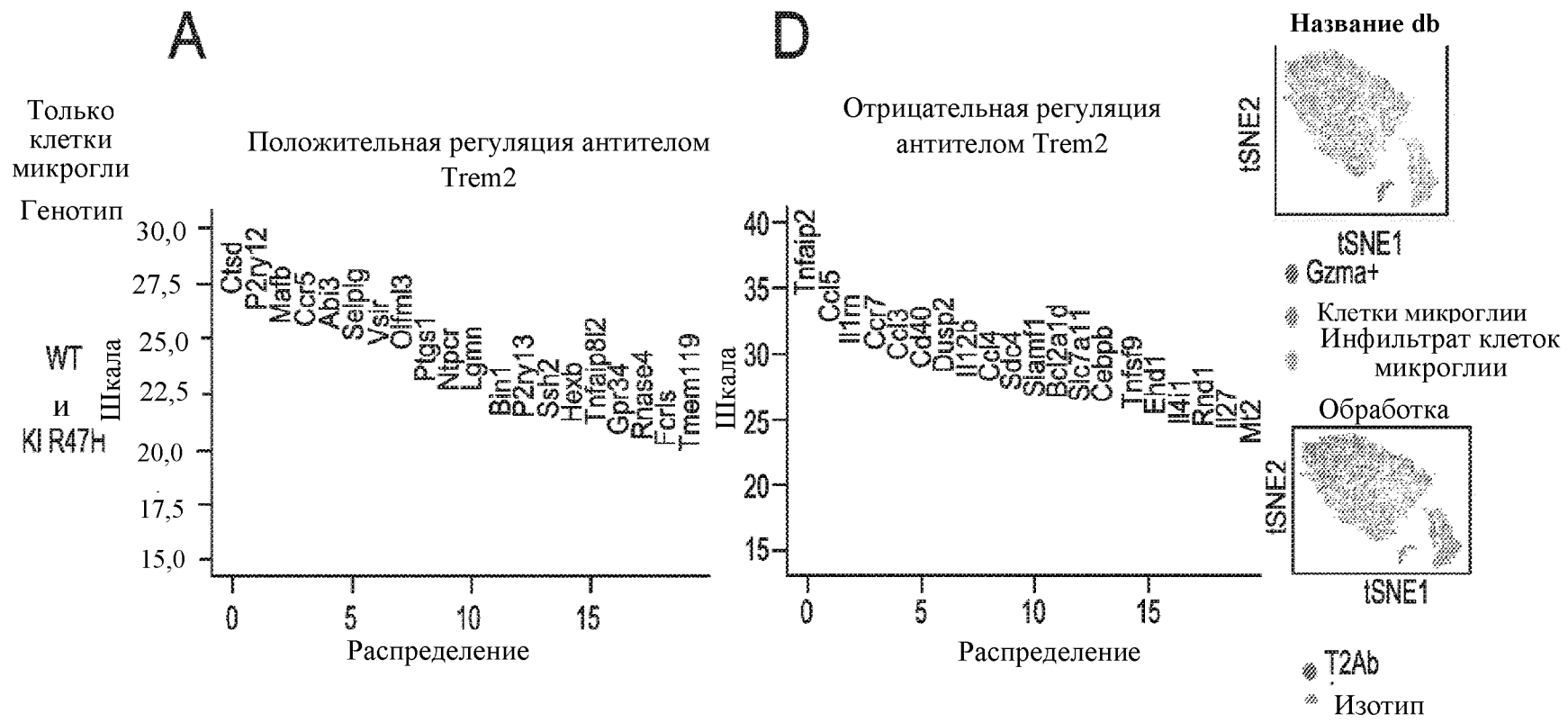
ФИГ. 16В



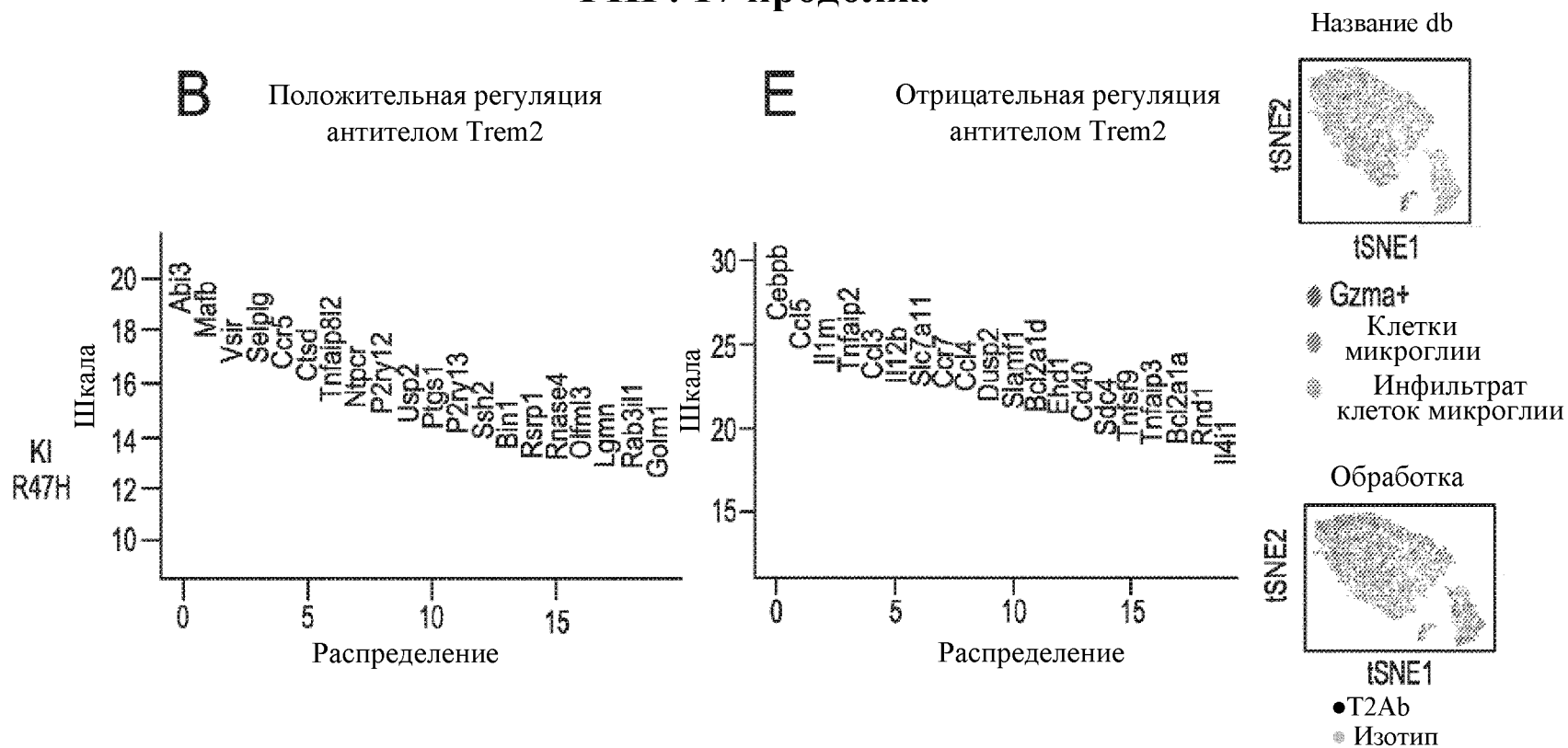
ФИГ. 16С



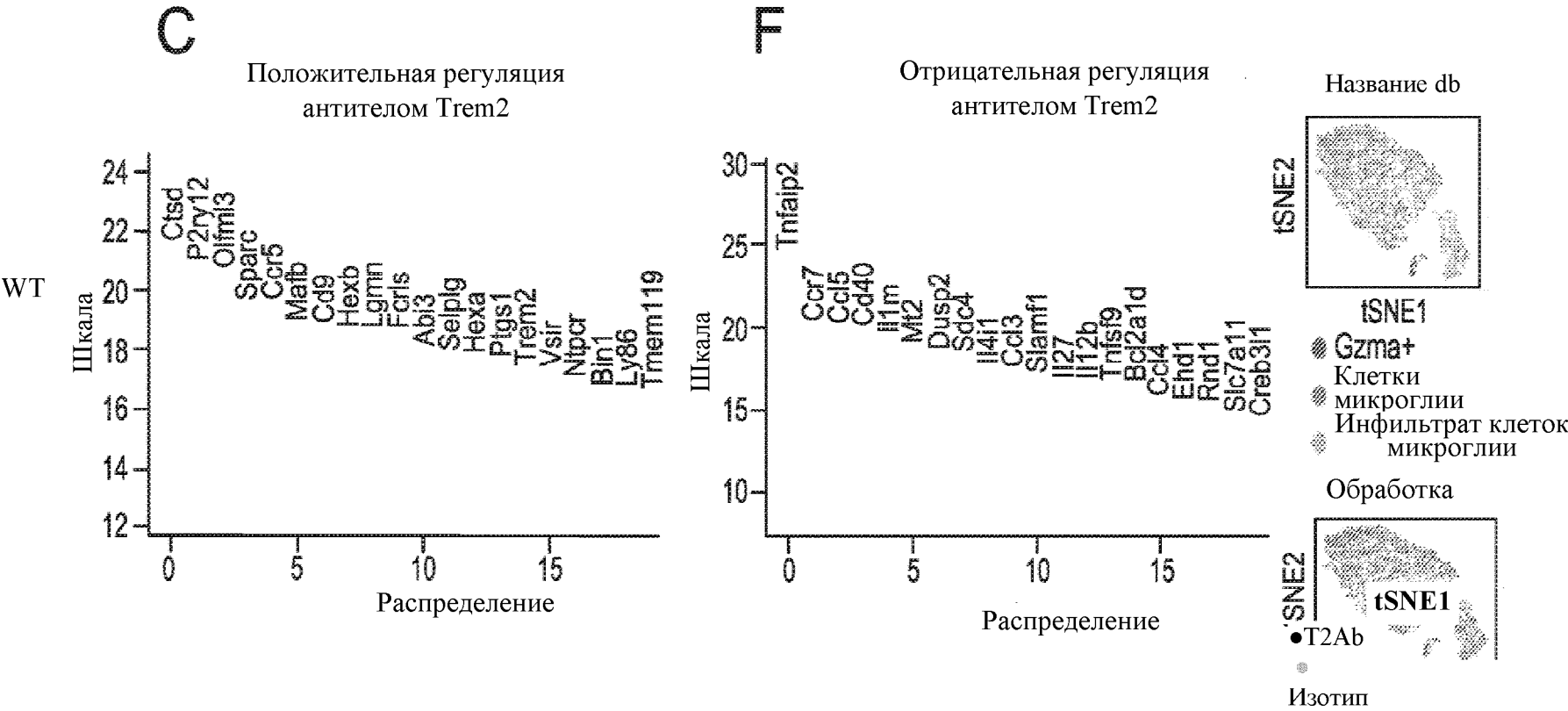
ФИГ. 17



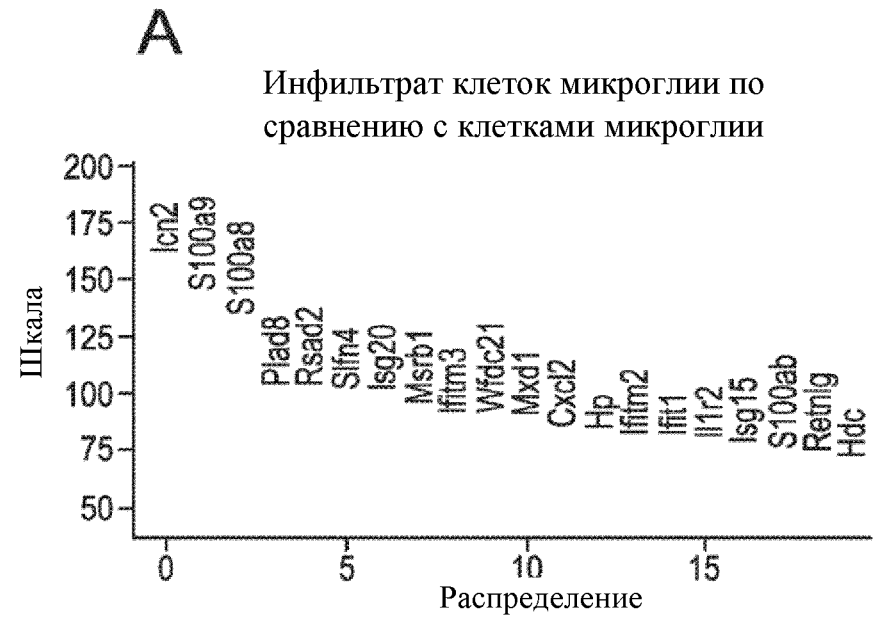
ФИГ. 17 продолж.



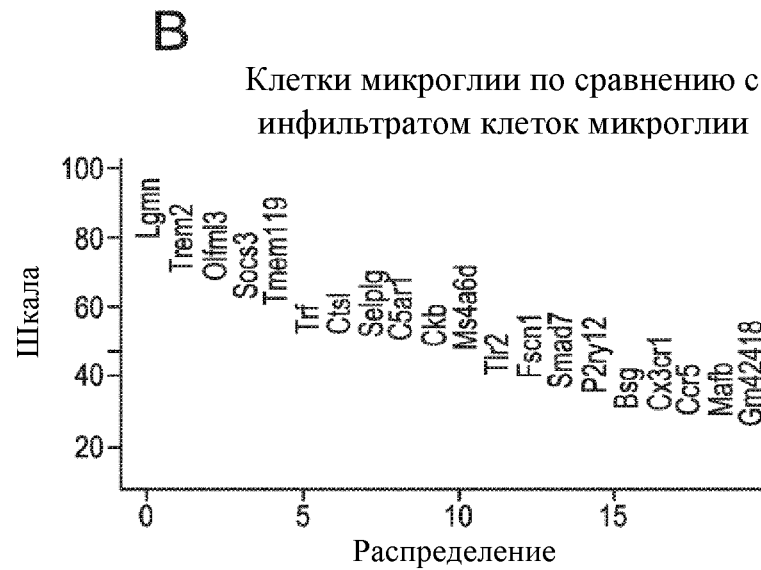
ФИГ. 17 продолж.



ФИГ. 18

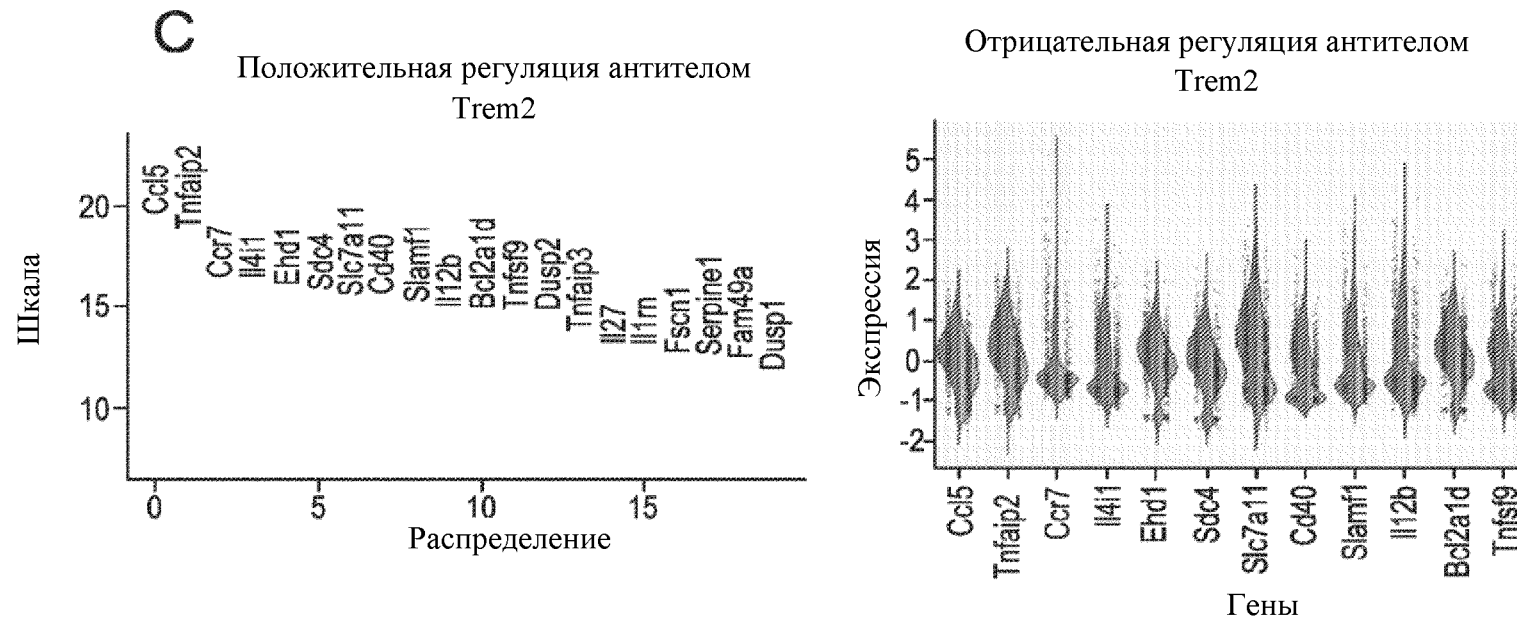


ФИГ. 18 продолж.



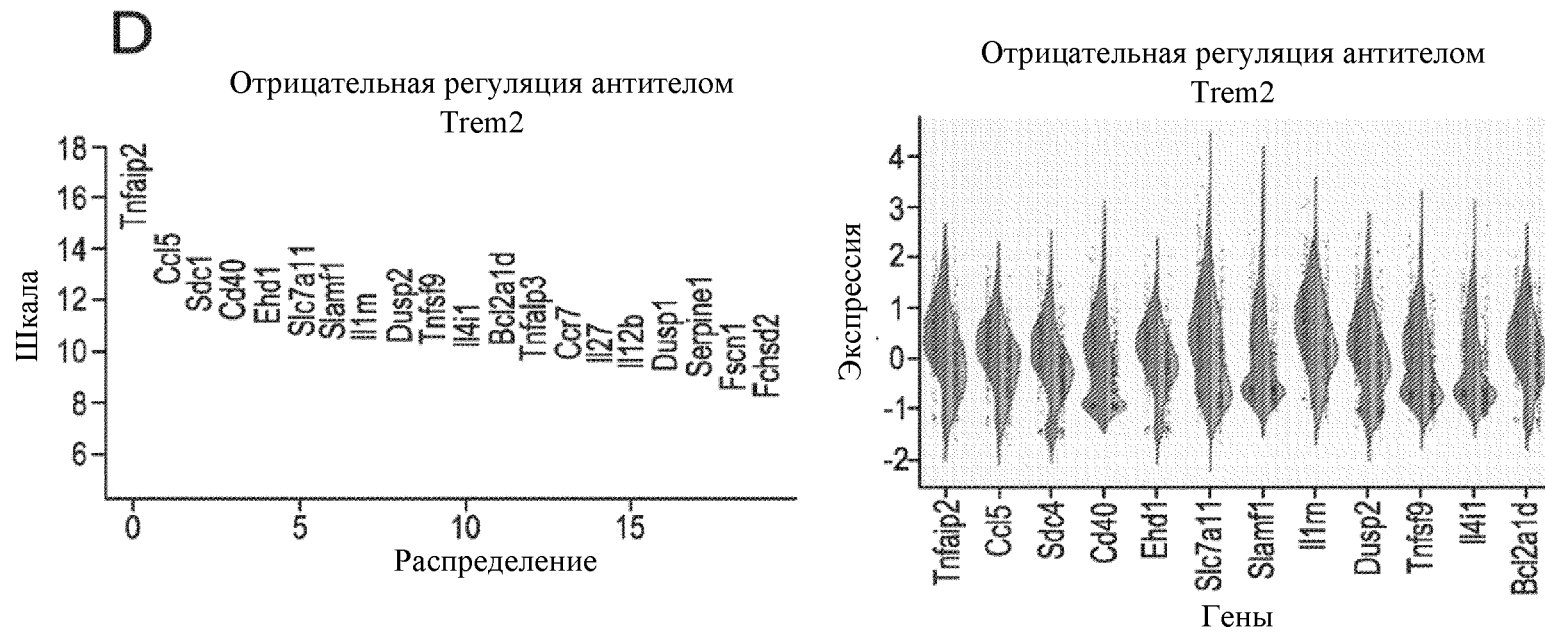
ФИГ. 18 продолж.

Популяция инфильтрата только WT и KI



ФИГ. 18 продолж.

Популяция инфильтрата только WT



ФИГ. 18 продолж.

Популяция инфильтрата только KI

